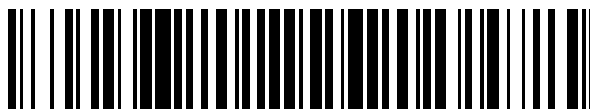


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 162**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2007 E 07743912 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2022855**

54 Título: **Método de producción de alta secreción de proteínas**

30 Prioridad:

16.05.2006 JP 2006136993

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

04.12.2015

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku
Toyko 103-8426, JP

72 Inventor/es:

CHIBA, YASUNORI;
JIGAMI, YOSHIFUMI;
KURODA, KOSUKE;
KOBAYASHI, KAZUO;
ICHIKAWA, KIMIHISA;
NONAKA, KOICHI y
SUZUKI, TAKESHI

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 553 162 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

Método de producción de alta secreción de proteínas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una célula huésped de levadura transformada y a métodos para producirla, así como a usos de la misma para la producción de proteínas.

10 **Técnica anterior**

Hasta la fecha, la producción de proteínas para aplicaciones farmacéuticas por medio de técnicas de recombinación de genes ha implicado principalmente el uso de células animales o células de *E. coli* como huéspedes. Las células de *E. coli* permiten la producción de proteínas diana a bajo coste; sin embargo, las células de *E. coli* no pueden experimentar una modificación tipificada por la modificación de cadenas de azúcar y se producen proteínas inactivas en los cuerpos de inclusión. Esto requiere un proceso de solubilización y, por tanto, las células de *E. coli* no son adecuadas para procedimientos complicados para la producción de proteínas. Por el contrario, las células animales permiten la producción de proteínas diana como proteínas activas. Sin embargo, de manera desventajosa, el uso de células animales aumentaría extraordinariamente los costes de producción en cuanto a los costes de equipos y de material, debido a operaciones de producción y cultivo de células animales que requieren mucho tiempo.

Entre las proteínas, se han usado anticuerpos como productos farmacéuticos durante mucho tiempo. Dado que derivaban de fuentes distintas a los humanos, se producían de nuevo anticuerpos frente a los anticuerpos administrados. Por tanto, tales anticuerpos no podían administrarse más de una vez y el uso de los mismos era restringido. En los últimos años se ha hecho posible la producción de un anticuerpo humanizado en el que una secuencia de aminoácidos distinta del sitio de unión a antígeno se ha sustituido por una secuencia derivada de un anticuerpo humano. Además, se ha hecho posible la producción de un ratón productor de anticuerpo humano en el que se ha introducido un gen de anticuerpo humano. Por tanto, la aplicación de anticuerpos como productos farmacéuticos pasó a ser extensa. En la actualidad, tales anticuerpos se producen mediante células cultivadas, tales como células CHO, en las que se han introducido genes que codifican para hibridomas o anticuerpos. Sin embargo, tal producción es problemática en cuanto al coste, la productividad, la seguridad y similares.

En los últimos años, se ha intentado la producción de proteínas para aplicaciones farmacéuticas con el uso de levadura, con el propósito de complementar los inconvenientes descritos anteriormente. Sin embargo, básicamente ninguno de tales intentos se ha llevado al uso práctico. En lo que respecta a anticuerpos que tienen estructuras complicadas, en particular, hay ejemplos de expresión de Fab, un anticuerpo de cadena sencilla (ScFv) o similares (Biosci. Biotechnol. Biochem., 64: 2138-2144, 2000). Sin embargo, la productividad es muy baja en cuanto a un anticuerpo de longitud completa (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 8678-8682, 1988). Recientemente se notificó un ejemplo de producción de anticuerpos con el uso de levadura (*Pichia pastoris*) que produce una cadena de azúcar de unión a N de mamífero (Nature Biotechnology, 24: 210-215, 2006), aunque este informe no hace referencia al rendimiento. Por tanto, la producción de alto nivel de anticuerpos en levadura es difícil. Se considera que las causas de esto son la capacidad de secreción insuficiente de la levadura, la degradación provocada por proteasas, o similares.

Como medios para resolver tales problemas, se propuso un método que implica el uso de una cepa deficiente en proteasa (Enzyme and Microbial Technology, 26: 671-677, 2000; Protein Expr. Purif., 20: 485-491, 2000, Biosci. Biotechnol. Biochem., 66: 628-631, 2002). Los inventores también han desarrollado un método de uso de una proteasa, que es una proteasa A (PEP4), proteasa B (PRB1), o cepa deficiente en gen de yapsina (YPS1), para inhibir la degradación de un anticuerpo (documento WO 2003/091431). Como método para mejorar la productividad de proteínas por medio de la introducción de genes, se notificó un método para mejorar la productividad de ScFv permitiendo la coexpresión de partes de chaperonas moleculares que ayudan en la formación de estructuras tridimensionales de proteínas en el retículo endoplásmico, tal como BiP (KAR2)/PDI (Nat. Biotechnol. 16: 773-777, 1998), aunque este método simplemente produce un fragmento de un anticuerpo de cadena sencilla.

Además se han desarrollado y se han usado muchos promotores inducibles o constitutivos para producir proteínas foráneas. Sin embargo, cuando se permite la expresión a altos niveles de genes que codifican para proteínas foráneas con el uso de promotores potentes en células o cuando se producen proteínas que tienen menor probabilidad de plegarse, se produce agregación en el retículo endoplásmico (ER) y las proteínas resultantes pueden acumularse en ocasiones en las células. Además, las proteínas secretoras y proteínas de membrana se traducen en proteínas, se incorporan al retículo endoplásmico inmediatamente después, se someten a una modificación dada, y luego se transfieren al aparato de Golgi. En tal caso, en ocasiones pueden acumularse proteínas desplegadas en el retículo endoplásmico por algún motivo. Esto se denomina "estrés del retículo endoplásmico". Los ejemplos de causas para estrés del retículo endoplásmico de este tipo incluyen alteración en la modificación (por ejemplo, adición de una cadena de azúcar o un enlace disulfuro) que se produce en el retículo endoplásmico y transporte deteriorado desde el retículo endoplásmico. Las células de mamífero tienen un mecanismo de "respuesta de proteínas desplegadas (UPR)" como medio para reaccionar frente a tal estrés del

retículo endoplásmico. Por ejemplo, las proteínas acumuladas en el retículo endoplásmico se protegen mediante la inhibición de la transcripción, la aceleración del plegamiento inducida mediante chaperonas moleculares, la degradación de proteínas desnaturalizadas o la muerte celular por medio de apoptosis.

Como genes que regulan la UPR, se conocen genes de células animales IRE1 α -XBP1, PERK-eIF-2 α y ATF6. En el caso de la levadura, Ire1p-Hac1p es el único gen que se conoce como gen de este tipo, y el gen Ire1p-Hac1p está asociado con la UPR mediante el mecanismo mostrado a continuación (véase la figura 1). En primer lugar, Ire1p se une generalmente a una proteína de unión a cadena pesada de anticuerpo (BiP). Sin embargo, cuando se produce una proteína desplegada (UFP), BiP se une a tal UFP. Ire1p disociada de BiP se activa por medio de autofosforilación o dimerización, y presenta actividad endonucleasa. Aunque el gen HAC1 está generalmente en un estado inactivado, Ire1p que tiene actividad endonucleasa somete el ARNm transcrito del gen HAC1 a corte y empalme y produce Hac1p activa (Cell, 87: 405-413, 1996; Cell, 90: 1031-1039, 1997; the EMBO Journal, 18: 3119-3132, 1999). Tal Hac1p activa migra al núcleo, actúa como factor de transcripción y promueve la expresión de genes que codifican para diversas proteínas asociadas con una serie de reacciones denominadas UPR, por ejemplo, la adición de cadena de azúcar asociada, el plegamiento de proteínas, la degradación de proteínas (degradación asociada a ER: ERAD), la separación de proteínas, el metabolismo de lípidos, o similares (Cell, 101: 249-258, 2000).

En lo que respecta a un intento por mejorar la productividad de proteínas foráneas utilizando Hac1p activada, existe un ejemplo en el que el gen que codifica para Hac1p activada de una bacteria filamentosa, es decir, *Trichoderma reesei*, se introduce en *S. cerevisiae* para mejorar la secreción de una proteína heterogénea, α -amilasa, y una proteína endógena, es decir, invertasa, (Appl. Environ. Microbiol. 69: 2065-2072, 2003). Sin embargo, una única proteína, α -amilasa o invertasa, se ha conocido como proteína que se secreta fácilmente, y la mejora en la cantidad de producción es de tan sólo aproximadamente dos veces la cantidad de producción antes de la mejora. En los últimos años, se ha notificado que un fragmento de anticuerpo, Fab, se produjo usando *Pichia pastoris* en una cepa en la que se había introducido únicamente el gen HAC1 activado (Biotechnology and Bioengineering, 94: 353-361). La mejora de la productividad por medio de la introducción del gen HAC1 activado es de tan sólo aproximadamente 1,3 veces.

Al mismo tiempo, se conoce un ejemplo en el que únicamente se introduce el gen de RRBP1 (proteína de unión al ribosoma 1, receptor del ribosoma, proteína p180) derivada de mamífero en una cepa de levadura, de modo que se quintuplica la cantidad de proteínas (inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI)) secretadas (The Journal of Cell Biology, 146: 273-284, 1999). En primer lugar se aisló el gen de RRBP1 de un perro como gen que codifica para una proteína que se une al ribosoma (Nature, 346: 540-544, 1990). RRBP1 tiene un peso molecular de 180 kDa y una estructura especial tal, que una secuencia que comprende 10 residuos de aminoácido en el lado N-terminal se repite 54 veces y esta región se une a un ribosoma. Se sabe que RRBP1 está implicada en el aumento de la estructura de membrana y en la estabilización de ARNm (the Journal of Cell Biology, 130: 29-39, 1995; the Journal of Cell Biology, 156: 993-1001, 2002). Un ejemplo satisfactorio en el BPTI mencionado anteriormente tiene un peso molecular de 6.500, lo que representa un péptido muy pequeño. Tales resultados no pueden aplicarse siempre a otras proteínas de alto peso molecular o agregados de proteínas compuestos por diferentes proteínas tales como la cadena ligera o cadena pesada de anticuerpos.

Se sabe que el gen de proteína O-manosiltransferasa (PMT) está asociado con la formación de cadenas de O-azúcar que son inherentes a levaduras o mohos. El producto génico de PMT se localiza en la membrana del ER y tiene actividad de añadir manosa a un residuo hidroxilo de serina (Ser) o treonina (Thr) de una proteína secretora (a continuación en el presente documento, tal actividad se denominará actividad PMT). Algunas proteínas a las que se les han añadido cadenas de azúcar mediante PMT sirven como componentes primarios de la pared de cepa de levadura como manoproteínas. Se sabe que, cuando disminuye extremadamente la actividad PMT, la pared celular se vuelve frágil y el crecimiento de las células se ve afectado.

En lo que respecta a los genes de PMT, se conoce la existencia de siete genes, es decir, PMT1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, en *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Biochim. Biophys. Acta., 1426: 297-307, 1999). El gen de PMT se clasifica en tres tipos; es decir, la familia PMT1, la familia PMT2 y la familia PMT4. Se sabe que PMT1p y PMT2p presentan actividad con la formación de heterodímeros y que PMT4p presenta actividad con la formación de homodímeros. Debido a la homología de secuencia de aminoácidos y similares, se dice que PMT5p es complementaria a PMT1p, y que PMT3p es complementaria a PMT2p. PMT6p es altamente homóloga a PMT2p y PMT3p, aunque no se conoce el tipo de compuesto que presenta actividad. Además, se sabe que cada proteína PMT tiene selectividad para una proteína sustrato.

Como genes de PMT de otros tipos de levadura de gemación, se han descubierto cinco genes altamente homólogos a los genes de PMT1, 2, 4, 5 y 6 de *S. cerevisiae* en el caso de *Candida albicans* (Mol. Microbiol., 55: 546-560, 2005), un gen altamente homólogo a al menos el gen de PMT4 de *S. cerevisiae* en el caso de *Cryptococcus neoformans* (Eukaryot. Cell, 6: 222-234, 2007) y tres genes (oma1, 2 y 4) altamente homólogos a los genes de PMT1, 2 y 4 en el caso de levadura de fisión, es decir, *Schizosaccharomyces pombe* (Mol. Microbiol., 57: 156-170, 2005). Además, se observó la existencia de cinco genes que son altamente homólogos a los genes de PMT1, 2, 4, 5 y 6 genes de *S. cerevisiae* en una levadura asimiladora de metanol, *Ogataea minuta* (*O. minuta*).

También se encontró el gen de PMT en moho. El gen de PmtA y otros dos genes se encuentran en *Aspergillus nidulans*, y el gen de Pmt1, que es altamente homólogo al gen de PMT2 de *S. cerevisiae*, se encuentra en *Trichoderma reesei* (Curr. Genet., 43: 11-16, 2003).

Se dice que la actividad PMT tiene los efectos de actuar sobre una región hidrófoba de péptidos, potenciando la hidrofiliidad de péptidos e inhibiendo la agregación de péptidos en la cavidad del ER. Sin embargo, cuando se producen proteínas foráneas, la actividad PMT añade ocasionalmente una cadena de O-azúcar innecesaria, lo que puede dar como resultado una formación insuficiente de compuestos de proteína, una actividad reducida, o similares. Para proteínas multiméricas, tales como anticuerpos, en particular, puede inhibirse la formación de agregados de las mismas (que se refiere a la formación de agregados de cadena ligera y de cadena pesada, en el caso de anticuerpos).

La patente JP n.º 3630424 y la publicación de patente JP (kohyo) n.º H08-509867 (A) (1996) proponen un método para producir una proteína recombinante por medio de la inhibición de la adición de cadena de O-azúcar que resulta de la modificación del gen de PMT. Sin embargo, estos documentos de patente no describen la formación de agregados de una cadena ligera y una cadena pesada de anticuerpo.

Un ejemplo en el que se usan cepas deficientes en gen de PMT1 y PMT2 asociadas con formación de cadenas de O-azúcar para inhibir la adición de cadenas de O-azúcar para fomentar la agregación de moléculas de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo aproximadamente 1,5 veces se proporciona en el documento WO 2002/046437. Este dato es el resultado de un experimento de marcaje de pulso usando un aminoácido marcado con RI, pero no es el resultado de observar todo el proceso de cultivo. Además, se reduce adicionalmente el grado de inhibición de la adición de cadena de azúcar y se deteriora la productividad de anticuerpos.

Aunque el gen HAC1 induce UPR, se sabe que algunos de los genes inducibles por UPR son genes de PMT que añaden cadenas de O-azúcar específicas de levadura (Cell, 101: 249-258, 2000). Por consiguiente, la introducción del gen HAC1 puede no ser suficiente para producir proteínas multiméricas de alta calidad, tales como anticuerpos.

Tal como se describió anteriormente, se han propuesto una variedad de métodos como métodos para la producción secretora de alto nivel de proteínas en levadura. Sin embargo, sustancialmente ningún método es suficiente a nivel práctico. Aún no se ha descubierto un método para producir de manera eficaz proteínas, en particular, proteínas de alto peso molecular o agregados de proteínas, incluyendo anticuerpos. Cuando se introduce un rasgo en una célula por medio de introducción de genes, destrucción de genes, o similares, en general, la célula experimentará una cierta clase de estrés. Por tanto, puede proporcionarse otra modificación o producirse una acción opuesta. Cuando se pretende expresión de proteínas de alto nivel, por ejemplo, se activa la UPR, lo que da como resultado un elemento negativo, tal como una modificación de cadena de azúcar, una degradación mediante un proteasoma o una degradación asociada a ER (ERAD). Por consiguiente, la producción secretora de alto nivel de proteínas que tienen estructuras complicadas, tales como anticuerpos, no se consigue mediante un único proceso, tal como introducción de un único gen. Además, la mera combinación de varios métodos convencionales no siempre dará efectos sinérgicos.

Por consiguiente, la presente invención pretende proporcionar un método para la producción secretora de alto nivel de proteínas y, más particularmente, proteínas que tienen estructuras complicadas, tales como anticuerpos, en levadura u otras células huésped.

Descripción de la invención

Los presentes inventores han realizado estudios concentrados con el fin de alcanzar el objeto anterior. Como resultado, descubrieron que genes asociados con la producción secretora de alto nivel de proteínas, es decir, el gen HAC1 activado (la proteína Hac1, que es un factor de transcripción inducido mediante el corte y empalme de ARNm mediante Ire1p tras la aplicación de estrés del retículo endoplásmico) y el gen de RRP1 (proteína de unión al ribosoma 1, receptor del ribosoma, proteína p180), se coexpresan en una levadura asimiladora de metanol, *Ogataea minuta*, y que puede aumentarse la cantidad de producción secretora de anticuerpos aproximadamente 10 veces. Además, descubrieron que puede inhibirse la actividad de la proteína O-manosiltransferasa (PMT) asociada con la adición de cadena de O-azúcar a una proteína específica de levadura, que inhibe la agregación de heteromultímeros tales como anticuerpos, para mejorar adicionalmente la productividad.

Además, descubrieron que puede expresarse el gen asociado con producción secretora de alto nivel de una proteína, es decir, el gen HAC1 activado, y que puede inhibirse la actividad de proteína O-manosiltransferasa (PMT) asociada con adición de cadena de O-azúcar a una proteína específica de levadura, que inhibe la agregación de heteromultímeros tales como anticuerpos, para realizar una mejora sinérgica en la productividad.

La presente invención se ha completado con tales hallazgos (véase la figura 2).

Específicamente, la presente invención incluye lo siguiente:

[1] Una célula huésped de levadura transformada que comprende un ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura y un gen de RRP1 de humano o perro, en la que la célula huésped transformada comprende un gen que codifica para una proteína heteromultimérica foránea, en la que la proteína heteromultimérica es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

[2] La célula huésped transformada según [1], que comprende dicho ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura seleccionado de (a) o (b) a continuación:

(a) un gen que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23;

(b) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la respuesta de proteínas desplegadas (UPR), en la que varios aminoácidos son 20 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, y más preferiblemente 5 o menos.

[3] La célula transformada según [1] que comprende dicho ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura seleccionado de (i) o (j) a continuación:

(i) un gen que codifica para la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae* o *Trichoderma reesei*,

(j) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae* o *Trichoderma reesei* mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR, en la que varios aminoácidos son 20 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, y más preferiblemente 5 o menos.

[4] La célula huésped transformada según [1] que comprende dicho ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura seleccionado de (m) o (n) a continuación:

(m) un gen que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70;

(n) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR, en la que varios aminoácidos son 20 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, y más preferiblemente 5 o menos.

[5] La célula huésped transformada según uno cualquiera de [1]-[4], en la que la levadura es una levadura asimiladora de metanol.

[6] La célula huésped transformada según [5], en la que la levadura asimiladora de metanol es *Ogataea minuta*.

[7] La célula huésped transformada según uno cualquiera de [1]-[4], en la que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

[8] La célula huésped transformada según uno cualquiera de [1]-[7], en la que el gen de PMT (proteína O-manosiltransferasa) está inactivado mediante inserción.

[9] Un método para producir una proteína que comprende cultivar la célula huésped transformada según uno cualquiera de [1] a [8] en un medio y tomar una muestra de la proteína heteromultimérica del producto de cultivo.

[10] El método según [9], en el que cultivo se lleva a cabo en condiciones en las que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT).

[11] El método según [10], en el que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) con la adición de un inhibidor de la actividad PMT al medio.

[12] El método según [10], en el que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) inactivando mediante inserción el gen de PMT en la célula huésped.

[13] El método para producir una proteína según [10], en el que se inhibe la síntesis de cadena de O-azúcar inactivando mediante inserción el gen de PMT y añadiendo el inhibidor de la actividad PMT al medio.

[14] El método para producir una proteína según [11] o [13], en el que el inhibidor de la actividad PMT es ácido 5-

[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metilen]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinacético o ácido {(5Z)-4-oxo-5-3-(1-feniletoxi)-4-(2-feniletoxi)benciliden]-2-tioxo-1,3-tiazolidin-3-il}acético.

[15] Un método para producir una célula huésped de levadura transformada que comprende las etapas de:

(A) introducir un ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura en una célula huésped de levadura; y

(B) introducir el gen de RRBP1 en una célula huésped de levadura, en el que dicho ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura es cualquiera de los siguientes genes (1), (2) o (3):

(1) el gen seleccionado de (a) o (b) a continuación:

(a) un gen que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23;

(b) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR, en el que varios aminoácidos son 20 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, y más preferiblemente 5 o menos;

(2) un gen que codifica para la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae* o *Trichoderma reesei*;

(3) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae* o *Trichoderma reesei* mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR, en el que varios aminoácidos son 20 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, y más preferiblemente 5 o menos;

y en el que el gen de RRBP1 es un gen que codifica para la RRBP1 de humano o perro, y en el que la célula huésped transformada comprende un gen que codifica para una proteína heteromultimérica foránea introducido en la misma, en el que la proteína heteromultimérica es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

[16] El método según [15], en el que la levadura es una levadura asimiladora de metanol.

[17] El método según [16], en el que la levadura asimiladora de metanol es *Ogataea minuta*.

[18] El método según [15], en el que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

También se divulgan en el presente documento:

[1] Una célula huésped transformada que comprende el gen HAC1 activado y el gen de RRBP1.

[2] La célula huésped transformada según [1], que comprende el gen HAC1 activado (1) y el gen de RRBP1 (2) a continuación:

(1) el gen HAC1 activado seleccionado de entre (a) y (d) a continuación:

(a) un gen que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23;

(b) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 y tiene la función de activar la respuesta de proteínas desplegadas (UPR);

(c) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR; y

(d) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 22 o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma y codifica para una proteína que tiene la función de activar la UPR; y

(2) el gen de RRBP1 seleccionado de entre (e) y (h) a continuación:

(e) un gen que codifica para RRP1 derivada de humano o perro;

(f) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de RRP1 derivada de humano o perro y tiene actividad de unión al ribosoma;

(g) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de RRP1 derivada de humano o perro mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene actividad de unión al ribosoma; y

(h) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos del gen de RRP1 derivada de humano o perro o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma y codifica para una proteína que tiene actividad de unión al ribosoma.

[3] La célula transformada según [1] que comprende el gen HAC1 activado (1) y el gen de RRP1 (2) a continuación:

(1) el gen HAC1 activado seleccionado de entre (i) y (l) a continuación:

(i) un gen que codifica para la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei* o *Aspergillus nidulans*;

(j) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei* o *Aspergillus nidulans* y tiene la función de activar la UPR;

(k) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei* o *Aspergillus nidulans* mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR; y

(l) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei* o *Aspergillus nidulans* o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma y codifica para una proteína que tiene la función de activar la UPR; y

(2) el gen de RRP1 seleccionado de entre (e) y (h) a continuación:

(e) un gen que codifica para RRP1 derivada de humano o perro;

(f) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de RRP1 derivada de humano o perro y tiene actividad de unión al ribosoma;

(g) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de RRP1 derivada de humano o perro mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene actividad de unión al ribosoma; y

(h) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos del gen de RRP1 derivada de humano o perro o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma y codifica para una proteína que tiene actividad de unión al ribosoma.

[4] La célula huésped transformada según cualquiera de [1] a [3], en la que la célula huésped es una célula eucariota.

[5] La célula huésped transformada según [4], en la que la célula eucariota es de levadura.

[6] La célula huésped transformada según [5], en la que la levadura es una levadura asimiladora de metanol.

[7] La célula huésped transformada según [6], en la que la levadura asimiladora de metanol es *Ogataea minuta*.

[8] La célula huésped transformada según [5], en la que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

[9] La célula huésped transformada según cualquiera de [1] a [8], que comprende un gen que codifica para una proteína foránea introducido en la misma.

- [10] La célula huésped transformada según [9], en la que la proteína foránea es una proteína multimérica.
- 5 [11] La célula huésped transformada según [10], en la que la proteína multimérica es un heteromultímero.
- [12] La célula huésped transformada según [11], en la que el heteromultímero es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.
- 10 [13] Un método para producir una proteína que comprende cultivar la célula huésped transformada según cualquiera de [9] a [12] en un medio y tomar una muestra de una proteína diana del producto de cultivo.
- [14] El método según [13], en el que cultivo se lleva a cabo en condiciones en las que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT).
- 15 [15] El método según [14], en el que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) con la adición de un inhibidor de la actividad PMT al medio.
- [16] Un gen que codifica para la proteína HAC1 activada de una levadura asimiladora de metanol.
- 20 [17] Un gen seleccionado de entre (a) y (d) a continuación:
- (a) un gen que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23;
- 25 (b) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 y tiene la función de activar la respuesta de proteínas desplegadas (UPR);
- 30 (c) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR; y
- (d) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 22 o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma y codifica para una proteína que tiene la función de activar la UPR.
- 35 [18] Un vector de expresión que comprende el gen según [17].
- [19] El vector de expresión según [18], que es pOMexPGHy/Hac1.
- 40 [20] Un vector de expresión que comprende el gen HAC1 activado y el gen de RRB1.
- [21] El vector de expresión según [20], en el que el gen HAC1 activado es el gen según [17].
- 45 [22] El vector de expresión según [20], en el que el gen HAC1 activado es un gen que codifica para la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei* o *Aspergillus nidulans* o un gen homólogo del mismo.
- [23] El vector según [20], que es YEp351GAP-II-aHAC1/p180.
- 50 [24] El vector de expresión según [20], en el que el gen de RRB1 es el gen de RRB1 derivada de humano o perro o un gen homólogo del mismo.
- [25] Una célula huésped transformada en la que se ha introducido el vector de expresión según cualquiera de [18] a [24].
- 55 [26] Una célula huésped transformada en la que se ha introducido un vector de expresión que comprende el gen HAC1 activado y un vector de expresión que comprende el gen de RRB1.
- [27] La célula huésped transformada según [26], en la que el vector de expresión que comprende el gen HAC1 activado es el vector de expresión según [18] o [19].
- 60 [28] La célula huésped transformada según [26], en la que el gen HAC1 activado es un gen que codifica para la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei* o *Aspergillus nidulans* o un gen homólogo del mismo.
- 65 [29] La célula transformada según [26], en la que el gen de RRB1 es el gen de RRB1 derivada de humano o perro

o un gen homólogo del mismo.

[30] Un método para producir una célula huésped transformada que comprende las etapas de:

- 5 (A) introducir el gen HAC1 activado en una célula huésped; y
- (B) introducir el gen de RRBP1 en una célula huésped.

[31] El método según [30], en el que el gen HAC1 activado es cualquiera de los siguientes genes:

- 10 (1) el gen según [17];
- (2) un gen que codifica para la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei* o *Aspergillus nidulans*;
- 15 (3) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei* o *Aspergillus nidulans* y tiene la función de activar la UPR;
- 20 (4) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei* o *Aspergillus nidulans* mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR; y
- 25 (5) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica para la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei* o *Aspergillus nidulans* o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma y codifica para una proteína que tiene la función de activar la UPR.

30 [32] El método según [30], en el que el gen de RRBP1 es cualquiera de los siguientes genes:

- (1) un gen que codifica para la RRBP1 derivada de humano o perro;
- 35 (2) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de RRBP1 derivada de humano o perro y tiene actividad de unión al ribosoma;
- (3) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de RRBP1 derivada de humano o perro mediante delección, sustitución y/o
- 40 adición de uno o varios aminoácidos y tiene actividad de unión al ribosoma; y
- (4) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos del gen de RRBP1 derivada de humano o perro o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma y codifica para una proteína que tiene actividad de unión al ribosoma.

45 [33] El método según cualquiera de [30] a [32], en el que la célula huésped es una célula eucariota.

[34] El método según [33], en el que la célula eucariota es de levadura.

50 [35] El método según [34], en el que la levadura es una levadura asimiladora de metanol.

[36] El método según [35], en el que la levadura asimiladora de metanol es *Ogataea minuta*.

[37] El método según [34], en el que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

55 [38] Un gen seleccionado de entre (a) y (d) a continuación:

- (a) un gen que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70;
- 60 (b) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70 y tiene la función de activar la respuesta de proteínas desplegadas (UPR);
- 65 (c) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o

varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR; y

(d) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 69 o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma y codifica para una proteína que tiene la función de activar la UPR.

[39] Un vector de expresión que comprende el gen según [38].

[40] El vector de expresión según [39], que es pOMexPGHy/PpHac1.

[41] Un método para producir una proteína que comprende cultivar una célula transformada en la que se han introducido el gen HAC1 activado y/o el gen de RBP1 y un gen que codifica para una proteína foránea en un medio en condiciones en las que se inhibe la síntesis de cadena de O-azúcar y tomar una muestra de una proteína diana del producto de cultivo.

[42] El método para producir una proteína según [41], en el que se inhibe la síntesis de cadena de O-azúcar inactivando mediante inserción el gen de PMT.

[43] El método para producir una proteína según [41], en el que se inhibe la síntesis de cadena de O-azúcar añadiendo el inhibidor de la actividad PMT al medio.

[44] El método para producir una proteína según [41], en el que se inhibe la síntesis de cadena de O-azúcar inactivando mediante inserción el gen de PMT y añadiendo el inhibidor de la actividad PMT al medio.

[45] El método para producir una proteína según [43] o [44], en el que el inhibidor de la actividad PMT es ácido 5-[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metilen]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinacético o ácido {(5Z)-4-oxo-5-[3-(1-feniletoxi)-4-(2-feniletoxi)benciliden]-2-tioxo-1,3-tiazolidin-3-il}acético.

[46] Una célula huésped transformada con el gen de PMT inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 activado introducido en la misma.

[47] La célula transformada según [46], en la que la célula huésped es *Ogataea minuta*.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un método para obtener el gen HAC1 activado de *O. minuta* y la estructura del mismo.

La figura 2 muestra esquemáticamente el alcance técnico de la presente divulgación.

La figura 3 muestra las estructuras de un vector de expresión para el gen HAC1 activado de *O. minuta* (pOMexPGHy/Hac1), un vector de expresión para el gen de RBP1 de humano (pOMexGP1A/p180) y un vector de expresión para el gen de anticuerpo humano (pOMexGAT-G/Ab).

La figura 4 muestra los resultados del análisis de tipo Western de anticuerpos secretados en el sobrenadante de cultivo de una cepa de levadura productora de anticuerpos en la que se han introducido el gen HAC1 activado de *O. minuta* y el gen de RBP1 de humano.

La figura 5 muestra un gráfico que muestra los resultados de medir la cantidad de anticuerpos secretados de una cepa de levadura productora de anticuerpos en la que se han introducido el gen HAC1 activado de *O. minuta* y el gen de RBP1 de humano.

La figura 6 muestra los resultados del análisis de tipo Western de anticuerpos secretados en el sobrenadante de cultivo de una cepa de levadura productora de anticuerpos en la que se han introducido el gen HAC1 activado de *O. minuta* y el gen de RBP1 de humano, que se han cultivado en condiciones en las que se inhibe la formación de cadena de O-azúcar.

La figura 7 muestra un vector de expresión para HAC1 activo de *S. cerevisiae* (YE351GAP-II-aHAC1), un vector de expresión para el gen de RBP1 de humano (YE351GAP-II-p180), un vector de expresión para el gen de anticuerpo humano (YE352 GAP-II-alfHc/alfLc) y un vector de coexpresión para el gen HAC1 activado y el gen de RBP1 (YE351GAPII-aHAC1/p180).

La figura 8A muestra un gráfico que muestra los resultados de una comparación de las capacidades para la producción secretora de anticuerpos de cepas de levadura productoras de anticuerpos en las que se han introducido un vector de expresión para el gen HAC1 activado de *S. cerevisiae* y un vector de expresión para el gen de RBP1 de humano. La figura 8B muestra un gráfico que muestra los resultados de una comparación de las capacidades para la producción secretora de anticuerpos de cepas de levadura productoras de anticuerpos en las que se han

introducido un vector de expresión para el gen HAC1 activado de *S. cerevisiae* y un vector de expresión para el gen de RBP1 de humano en condiciones en las que se inhibe la formación de cadena de O-azúcar. La figura 8C muestra un gráfico que muestra los resultados de una comparación de las capacidades para la producción secretora de anticuerpos (valores absolutos) de cepas de levadura productoras de anticuerpos en las que se han introducido un vector de expresión para el gen HAC1 activado de *S. cerevisiae* y un vector de expresión para el gen de RBP1 de humano con o sin la adición de un inhibidor de PMT.

La figura 9 muestra los resultados del análisis de tipo Western de producción de anticuerpos en cepas productoras de anticuerpos en las que se ha introducido un gen de anticuerpo sintético, en el que se han sustituido codones.

La figura 10 muestra los resultados del análisis de tipo Western de sobrenadantes de cultivo de cepas productoras de anticuerpos en las que se han introducido los genes HAC1 activados derivados de cepas de levadura.

La figura 11 muestra la cantidad de producción secretora de anticuerpos de cepas productoras de anticuerpos en las que se han introducido los genes HAC1 activados derivados de cepas de levadura.

La figura 12 muestra los resultados del análisis de tipo Western de sobrenadantes de cultivo de cepas productoras de anticuerpos con el gen de PMT1 o gen de PMT2 inactivado mediante inserción y aquellas de las cepas productoras de anticuerpos en las que se han introducido los genes HAC1 activados.

La figura 13 muestra la cantidad de producción secretora de anticuerpos de cepas productoras de anticuerpos con el gen de PMT1 o gen de PMT2 inactivado mediante inserción y aquellas de las cepas productoras de anticuerpos en las que se han introducido los genes HAC1 activados.

La figura 14 muestra los resultados del análisis de tipo Western de sobrenadantes de cultivo de cepas productoras de anticuerpos con el gen de PMT4 inactivado mediante inserción y aquellas de las cepas productoras de anticuerpos en las que se han introducido los genes HAC1 activados.

La figura 15 muestra la cantidad de producción secretora de anticuerpos de cepas productoras de anticuerpos con el gen de PMT4 inactivado mediante inserción y cepas productoras de anticuerpos en las que se han introducido los genes HAC1 activados.

La figura 16A muestra los resultados del análisis de tipo Western de sobrenadantes de cultivo de las cepas productoras de anticuerpos deficientes en gen de PMT5 o gen de PMT6. La figura 16B muestra la cantidad de producción secretora de anticuerpos de las cepas productoras de anticuerpos deficientes en gen de PMT5 o gen de PMT6.

La figura 17 muestra los resultados del análisis de tipo Western de sobrenadantes de cultivo obtenidos cultivando cepas productoras de anticuerpos con el gen de PMT2 o PMT4 inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 activado introducido en la misma con la adición de un inhibidor de PMT (1c).

La figura 18A muestra la cantidad de producción secretora de anticuerpos en sobrenadantes de cultivo obtenidos cultivando cepas productoras de anticuerpos con el gen de PMT2 inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 activado introducido en la misma con la adición de un inhibidor de PMT (1c). La figura 18B muestra la cantidad de producción secretora de anticuerpos en un sobrenadante de cultivo obtenido cultivando cepas productoras de anticuerpos con el gen de PMT4 inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 activado introducido en la misma con la adición de un inhibidor de PMT (1c).

La figura 19 muestra los resultados del análisis de tipo Western de sobrenadantes de cultivo, que se han cultivado con la adición de una variedad de inhibidores de PMT (derivados de ácido rodanin-3-acético).

La figura 20 muestra la cantidad de producción secretora de anticuerpos en sobrenadantes de cultivo, que se han cultivado con la adición de una variedad de inhibidores de PMT (derivados de ácido rodanin-3-acético).

A continuación en el presente documento se describe en detalle la presente invención. Esta solicitud de patente reivindica la prioridad de la solicitud de patente japonesa n.º 2006-136993 presentada el 16 de mayo de 2006.

En el presente documento se divulga que una combinación de (A) introducción de un gen asociado con producción secretora de alto nivel de una proteína y (B) inhibición de adición de cadena de O-azúcar inherente a levadura (y moho) puede producir efectos sinérgicos en lo que respecta a la producción secretora de alto nivel de una proteína.

A continuación en el presente documento se describe en detalle la presente divulgación.

La presente divulgación proporciona un gen usado para la producción secretora de alto nivel de una proteína, un vector de expresión que comprende tal gen, una célula huésped transformada en la que se ha introducido tal vector de expresión, y un método para producir una proteína usando tal célula huésped transformada.

1. Gen usado para la producción secretora de alto nivel de una proteína

(1) Gen HAC1

En la presente invención, un gen usado para la producción secretora de alto nivel de una proteína es el gen HAC1 activado. El gen HAC1 está presente como gen HAC1 inactivo en el genoma; sin embargo, el ARNm transcrito por el gen HAC1 tras aplicación de estrés del retículo endoplásmico se somete a corte y empalme mediante Ire1p y se convierte en ARNm que codifica para un factor de transcripción, la proteína HAC1 (Hac1p). Entonces se activa la respuesta de proteínas desplegadas (UPR) mediante la Hac1p traducida. En la presente invención, el gen HAC1 activado se define como ADNc que codifica para la proteína HAC1 (Hac1p) (es decir, es complementario a ARNm).

Por consiguiente, el gen HAC1 activado se usa según la invención. También se divulga en el presente documento que también puede alcanzarse un cierto grado de efectos por medio de la introducción del gen HAC1 inactivado.

A continuación en el presente documento se describe el gen HAC1 activado que codifica para Hac1p que realmente hace que funcione la UPR. HAC1p está constituida por, desde el extremo N-terminal, un dominio de unión a ADN que está altamente conservado en organismos, la región de cremallera de leucina, y una región activa desconocida en la que se somete a corte y empalme ARNm y se añade de nuevo mediante Ire1p en el extremo C-terminal.

El gen HAC1 activado usado en la presente invención no está limitado particularmente, siempre que tal gen codifique para la proteína HAC1 activada. Los ejemplos incluyen ADN que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 derivada de *Ogataea minuta* (*O. minuta*), que se obtuvo recientemente en la presente invención, y ADN que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos derivada de *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) mostrada en SEQ ID NO: 70. Puede emplearse un ADN funcionalmente equivalente homólogo a los mismos.

El término "ADN homólogos" se refiere a, por ejemplo, un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 ó 70 y tiene la función de activar la respuesta de proteínas desplegadas (UPR), un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 ó 70 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR, y un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 22 ó 69 o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma y codifica para una proteína que tiene la función de activar la UPR.

El término "una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 ó 70" se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 95%. La búsqueda de homología entre proteínas puede llevarse a cabo con el uso de, por ejemplo, la base de datos de ADN de Japón (DDBJ) por medio de FASTA, BLAST u otros programas.

El número indicado mediante el término "varios" en lo mencionado anteriormente "uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 ó 70" no está limitado particularmente. Por ejemplo, el término "varios" se refiere aproximadamente a 20 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, y más preferiblemente 5 o menos.

En las "condiciones rigurosas" mencionadas anteriormente, se forma un denominado híbrido específico, pero no se forma un híbrido no específico. En tales condiciones, por ejemplo, hebras complementarias de un ADN altamente homólogo, es decir, ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90% y más preferiblemente al menos el 95% con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 22 ó 69 experimentan hibridación, pero hebras complementarias de ADN que tienen niveles de homología menores no experimentarán hibridación. Más específicamente, la concentración de sodio es de 150 a 900 mM, y preferiblemente de 600 a 900 mM, y la temperatura es de 60°C a 68°C, y preferiblemente de 65°C.

La mutación mencionada anteriormente, tal como delección, sustitución y/o adición, puede introducirse por medio de una técnica conocida en la materia, tal como el método de Kunkel o el método de dúplex con huecos, o una técnica de acuerdo con las mismas. Por ejemplo, pueden usarse kits de mutagénesis que utilizan mutagénesis dirigida al sitio, tales como un kit Mutant-K (Takara Bio), Mutant-G (Takara Bio) o uno de la serie de mutagénesis *in vitro* LA PCR (Takara Bio).

El término "función de activar la UPR" se refiere a la función de activar las reacciones de defensa de retículo endoplásmico (ER) frente a la acumulación de proteínas desplegadas (por ejemplo, inhibición de la transcripción, aceleración del plegamiento inducida mediante chaperonas moleculares, degradación de proteína desnaturalizada, o muerte celular provocada por apoptosis). La función de activar la UPR es sustancialmente equivalente a la función

de un gen que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 ó 70.

El gen HAC1 activado puede ser un gen de *O. minuta*, *P. pastoris* u otra levadura asimiladora de metanol. Los ejemplos de los mismos incluyen genes que codifican para proteínas HAC1 activadas derivadas de *Hansenulla polymorpha* (*Pichia angusta*), *Pichia methanolica* y *Candida boidinii*. Además, puede ser un gen HAC1 activado derivado de otra especie de organismo, tales como otros tipos de levadura o moho. Los ejemplos de los mismos incluyen un gen (YFL031W, número de registro de GenBank: ADN sometido a corte y empalme de D26506 mediante Ire1p) que codifica para la proteína HAC1 activada (número de registro de GenBank: NP_116622) derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), un gen (número de registro de GenBank: AJ413272) que codifica para la proteína HAC1 activada (número de registro de GenBank: CAC88374) derivada de *Trichoderma reesei* y un gen (número de registro de GenBank: AJ413273) que codifica para la proteína HacA activa (número de registro de GenBank: CAC88375) derivada de *Aspergillus nidulans*.

Las secuencias de nucleótidos de genes que codifican para las proteínas HAC1 activadas derivadas de *S. cerevisiae*, *Trichoderma reesei* y *Aspergillus nidulans* se muestran en las SEQ ID NO: 39, 41 y 43, y las secuencias de aminoácidos correspondientes se muestran en las SEQ ID NO: 40, 42 y 44.

Los genes HAC1 activados derivados de *Ogataea minuta* y *Pichia pastoris* aislados en el presente documento fueron los primeros genes aislados de cepas de levadura distintas de *Saccharomyces cerevisiae*. Esto sugiere con fuerza la presencia del gen de interés generalmente en cepas de levadura, tales como cepas de levadura asimiladora de metanol. Por consiguiente, estos genes están dentro del alcance de los genes HAC1 activados usados en la presente invención.

Además puede usarse un factor de transcripción que activa la UPR como alternativa al gen HAC1 activado mencionado anteriormente. Un ejemplo es un gen que se activa tras corte y empalme, mediante Ire1p, del gen XBP-1 (por ejemplo, un gen derivado de humano con número de registro de GenBank: NM_005080), que es un homólogo de HAC1 derivado de células animales u otras especies. La activación artificial mediante Ire1, que también activa HAC1, también corresponde a la activación de UPR. Por consiguiente, se considera que es equivalente a la introducción del gen HAC1 activado. Además, se considera que la expresión forzada del gen HAC1 no activado produce efectos equivalentes al caso de la introducción de HAC1 activado tal como se describió anteriormente.

El gen HAC1 activado puede obtenerse mediante cualquier método, siempre que se induzca una UPR. Por ejemplo, puede obtenerse ARNm de una célula en la que genes que codifican para proteínas que son difíciles de plegar se expresan a alto nivel o células que se tratan con un inhibidor de modificación de cadena de azúcar, tal como tunicamicina, un agente redox, tal como DTT o peróxido de hidrógeno, o un inductor de UPR, tras lo cual se sintetiza ADNc a partir del mismo. Además, puede obtenerse ARNm de una secuencia que ya se ha divulgado sintetizando una parte de o la longitud completa de la misma con el uso de un sintetizador de ADN.

(2) Gen de RRBP1

En la presente invención, el otro gen usado para la producción secretora de alto nivel de una proteína es el gen de RRBP1. El gen de RRBP1 es un gen que codifica para una proteína denominada proteína de unión al ribosoma 1, y también se denomina gen hES, ES130, ES/130 o DKFZp586A1420. El gen de RRBP1 de mamífero está compuesto por la región transmembrana N-terminal, una región posterior que es rica en aminoácidos básicos, 54 repeticiones de una secuencia que comprende 10 residuos de aminoácido, y la región C-terminal.

El gen de RRBP1 usado en la presente invención no está limitado particularmente, siempre que codifique para la proteína de unión al ribosoma 1. Los ejemplos incluyen el gen de RRBP1 derivada de humano (que codifica para la proteína KIAA1398; número de registro de GenBank: AB037819) y el gen de RRBP1 derivada de perro (que codifica para el receptor del ribosoma p180; número de registro de GenBank: X87224). Mientras sea funcionalmente equivalente a los genes mencionados anteriormente, puede usarse un gen homólogo del mismo. Las secuencias de nucleótidos del gen de RRBP1 derivada de humano y el gen de RRBP1 derivada de perro se muestran en las SEQ ID NO: 45 y 47, y las secuencias de aminoácidos correspondientes se muestran en las SEQ ID NO: 46 y 48.

Los ejemplos de genes homólogos incluyen: un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de RRBP1 derivada de humano o perro y tiene actividad de unión al ribosoma; un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de RRBP1 derivada de humano o perro mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene actividad de unión al ribosoma; y un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos del gen de RRBP1 derivada de humano o perro o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma y codifica para una proteína que tiene actividad de unión al ribosoma. El grado de homología, las condiciones rigurosas y un método de mutagénesis son tal como se describieron anteriormente.

Los ejemplos específicos de tales genes homólogos incluyen genes de RRBP1 derivados de ratones (n.^{os} de

registro: XM_622097, XM_91338 y XM_991888), una rata (n.º de registro XM_230637), una *Xenopus* (n.º de registro: NM_001005671) y un pez cebra (danio cebra) (n.º de registro: NM_199431).

5 El gen de RRBP1 también puede obtenerse mediante una técnica conocida generalmente. Por ejemplo, puede prepararse ARNm a partir de una célula en la que se expresa el gen de RRBP1, y puede sintetizarse adicionalmente ADNc.

10 En la presente divulgación, el gen mencionado anteriormente usado para la producción secretora de alto nivel de una proteína y un gen que codifica para una proteína foránea que es la diana de la producción secretora de alto nivel descrita más adelante (a continuación en el presente documento estos genes se denominan "genes diana") pueden obtenerse mediante una técnica general de preparación de ARNm y síntesis de ADNc usando transcriptasa inversa. Como ejemplo de la técnica general mencionada anteriormente, una biblioteca de ADNc derivada de una célula o un tejido en el que se expresa el gen diana se somete a examen con el uso de una sonda de ADN sintetizada a partir de un fragmento del gen diana, para aislar el gen de interés. Puede prepararse ARNm mediante una técnica usada generalmente en la materia. Por ejemplo, la célula o el tejido mencionado anteriormente puede tratarse con un reactivo de guanidina o un reactivo de fenol para obtener ARN total, tras lo cual se obtiene entonces poli (A)+ ARN (ARNm) por medio del método de columna de afinidad usando columnas de oligo(dT)-celulosa o poli-U-Sepharose usando Sepharose 2B como portador o una técnica discontinua. Además, puede fraccionarse poli (A)+ ARN por medio de centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa o por medio de otros medios. Posteriormente se usa el ARNm obtenido como molde para sintetizar ADNc monocatenario usando cebadores oligodT y transcriptasa inversa, se sintetiza ADNc bicatenario a partir del ADNc monocatenario usando ADN sintetasa I, ADN ligasa, ARNasaH, y similares. Al ADNc bicatenario sintetizado se le proporcionan extremos romos usando T4 ADN sintetasa, se somete al ligamiento de un adaptador (por ejemplo, un adaptador de *EcoRI*), fosforilación o similar, se incorpora en un fago λ , tal como λ gt11, y entonces se empaqueta *in vitro* para preparar una biblioteca de ADNc. 25 Además de un fago λ , pueden usarse vectores de plásmido para preparar una biblioteca de ADNc. Después de esto, puede seleccionarse una cepa que tiene el ADN de interés (es decir, un clon positivo) de la biblioteca de ADNc.

30 Cuando se aísla el gen diana de ADN genómico o cuando se aísla un fragmento que contiene una región de promotor y una región de terminador, se extrae ADN genómico de una cepa celular de un organismo fuente, y se selecciona el gen diana según una técnica común (Molecular Cloning, 1989; Methods in enzymology 194, 1991). El ADN genómico puede extraerse mediante el método de Cryer *et al.* (Methods in Cell Biology, 12, 39-44, 1975) o el método de P. Philippsen *et al.* (Methods Enzymol., 194, 169-182, 1991), por ejemplo. Cuando la fuente es una cepa de levadura, por ejemplo, se prepara un protoplasto de levadura y entonces se somete el protoplasto de levadura a una técnica convencional, tal como las conocidas técnicas de extracción de ADN, técnicas de precipitación con alcohol tras la eliminación de residuos celulares a una alta concentración de sal, o técnicas de precipitación con alcohol tras extracción con fenol o cloroformo. 35

40 El gen diana puede obtenerse, por ejemplo, mediante PCR (PCR Technology, Henry A. Erlich, Stockton Press, 1989). Cuando se amplifica el gen diana por medio de PCR, se usa como cebador un ADN monocatenario de 20 meros a 30 meros sintetizado y se usa ADN genómico como molde. Se confirma la secuencia de nucleótidos del gen amplificado y entonces se usa.

45 Puede obtenerse un fragmento que contiene un gen diana cuya secuencia es desconocida (a) preparando una biblioteca génica mediante una técnica convencional y (b) seleccionando un clon de interés a partir de la biblioteca génica resultante que va a amplificarse. Puede prepararse una biblioteca génica obteniendo ADN cromosómico de una línea celular de un organismo fuente por medio de una técnica convencional, digiriendo parcialmente el ADN cromosómico con enzimas de restricción adecuadas para fragmentación, ligando el fragmento resultante a un vector adecuado e introduciendo entonces el vector en una célula huésped adecuada. Alternativamente, puede extraerse ARNm de una célula, puede sintetizarse ADNc a partir del mismo, puede ligarse el ADNc sintetizado a un vector adecuado y puede introducirse el vector en una célula huésped adecuada, de modo que puede prepararse una biblioteca génica. En tal caso, puede usarse un plásmido que se conoce como vector convencional para la preparación de bibliotecas génicas, y por extensión pueden usarse fagos, cósmidos u otros vectores. Puede seleccionarse una célula huésped que se somete a transformación o transducción según el tipo de vector. 50

55 Los clones que portan fragmentos de genes diana se seleccionan de la biblioteca génica anterior por medio de hibridación de colonias, hibridación de placas de lisis u otros medios que impliquen el uso de sondas marcadoras que contienen secuencias específicas para los genes diana.

60 Además, los genes diana pueden someterse a una síntesis química total. Por ejemplo, se preparan dos pares de oligonucleótidos complementarios y entonces se aparean, se ligan varias cadenas de ADN apareadas con la ayuda de ADN ligasa, o se preparan varios oligonucleótidos parcialmente complementarios y se llenan los huecos mediante PCR. Por tanto, pueden sintetizarse genes.

65 Pueden determinarse secuencias de ADN de genes mediante una técnica convencional, tal como el método dideoxi (Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463-5467, 1977). Además, las secuencias de nucleótidos de ADN anteriores pueden determinarse fácilmente con el uso de un kit de secuenciación disponible comercialmente o

similar.

2. Vector de expresión

En el presente documento se describe un vector que comprende el gen HAC1 activado o el gen de RRP1 o un vector que comprende tanto el gen HAC1 activado como el gen de RRP1. Con el fin de expresar el gen HAC1 activado y el gen de RRP1 en células huésped, puede usarse un vector que comprende cualquiera del gen HAC1 activado o el gen de RRP1 para llevar a cabo la transformación. Alternativamente, puede usarse un vector que comprende ambos de tales genes para llevar a cabo la transformación. Además, un vector de expresión de este tipo puede comprender un gen que codifica para una proteína foránea. Alternativamente, puede prepararse por separado un vector de expresión que comprende un gen que codifica para una proteína foránea. En tal caso, se cotransfectan vectores en una célula huésped.

Un gen que codifica para una proteína foránea no está limitado particularmente. Los ejemplos incluyen: diversos genes de enzimas, tales como el gen de α -amilasa y el gen de α -galactosidasa; diversos genes de interferón que son proteínas farmacéuticamente útiles y fisiológicamente activas, tales como genes de interferón α e interferón γ ; diversos genes de interleucinas, tales como genes de IL1 y IL2; diversos genes de citocinas, tales como el gen de eritropoyetina (EPO) y el gen del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); y genes del factor de crecimiento. Estos genes pueden obtenerse por medio de cualquier medio.

La presente invención es particularmente eficaz con una proteína que sea altamente hidrófoba y una proteína cuya producción secretora sea insuficiente debido a la formación compuesta. Por tanto, la proteína foránea mencionada anteriormente es un anticuerpo o su fragmento funcional, es decir, un heteromultímero.

Puede añadirse de manera adecuada una región de regulación de la expresión al gen HAC1 activado, al gen de RRP1 o a un gen que codifica para una proteína foránea para constituir un vector de expresión como unidad de expresión proteica. Una unidad de expresión proteica comprende, en el sentido de un marco de lectura de transcripción, al menos una región de promotor, el gen anterior y una región de terminador de la transcripción. Un promotor que puede usarse en el presente documento puede ser un promotor de expresión inducible o promotor de expresión constitutiva. Los ejemplos de promotores de expresión inducible incluyen promotores implicados en el metabolismo de metanol de levadura asimiladora de metanol, tal como promotores del gen de alcohol oxidasa (AOX), promotores del gen de dihidroxiacetona sintasa (DAS) y promotores del gen de formiato deshidrogenasa (FDH). Un ejemplo de otro promotor inducible que puede usarse es un promotor inducible por cobre (CUP). Los ejemplos de promotores de expresión constitutiva incluyen promotores del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH, GAP), el gen de fosfoglicerocinasa (PGK), el gen de fosfotriosa isomerasa (TPI), el gen de enolasa (ENO), el gen de actina (ACT), el gen de citocromo c (CYC), el gen de trehalosa sintasa (TPS) y el gen de alcohol deshidrogenasa (ADH). Además, un terminador de la transcripción puede ser una secuencia que tiene una actividad de terminación de la transcripción de un promotor. Puede ser una secuencia del mismo gen del promotor o de uno diferente.

Con el fin de realizar la producción secretora de alto nivel de proteínas foráneas, es necesario el uso de un promotor potente. Cuando se intenta la producción de una proteína que tiene menos probabilidad de plegarse o menos probabilidad de secretarse con el uso de un promotor altamente activo, puede producirse de manera desventajosa hiposecreción. Tal hiposecreción se produce debido a los siguientes motivos. Es decir, la producción de proteína supera la capacidad del ribosoma en el que se realiza la traducción y del retículo endoplásmico en el que se realizan el plegamiento y la secreción. Esto provoca que las proteínas producidas en exceso se desnaturalicen, se acumulen, se ubiquitinen en células y se degraden por el proteasoma. Por consiguiente, pueden seleccionarse de manera adecuada promotores que pueden alcanzar un nivel de expresión hasta el grado en el que las proteínas resultantes se desnaturalicen y no experimenten agregación o las proteínas resultantes no superen la capacidad de secreción. Alternativamente, puede atenuarse la actividad de los promotores y entonces pueden usarse los promotores de interés. Es probable que las moléculas que forman heteromultímeros se vean afectadas como se describió anteriormente entre las proteínas multiméricas. En particular, moléculas tales como anticuerpos son heterotetrámeros que comprenden dos moléculas de cada una de la cadena pesada y de la cadena ligera que están agregadas. Por tanto, el nivel de expresión es un factor importante para realizar una agregación adecuada. Cuando la intensidad de expresión del gen HAC1 activado es excesivamente fuerte, se aplica un estrés excesivo a una célula, y esto puede inhibir de manera desventajosa el crecimiento. Por tanto, se requieren un ajuste y una optimización de la actividad de promotor tal como se describió anteriormente.

El vector de expresión puede comprender un marcador de selección para seleccionar un transformante. Por ejemplo, los vectores de expresión para levadura pueden comprender genes de marcadores auxótrofos seleccionados de entre genes de His1, His2, His3, His4, His5, His6, Leu2, Alg1, Alg2, Alg3, Trp1, Lys2, Ade1, Ade2, Ura3 y Ura5.

Como marcadores de selección, pueden usarse marcadores resistentes a fármacos que confieren resistencia a fármacos tales como cerulenina, aureobasidina, Zeocin, canavanina, cicloheximida, higromicina, blasticidina, tetraciclina, kanamicina, ampicilina, tetraciclina y neomicina, además de los marcadores auxótrofos mencionados anteriormente. Por tanto, pueden seleccionarse transformantes. Además, pueden usarse como marcadores genes

que confieren resistencia a disolventes con respecto a etanol, resistencia osmótica con respecto a glicerol o sal, resistencia a iones metálicos con respecto a cobre, y similares, de modo que pueden seleccionarse transformantes.

3. Célula huésped transformada

La célula huésped transformada de la presente descripción comprende el gen descrito en 1. anteriormente o el vector de expresión descrito en 2. anteriormente introducido en la misma.

Un ejemplo de una célula huésped que va a transformarse es una célula eucariota, y preferiblemente una cepa de levadura. Los ejemplos de cepas de levadura incluyen cepas de levadura asimiladora de metanol, tales como *Ogataea minuta*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) y *Candida boidinii*, y cepas de levadura, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* y *Schizosaccharomyces pombe*. Más específicamente, puede usarse la cepa YK3 de *Ogataea minuta* ($\Delta\text{och1}\Delta\text{pep4}\Delta\text{prb1}\Delta\text{yps1}\Delta\text{ura3}\Delta\text{ade1}$) como la cepa de *Ogataea minuta*, y puede usarse la cepa BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae* (MATa $\Delta\text{his3}\Delta\text{leu2}\Delta\text{met15}\Delta\text{ura3}$) como la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque las cepas de levadura no están limitadas a esto.

Además, la presente divulgación pretende obtener una célula huésped en la que el ER, que es esencial para la secreción, esté potenciado. Por consiguiente, la presente divulgación puede aplicarse a células animales u otras células.

En la presente invención, puede introducirse un vector de expresión en una célula huésped mediante cualquier método, siempre que un gen introducido esté presente de manera estable y se exprese de manera adecuada en un huésped. Los ejemplos de tales métodos que se emplean generalmente incluyen el método de fosfato de calcio (Ito *et al.*, Agric. Biol. Chem., 48, 341, 1984), la electroporación (Becker, D. M. *et al.*, 1990; Methods. Enzymol., 194, 182-187), el uso de esferoplastos (Creggh *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5, 3376, 1985), el método de acetato de litio (Itoh, H., 1983; J. Bacteriol. 153, 163-168) y la lipofección.

4. Método para producir proteína

En la presente invención, pueden producirse proteínas cultivando las células huésped transformadas por medio de una técnica convencional y tomando una muestra de las proteínas del producto de cultivo, seguido por purificación. El término "producto de cultivo" usado en el presente documento se refiere a células en cultivo, cepas cultivadas, o bacterias o células perturbadas, además de un sobrenadante de cultivo.

La célula huésped transformada puede cultivarse en un medio según un método convencional usado para el cultivo de la célula huésped.

Cuando la célula huésped transformada es un microorganismo, tal como una levadura, puede usarse un medio o bien natural o bien sintético como medio para el cultivo, siempre que contenga fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y sales inorgánicas asimilables por el microorganismo y sea capaz de proporcionar un cultivo eficaz del transformante. Puede usarse cualquier fuente de carbono asimilable por el microorganismo, y los ejemplos de las mismas incluyen: hidratos de carbono tales como glucosa, fructosa, sacarosa y almidón; ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido propiónico; y alcoholes tales como etanol y propanol. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen: amoníaco; sales de amonio de ácidos inorgánicos u orgánicos tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio, acetato de amonio y fosfato de amonio; otros compuestos que contienen nitrógeno; peptona; extractos de carne; y licor de maíz fermentado. Los ejemplos de sales inorgánicas incluyen: fosfato de monopotasio, fosfato de dipotasio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato de hierro (I), sulfato de manganeso, sulfato de cobre y carbonato de calcio. Según el tipo de marcador de selección, puede añadirse de manera adecuada un agente antibiótico, tal como aureobasidina, ampicilina o tetraciclina, a un medio. Alternativamente, puede eliminarse un aminoácido que puede suministrarse mediante un gen que complementa la auxotrofia (por ejemplo, Leu, Ura o Trp).

Cuando se cultiva la célula huésped transformada, en el caso de levadura, por ejemplo, el nivel de pH del medio se ajusta preferiblemente a de 4 a 7. La temperatura de cultivo es de entre 15°C y 32°C, y preferiblemente de aproximadamente 28°C. Cuando se expresa una proteína que tiene una estructura estérica complicada como anticuerpo, el cultivo puede llevarse a cabo preferiblemente a baja temperatura, con el fin de plegar de manera más eficaz una proteína de este tipo en la célula. La duración del cultivo es generalmente de aproximadamente 24 a 1.000 horas, y el cultivo puede llevarse a cabo por medio de un cultivo discontinuo, tal como un cultivo estático, con sacudidas, con agitación o con aireación, o por medio de un cultivo continuo.

Un producto de expresión de un gen de una proteína foránea del producto de cultivo (es decir, una disolución de cultivo o células cultivadas) puede confirmarse por medio de SDS-PAGE, inmunotransferencia de tipo Western, ELISA, o similares.

Las proteínas producidas pueden aislarse y purificarse por medio de técnicas convencionales para el aislamiento y la purificación de proteínas. Cuando se producen proteínas diana en las bacterias o las células tras el cultivo, las

bacterias o las células pueden pulverizarse usando, por ejemplo, un pulverizador ultrasónico, una prensa francesa, un homogeneizador Manton-Gaulin, un molino Dinomil, o similares, para obtener las proteínas diana. Cuando las proteínas diana se producen fuera de las bacterias o las células, la disolución de cultivo se usa tal cual, o las bacterias o las células se retiran por medio de centrifugación o similar. Después de esto, las proteínas diana se

recogen por medio de extracción usando un disolvente orgánico, se someten a diversas técnicas de cromatografía (por ejemplo, cromatografía hidrófoba, de fase inversa, de afinidad o de intercambio iónico), filtración en gel usando tamices moleculares, electroforesis usando gel de poliacrilamida, o similar, según la necesidad. Estas técnicas pueden emplearse solas o en combinaciones de dos o más. Por tanto, pueden aislarse y purificarse las proteínas diana.

Las técnicas de cultivo y purificación anteriores son ejemplos, y los métodos no están limitados a las mismas. La secuencia de aminoácidos del producto génico purificado puede confirmarse mediante un método convencional de análisis de aminoácidos, tal como la secuenciación de aminoácidos automatizada por medio de la técnica de degradación de Edman.

5. Método para inhibir la cadena de O-azúcar (o método para inhibir la actividad PMT)

En la presente invención, el cultivo mencionado anteriormente se lleva a cabo preferiblemente en condiciones en las que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT).

Se forma una cadena de O-azúcar en una célula de mamífero tras la adición de GalNAc mediante la péptido O-GalNAc transferasa, que está presente principalmente en el aparato de Golgi. Tal adición de cadena de azúcar tiene lugar tras el plegamiento de proteínas. Por el contrario, la formación de cadena de O-azúcar en células de levadura y moho se inicia tras la adición de manosa a un residuo de serina o treonina de la proteína mediante una proteína O-manosiltransferasa (PMT) codificada por el gen de PMT. Tal adición se denomina actividad PMT. La adición de manosa tiene lugar en paralelo al plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (ER) en la célula. Por tanto, puede añadirse de manera desventajosa una cadena de azúcar innecesaria a un sitio en el que tal adición no tendría lugar en el caso de la expresión de proteínas de mamífero. Por consiguiente, tal modificación innecesaria provocaría una formación de agregados insuficiente y reduciría la actividad.

Por consiguiente, realizando el cultivo en condiciones en las que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT), puede inhibirse la formación de una cadena de O-azúcar innecesaria. Esto también acelera la agregación de proteínas y permite mantener la actividad y propiedades físicas nativas de proteínas. En la presente invención, los efectos de la producción secretora de alto nivel de proteínas por medio de la introducción del gen HAC1 activado y/o el gen de RRPB pueden producir adicionalmente efectos sinérgicos regulando la formación de cadena de O-azúcar potenciada por UPR por medio de la inhibición de la actividad PMT.

La adición de una cadena de O-azúcar peculiar para una levadura o un moho puede inhibirse mediante, por ejemplo, los dos métodos descritos a continuación. Estos métodos pueden realizarse en combinación.

(1) El cultivo y la producción se llevan a cabo en condiciones en las que se inhibe la actividad PMT que experimenta la adición de una cadena de O-azúcar peculiar para una levadura o un moho.

(2) Se usan células en las que se inhibe la actividad PMT que experimenta la adición de una cadena de O-azúcar peculiar para una levadura o un moho.

La actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) de (1) anteriormente puede inhibirse con la adición de un inhibidor de la actividad PMT (es decir, un inhibidor de PMT) al medio, por ejemplo. Un ejemplo de un inhibidor de la actividad PMT que puede usarse es el derivado de ácido rodanin-3-acético (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14, págs. 3975-3978, 2004). Los ejemplos específicos del derivado de ácido rodanin-3-acético incluyen ácido 5-[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metil]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinacético (compuesto (1c) descrito en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 14, pág. 3975, 2004) y ácido {(5Z)-4-oxo-5-[3-(1-feniletoxi)-4-(2-feniletoxi)benciliden]-2-tioxo-1,3-tiazolidin-3-il}acético (compuesto (5a) descrito en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 14, pág. 3975, 2004). Un inhibidor de la actividad PMT de este tipo (el derivado de ácido rodanin-3-acético) se examinó por primera vez como agente antibacteriano, y no se examinó con el propósito de mejorar la productividad o calidad de proteínas. Los efectos del mismo se descubrieron por primera vez en la presente invención. PMT es importante para la generación de manoproteínas que constituyen la pared celular de levadura. Una actividad PMT excesivamente reducida afectará de manera adversa al crecimiento de levadura. Por consiguiente, cuando se usan sistemas de expresión inducible, la adición de un inhibidor de la actividad PMT en el momento de la expresión de genes de proteínas foráneas, tras el crecimiento celular, sería más eficaz. Por tanto, pueden producirse al máximo nivel proteínas diana de alta calidad en las que se inhibe la modificación de cadena de O-azúcar.

La actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) descrita en (2) anteriormente puede inhibirse perturbando el gen de PMT o inhibiendo la expresión de tal gen. En *S. cerevisiae*, PMT está codificada por al menos 6 genes; es decir, el gen de PMT1 (GenBank: L19169), el gen de PMT2 (GenBank: L05146), el gen de PMT3 (GenBank: X83797), el gen de PMT4 (GenBank: X83798), el gen de PMT5 (GenBank: X95644) y el gen de PMT6 (GenBank: Z72984), y

estos genes forman independientemente un homodímero (PMT4p) o un heterodímero (PMT1p/PMT2p) y presentan actividad. Se sabe que la PMT que actúa varía según una glicoproteína. En la presente invención, se encontró que las proteínas PMT tienen selectividad con respecto a la adición de una cadena de O-azúcar a un anticuerpo. Específicamente, los efectos de la inhibición de la adición de cadena de O-azúcar no se encontraron en la cepa deficiente en el gen de PMT5 o PMT6, tal como se describe en los ejemplos.

Por tanto, PMT es un gen importante para el crecimiento de levadura. Cuando la actividad, tal como la perturbación del gen de PMT, se elimina o se reduce extremadamente, la pared celular se vuelve frágil. Por tanto, el uso de una cepa deficiente en el gen de PMT requiere atención. La perturbación de genes de PMT divulgada en el documento WO 2002/046437 no siempre es eficaz. En ocasiones puede afectar de manera adversa al crecimiento de una proteína foránea debido a la inhibición del crecimiento y la inhibición de la perturbación o expresión de genes de PMT que tiene una actividad PMT óptima, lo que puede minimizar la adición de cadena de O-azúcar y la modificación en la proteína diana, si se desea. Los ejemplos de métodos para inhibir genes de PMT incluyen un método que implica el uso de ARN antisentido o ARNi y un método de atenuación de un promotor. En la presente invención, se demuestra que un método en el que se inserta un fragmento de ADN en la parte de gen estructural de PMT y la región de promotor para escindir el gen (a continuación en el presente documento, tal método puede denominarse "inactivación mediante inserción de genes" y un vector de plásmido para la inactivación mediante inserción de genes se denomina "vector de inactivación mediante inserción") es un ejemplo de un medio para atenuar un promotor. Además, también puede emplearse un método en el que se introduce un fragmento de gen de PMT que no tiene actividad PMT pero se genera como proteína o gen cuyo residuo de aminoácido relacionado con la actividad se ha mutado, para inhibir la actividad PMT (es decir, un método del dominante negativo).

Mejores modos para llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, la presente invención se describe en detalle con referencia a los ejemplos, aunque el alcance técnico de la presente invención no está limitado a los ejemplos. Los plásmidos, las enzimas de restricción, las enzimas modificadoras de ADN, y similares que se usan en los ejemplos de la presente invención son productos disponibles comercialmente, y estos productos pueden usarse según técnicas convencionales. Además, los procedimientos de clonación de ADN, secuenciación de nucleótidos, transformación de células huésped, cultivo de células huésped transformadas, toma de muestras y purificación de enzimas a partir de productos de cultivo, y similares se conocen ampliamente en la técnica o pueden aprenderse a través de publicaciones existentes.

[Ejemplo 1] Construcción de plásmido de expresión de gen foráneo

(1) Construcción de vector en tándem de expresión de gen foráneo que comprende el promotor del gen AOX1 que tiene el gen resistente a G418 como marcador, el casete terminador y el promotor del gen GAP, y el casete terminador

Se usaron como materiales pOMex3G y pOMexGP1U dados a conocer en el documento WO 2003/091431. Se escindió pOMex3G con *Xba*I y se le proporcionaron extremos romos, seguido por introducción del ligador *Spe*I. Se designó el vector resultante como pOMex3GXS. Por separado, se escindió pOMexGP1U con *Eco*T22I y se le proporcionaron extremos romos, seguido por introducción del ligador *Apal*. Se designó el vector resultante como pOMexGP1UTA. Se digirió pOMexGP1UTA con *Hind*III y *Kpn*I y se le proporcionaron extremos romos. Después de esto, se digirió el fragmento aislado de aproximadamente 2,0 kb que contenía un promotor y un terminador de GAP con *Apal* y entonces se introdujo en el pOMex3GXS de extremos romos. Se designó el vector resultante como pOMexGAT-G. pOMexGAT-G es un vector en tándem que comprende el sitio *Spe*I-*Bam*HI dentro del casete de expresión de AOX1 y el sitio *Sall*-*Apal* dentro del casete de expresión de GAP.

(2) Construcción de un vector de expresión de gen foráneo con el uso de un promotor y un terminador del gen GAP usando el gen ADE1 como marcador de selección

Se usó como material pOMex4A divulgado en el documento WO 2003/091431. Se trató pOMexGP1U mencionado anteriormente con *Eco*T22I y se le proporcionaron extremos romos, seguido por introducción del ligador *Bam*HI. Se designó el vector resultante como pOMexGP2U. Se trató pOMexGP2U con *Sall* y se le proporcionaron extremos romos, seguido por introducción del ligador *Spe*I. Se designó el vector resultante como pOMexGP3U. Se digirió pOMexGP3U con *Hind*III y *Kpn*I, y se aisló un fragmento de aproximadamente 2,0 kb que contenía el casete de expresión de GAP. Se ligó el fragmento resultante a un fragmento de aproximadamente 5,0 kb que comprende el marcador de ADE1 aislado tratando pOMex4A con *Hind*III-*Kpn*I. Se designó el vector resultante como pOMexGP1A. pOMexGP1A es un vector de expresión de gen foráneo que comprende el sitio *Spe*I-*Bam*HI dentro del casete de expresión de GAP.

(3) Construcción de un vector de expresión de gen foráneo con un promotor y un terminador de fosfoglicerina cinasa (PGK1) y usando un gen resistente a higromicina B como marcador de selección

Se obtuvo el gen PGK1 que codifica para fosfoglicerina cinasa a partir de la cepa IFO10746 de *Ogataea minuta* y se

determinó la secuencia de nucleótidos del mismo.

(3-1) Preparación de sondas

5 Se sintetizaron cebadores degenerados de ADN que comprendían secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos conservadas, es decir, RVDFNVPLD y EGKELPGVA, derivadas de *Saccharomyces cerevisiae* (número de registro de GenBank: P00560) y *Candida maltosa* (número de registro de GenBank: P41757) de la siguiente manera.

10 PPG5: 5'-GN GTN GAY TTY AAY GTN CCN TTR GA-3' (SEQ ID NO: 1)

PPG3: 5'-GY NAC DCC NGG YAA YTC YTT DCC YTC-3' (SEQ ID NO: 2)

15 El cebador PPG5 (SEQ ID NO: 1) corresponde a la secuencia de aminoácidos, RVDFNVPLD, y el cebador PPG3 (SEQ ID NO: 2) es una secuencia de una hebra complementaria de una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos, EGKELPGVA. Se usó ADN cromosómico de la cepa IFO10746 de *O. minuta* como molde, se llevó a cabo una PCR usando los cebadores PPG5 y PPG3 a 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y se repitió este ciclo 25 veces. Se recuperó el fragmento de ADN amplificado (de aproximadamente 1,2 kb) y se clonó usando el kit de clonación TOPO TA. Se aisló ADN plasmídico del clon
20 resultante y se determinó la secuencia de nucleótidos. Por tanto, se seleccionó un clon que tenía una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos que tiene una alta homología con la secuencia de aminoácidos del gen PGK1 derivado de *S. cerevisiae* y *C. maltosa* en el fragmento de ADN con inserción de plásmido. Se recuperó el fragmento con inserción de ADN de 1,2 kb tras escindir el plásmido con *EcoRI*, seguido por electroforesis en gel de agarosa.

25

(3-2) Preparación y examen de la biblioteca

Se escindió ADN cromosómico de la cepa IFO10746 de *O. minuta* con diversas enzimas de restricción y se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Se transfirió el ADN separado a la membrana de nailon Hybond N+ (Amersham). Se marcó el fragmento de ADN obtenido en (1-3-1) anteriormente con el uso de AlkPhos DIRECT (Amersham), seguido por hibridación de tipo Southern. Se llevó a cabo la hibridación según una técnica convencional (Molecular cloning 2ª ed., ed. Sambrook, J., *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory U.S.A., 1989). Como resultado, se consideró que el gen PGK1 estaba presente en un fragmento de *Bam*HI de aproximadamente 9,0 kb. Con el fin de clonar el fragmento de ADN, se preparó una biblioteca genómica. Se escindió ADN cromosómico de *O. minuta* con *Bam*HI y se sometió a electroforesis en agarosa, y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 9,0 kb del gel. Se ligó el fragmento de ADN recuperado al pUC118 escindido con *Bam*HI y se transformó en la cepa DH5 α de *E. coli* según el método de Hanahan (Gene, 10, 63, 1980) para preparar la biblioteca. Se examinaron aproximadamente 4.000 clones por medio de hibridación de colonias usando los fragmentos de ADN mencionados anteriormente como sondas. De entre los clones positivos obtenidos, se
40 seleccionaron los plásmidos pOMPGK1 que portaban los genes PGK1.

(3-3) Secuenciación de nucleótidos

Se determinó la secuencia de nucleótidos en la región de *Bam*HI en el plásmido pOMPGK1 mediante el método de paseo con cebador y se encontró que la secuencia determinada tenía la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 3. La secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 3 comprende un marco de lectura abierto que comprende 1.254 pares de bases desde los nucleótidos 4.766 hasta 6.016. Se inspeccionó la homología entre la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 que se deduce basándose en el marco de lectura abierto y fosfoglicerina cinasas derivadas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida maltosa*. Como resultado, se encontró que la primera homología era del 74% y que la segunda homología era del 81%.

50

(3-4) Construcción de un casete de expresión de gen foráneo usando el promotor y el terminador del gen PGK1

Se preparó un casete de expresión que introduce un gen foráneo entre un fragmento que contenía el promotor del gen PGK1 y un fragmento que contenía un terminador de *O. minuta*. Con el fin de introducir los sitios *Spe*I, *Bgl*II y *Bam*HI entre el promotor y el terminador del gen PGK1, se sintetizaron los siguientes cebadores.

55

OPGK-P-F: 5'-AAGCTTGACAATGTAGGAGATCATAAACACATCGTGCGCGTC-3' (SEQ ID NO: 5)

60 OPGK-P-R: 5'-GGATCCAGATCTCATATGACTAGTTGCTAGTTCTATGCGG CGTTAGTGTTTAACTACGACAGCT-3' (SEQ ID NO: 6)

OPGK-T-F: 5'-GGATCCGTGGGATTTGCGTGATCTACGTAGTGTTATTTT-3' (SEQ ID NO: 7)

65 OPGK-T-R: 5'-GGTACCGCAGTGAAAGGCGATGCCACCATGTGCAAGGAG TTC-3' (SEQ ID NO: 8)

Usando el pOMPGK1 anterior como molde, se llevó a cabo una PCR usando el cebador OPGK-P-F (SEQ ID NO: 5) y el cebador OPGK-P-R (SEQ ID NO: 6) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y se repitió este ciclo 20 veces. Además, se llevó a cabo una PCR usando el cebador OPGK-T-F (SEQ ID NO: 7) y el cebador OPGK-T-R (SEQ ID NO: 8) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y se repitió este ciclo 20 veces. Se recuperaron los fragmentos de ADN de 1,5 kb y 1,0 kb amplificados y se clonaron usando el kit de clonación TOPO TA. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN de inserción para seleccionar clones que tenían las secuencias de nucleótidos correctas. Se aislaron los fragmentos de ADN de inserción de 1,5 kb y 1,0 kb como el fragmento de *HindIII-BamHI* y el fragmento de *BamHI-KpnI*, respectivamente.

Se introdujo el fragmento de *BamHI-KpnI* de 1,0 kb mencionado anteriormente entre *BamHI* y *KpnI* de pOMex5H descrito en el documento WO 2003/091431. Después de esto, se introdujo el fragmento de *HindIII-BamHI* de 1,5 kb mencionado anteriormente entre *HindIII* y *BamHI* del plásmido obtenido. Se designó el plásmido resultante como pOMexPGHy. pOMexPGHy es un vector de expresión de gen foráneo que comprende los sitios *SpeI*, *BglII* y *BamHI* en el casete de expresión del gen PGK1.

[Ejemplo 2] Construcción de vector de expresión de gen de anticuerpo

Con el fin de clonar una señal de secreción de MF alfa1 (número de registro de GenBank: P01149) derivado de *S. cerevisiae* (denominada a continuación en el presente documento la "señal de secreción de aMF"), se sintetizaron los siguientes cebadores.

Sp-aMFs-F: 5'-ACTAGTATGAGATTTCTTCAATTT-3' (SEQ ID NO: 9)

S1-aMFs-F: 5'-GTCGACATGAGA'ITTCCTTCAATTT-3' (SEQ ID NO: 10)

Xb-aMFs-R: 5'-AGCTTCAGCCTCTCTTTATCTAGAGA-3' (SEQ ID NO: 11)

Se usó el ADN de genoma de *S. cerevisiae* obtenido de la misma manera que se describió anteriormente como molde para llevar a cabo una PCR usando el cebador Sp-aMFs-F (SEQ ID NO: 9) y el cebador Xb-aMFs-R (SEQ ID NO: 11) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos, y se repitió este ciclo 20 veces. Además, se llevó a cabo una PCR usando el cebador S1-aMFs-F (SEQ ID NO: 10) y el cebador Xb-aMFs-R (SEQ ID NO: 11) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos, y se repitió este ciclo 20 veces. Se recuperaron los fragmentos de ADN amplificados de aproximadamente 0,3 kb en cada PCR y se clonaron usando el kit de clonación TOPO TA. Se confirmaron las secuencias de nucleótidos de las secuencias de ADN de inserción, y se designaron los plásmidos resultantes como TOPOaMFsSP y TOPOaMFsSL, respectivamente.

Se usó el gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2002/094880) como gen de anticuerpo. Con el fin de introducir sitios de enzima de restricción en sitios en ambos extremos terminales de los genes de cadena ligera y cadena pesada, se sintetizaron los siguientes cebadores.

Xb-KREA-EA-Hc-F: 5'-TCTCTAGATAAAAGAGAGGCTGAAGCTCAGCTGCAGCTGCAGGAGTC-3' (SEQ ID NO: 12)

Hc-R-Bg: 5'-CCAGATCTGGATCCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG-3' (SEQ ID NO: 13)

Xb-KREA-EA-Lc-F: 5'-TCTCTAGATAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAAATTGTGTTGACACAGTC-3' (SEQ ID NO: 14)

Lc-R-Ap: 5'-AAAGGGCCCTCAACTCTCCCTGTTGAAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 15)

Usando estos cebadores de ADN, se llevó a cabo una PCR para amplificar una cadena ligera por medio de 20 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto y para amplificar una cadena pesada por medio de 20 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto y 30 segundos, y se clonaron los productos amplificados en pCR2.1-TOPO. Se confirmaron las secuencias de nucleótidos de las secuencias de ADN de inserción, se designaron los plásmidos resultantes como TOPOHc-Trail y TOPOLc-Trail, respectivamente. Se introdujeron una señal de secreción de aMF aislada de TOPOaMFsSL por medio de digestión con *SalI* y *XbaI* y una cadena ligera de anticuerpo aislada de TOPOLc-Trail por medio de digestión con *XbaI* y *Apal* en el pOMexGAT-G digerido con *SalI*-*Apal* por medio de ligación de 3 fragmentos. Se designó el plásmido resultante como pOMexGATG/L. Posteriormente, se introdujeron una señal de secreción de aMF aislada de TOPOaMFsSP por medio de digestión con *SpeI* y *XbaI* y una cadena pesada de anticuerpo aislada de TOPOHc-Trail por medio de digestión con *XbaI* y *BglII* en el pOMexGAT-G/L digerido con *SpeI*-*BamHI* por medio de ligación de 3 fragmentos. Se designó el vector resultante como pOMexGAT-G/Ab (figura 3). pOMexGAT-G/Ab es un vector de expresión de anticuerpo que comprende las unidades de expresión tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera de anticuerpo.

[Ejemplo 3] Construcción del vector de expresión de gen HAC1 activado de *O. minuta*

Se obtuvo el gen HAC1 activado cultivando células (cepas YK2-3 de *O. minuta*) en medio YPD a 27°C durante 12 horas y añadiendo tunicamicina hasta una concentración de 10 µg/ml en el medio para inducir UPR. Se llevó a cabo el cultivo en un medio que contenía tunicamicina durante 12 horas adicionales. Una vez recogidas las células, se preparó ARNm usando el kit de ARN Yeastar (ZYMO research).

Se sometió el ARNm obtenido a tratamiento con ADNasa usando ADNasa I de calidad para amplificación (Invitrogen). Se sintetizó el ADNc a partir del ARNm usando el sistema de síntesis de primera hebra para RT Super script III (Invitrogen). Se amplificó el ADNc resultante por medio de PCR usando el cebador de ADN HAC1-1 (SEQ ID NO: 16) y el cebador HAC1-12 (SEQ ID NO: 17) descritos a continuación a 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, y se repitió este ciclo 30 veces. Se clonaron los productos amplificados en pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Después de esto, se confirmaron las secuencias de nucleótidos de los dos tipos de fragmentos de genes amplificados por PCR (SEQ ID NO: 18 y 19).

HAC1-1: 5'-ATGACTTCCTTTTCAGCACCGCATC-3' (SEQ ID NO: 16)

HAC1-12: 5'-CAAAATTGCAAGCAAGTTAACCG-3' (SEQ ID NO: 17)

Uno de los dos tipos de fragmentos de ADNc obtenidos concordaba con la secuencia genómica; sin embargo, el otro fragmento era una secuencia acortada que carecía de parte de la misma, es decir, un fragmento de ADNc sometido a corte y empalme por Ire1p activado por UPR. Con el fin de obtener ADNc del HAC1 activado, se repitió un ciclo de PCR de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos, y se repitió 20 veces usando el conjunto de ADNc, que se dedujo que contenía el cebador de ADN speHAC1F (SEQ ID NO: 20), el cebador bglHAC1R (SEQ ID NO: 21) y ADNc del HAC1 activado.

speHAC1F: 5'-gactagtATGACTTCCTTTTCAGCACCG-3' (SEQ ID NO: 20)

bglHAC1R: 5'-cagatctTCATGACAAGAAATCATCGAAT-3' (SEQ ID NO: 21)

el fragmento obtenido de aproximadamente 1 kb comprendía una secuencia desde el codón de iniciación hasta el codón de terminación del gen HAC1 activado (SEQ ID NO: 22), que es equivalente a la secuencia de aminoácidos de Hac1p activado que comprende 320 residuos de aminoácido (SEQ ID NO: 23). Se trató esta secuencia con *SpeI* y *BglII*, se aisló y entonces se introdujo en el pOMexPGHy tratado con *SpeI-BglII*. Se designó el vector resultante como pOMexPGHy/Hac1 (figura 3). Este vector comprende una unidad de expresión de gen HAC1 activado.

[Ejemplo 4] Construcción de vector de expresión de gen de RRBp1 de humano

Se usó el gen de RRBp1 de humano (K1AA1398, n.º de registro de GenBank AB037819) facilitado por el Instituto de Investigación de ADN de Kazusa. Con el fin de introducir sitios de enzima de restricción en ambos extremos terminales del gen, se usaron los siguientes cebadores de ADN, p180 MSp-F y p180 UBg-R (SEQ ID NO: 24 y 25), y el gen de RRBp1 de humano para amplificar el gen de interés mediante PCR por medio de 20 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 5 minutos.

p180 MSp-F: 5'-ATACAATACAAAGTCGAGACTAGTATGGATATTTACGACACTCAAACCTT-3' (SEQ ID NO: 24)

p180 UBg-R: 5'-TCTATCCACACGGATCAGATCTTCAGACAGAGGTGCCCTCTTTGAGCTG-3' (SEQ ID NO: 25)

Se introdujo el fragmento resultante de aproximadamente 4,5 kb en el pOMexGP1A digerido con *SpeI-BamHI* usando el kit de clonación por PCR In-Fusion Dry-Down de BD (BD Science). Se determinó una secuencia de aproximadamente 500 pb que comprende una región que codifica para el codón de iniciación del gen de RRBp1 de humano a partir del sitio *SpeI*, y se determinó un fragmento de aproximadamente 500 pb que comprende una región que codifica para el codón de terminación del gen de RRBp1 de humano a partir del sitio *BamHI*. Se designó el vector resultante como pOMexGP1A/p180PCR. Se digirió pOMexGP1A/p180PCR con *NdeI* y *Ascl*, y se eliminó un fragmento que comprende una región de desde 110 pb hasta 4541 pb en ORF del gen de RRBp1 de humano del plásmido. Por separado, se digirió el gen de RRBp1 de humano facilitado por el Instituto de Investigación de ADN de Kazusa con *NdeI* y *Ascl*, se aisló un fragmento que comprende una región de desde 110 pb hasta 4541 pb en ORF, y se introdujo el fragmento aislado en el pOMexGP1A/p180PCR digerido con *NdeI-Ascl* mencionado anteriormente. Se designó el vector resultante como pOMexGP1A/p180 (figura 3). pOMexGP1A/p180 es el vector de expresión del gen de RRBp1 de humano.

[Ejemplo 5] Preparación la cepa de levadura de expresión de anticuerpos (*O. minuta*)

Usando el vector pOMexGAT-G/Ab digerido con *NotI*, se transformaron cepas YK-3 de *O. minuta* ($\Delta och1 \Delta pep4 \Delta prb1 \Delta yps1 \Delta ura3 \Delta ade1$: descritas en el documento WO 2003/091431) por medio de electroporación. Se emplearon las condiciones para electroporación descritas en el documento WO 2003/091431. Se seleccionaron las células transformadas en medio de placa de agar YPD que contenía 50 µg/ml de G418 y se cultivaron. Después

de esto, se extrajeron los genomas, se confirmó la introducción de una cadena pesada por medio de PCR usando el cebador de ADN Xb-KREAEA-Hc (SEQ ID NO: 12) y el cebador Hc-R-Bg (SEQ ID NO: 13) mencionados anteriormente, y se confirmó la introducción de una cadena ligera por medio de PCR usando el cebador Xb-KREAEA-Lc-F (SEQ ID NO: 14) y el cebador Lc-R-Ap (SEQ ID NO: 15) mencionados anteriormente. La cepa en la que se había observado la introducción de los genes de cadena pesada y cadena ligera se designó como la cepa AO1 de *O. minuta* productora de anticuerpos.

[Ejemplo 6] Preparación de cepa de levadura productora de anticuerpos (*O. minuta*) que expresa el gen HAC1 activado y el gen de RRPB1

Se introdujo pOMexGP1A/p180 digerido con Sse8783I en la cepa AO1 de *O. minuta* productora de anticuerpos hecha crecer en el ejemplo 5 por medio de electroporación. Se obtuvo la cepa transformada seleccionando una cepa ADE+ en medio de placa de agar SD, cultivando la cepa, extrayendo el genoma y confirmando la introducción del gen de RRPB1 por medio de PCR usando p180 MSp-F (SEQ ID NO: 24) y p180 UBg-R (SEQ ID NO: 25) mencionados anteriormente. La cepa transformada obtenida se designó como la cepa AK2R de *O. minuta*. Al mismo tiempo, se llevó a cabo transformación usando pOMexGP1A digerido con Sse8783I para obtener la cepa AK2A de *O. minuta* como control. Además, se introdujo pOMexPGHy-Hac1 digerido con Aor51HI en la cepa AK2R de *O. minuta* y la cepa AK2A de *O. minuta* por medio de electroporación. Se confirmó la introducción del gen HAC1 activado en la cepa transformada seleccionando una cepa en un medio de placa de agar YPD que comprende higromicina a 50 µg/ml, cultivando la cepa, extrayendo el genoma y confirmando por medio de PCR usando el cebador de ADN speHAC1F (SEQ ID NO: 20) y el cebador bglHAC1R (SEQ ID NO: 21). Se designaron las cepas resultantes como la cepa AK3RH de *O. minuta* y la cepa AK3AH de *O. minuta*. Al mismo tiempo, se introdujo pOMexPGHy digerido con Aor51HI en la cepa AK2R de *O. minuta* y la cepa AK2A de *O. minuta* para obtener la cepa AK3RHy de *O. minuta* y la cepa AK3AHy de *O. minuta* como controles.

[Ejemplo 7] Confirmación de la secreción de anticuerpos por cepa de levadura transformada (*O. minuta*)

Se cultivaron las cepas AK3RH de *O. minuta*, AK3AH de *O. minuta*, AK3RHy de *O. minuta* y AK3AHy de *O. minuta* en medio BYPMG (extracto de levadura al 1% (Difco), polipeptona al 2% (Difco), metanol al 1,5%, glicerol al 0,5% y tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0)) a 28°C durante 4 días. Se preparó un sobrenadante de cultivo a partir de la disolución de cultivo y se sometió a SDS-PAGE. Se sometieron las proteínas separadas a transferencia en una membrana de PVDF, y se realizó análisis de tipo Western usando anticuerpos anti-humano marcados (anticuerpo anti-Fc de humano y anticuerpo anti-κ de humano). Como resultado, se encontró que la cepa en la que se había introducido el gen de RRPB1 y el gen HAC1 activado secretaba una cantidad significativamente mayor de anticuerpos que otras cepas, tal como se muestra en la figura 4.

[Ejemplo 8] Productividad de anticuerpos secretores mediante cepa de levadura transformada (*O. minuta*)

Se sometió la disolución de cultivo preparada en el ejemplo 7 a HPLC usando columnas de proteína A (Poros A 50 µm, 4,6 mm, D/50 mml, Applied Biosystems) para medir la cantidad de producción de anticuerpos (condiciones de separación: tampón de equilibrado: tampón fosfato 10 mM (pH 6,0); tampón de elución: tampón fosfato 10 mM (pH 3,4); velocidad de flujo: 4 ml/min; detección: 210 nm). Como muestra patrón, se usó un anticuerpo producido en células animales (CHO). La figura 5 muestra la productividad de anticuerpos por DO 600 = 1. Las cantidades de anticuerpos secretados en la cepa AK3RHy de *O. minuta* en la que sólo se había introducido el gen de RRPB1 y en la cepa AK3AH de *O. minuta* en la que sólo se había introducido el gen HAC1 activado tendieron a aumentar, en comparación con la cantidad en la cepa control, es decir, la cepa AK3AHy de *O. minuta*. Sin embargo, la cantidad de producción de anticuerpos en la cepa AK3RH de *O. minuta* en la que se expresaban tanto el gen HAC1 activado como el gen de RRPB1 fue significativamente mayor que en la cepa control, es decir la cepa AK3AHy de *O. minuta*, y en la cepa en la que se había introducido únicamente el gen HAC1 activado o el gen de RRPB1. Por tanto se confirmó que la coexpresión del gen HAC1 activado y el gen de RRPB1 produciría efectos mayores que los efectos sinérgicos sobre la productividad de anticuerpos.

[Ejemplo 9] Producción de anticuerpos en condiciones en las que se inhibe la formación de la cadena de O-azúcar usando la cepa de levadura transformada (*O. minuta*)

Se cultivaron AK3RH de *O. minuta* y AK3AHy de *O. minuta* en medio BYPG (extracto de levadura al 1% (Difco), polipeptona al 2% (Difco), glicerol al 0,5% y tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0)) durante 2 días, y se cultivaron estas cepas en medios BYPM [extracto de levadura al 1% (Difco), polipeptona al 2% (Difco), metanol al 1,5% y tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0)] a los que se habían añadido inhibidores de PMT 0 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM y 50 µM (el derivado de ácido rodanin-3-acético: ácido 5-[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metilen]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinacético (compuesto (1c) descrito en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 14, pág. 3975, 2004)) a 28°C durante 2 días. Se preparó un sobrenadante de cultivo a partir de la disolución de cultivo y se sometió a SDS-PAGE. Después de esto, se sometieron las proteínas separadas a transferencia en una membrana de PVDF, y se llevó a cabo análisis de tipo Western usando un anticuerpo anti-humano marcado (anticuerpo anti-Fc de humano). La figura 6 muestra los resultados del mismo. La concentración adecuada del inhibidor de PMT que había que añadir era 5 µM. En tal caso, se aumentó la cantidad de secreción de anticuerpos y el porcentaje de formación de agregado.

[Ejemplo 10] Construcción de vector de expresión de gen de anticuerpo

Con el fin de expresar una proteína de fusión de la señal de secreción de MF alfa1 derivada de *S. cerevisiae* (número de registro de GenBank: P01149) (denominada a continuación en el presente documento “señal de secreción de aMF”), se ligó la cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TRAIL, y la cadena pesada del mismo, la señal de secreción del gen aMF al gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) por medio de PCR de extensión por solapamiento usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos.

Para la señal de secreción de aMF-a y la cadena pesada de anticuerpo anti-receptor de TRAIL

EcoALF: 5'-GGAATTCATGAGATTTCTTCAAT-3' (SEQ ID NO: 26)

AlfH02: 5'-CTCCACCAGCTGTACTTCTCTTTTCTCGAGAGATA-3' (SEQ ID NO: 27)

AlfH03: 5'-TATCTCTCGAGAAAAGAGAAGTACAGCTGGTGGAG-3' (SEQ ID NO: 28)

AlfH04: 5'-GGTCGACTCATTTACCCGGGGACAG-3' (SEQ ID NO: 29)

Para la señal de secreción de aMF-a y la cadena ligera de anticuerpo anti-receptor de TRAIL

EcoALF: 5'-GGAATTCATGAGATTTCTTCAAT-3' (SEQ ID NO: 26)

AlfL02: 5'-TGGGTCATCTGAATGTCTCTTTTCTCGAGAGATA-3' (SEQ ID NO: 30)

AlfL03: 5'-TATCTCTCGAGAAAAGAGACATTCAGATGACCCA-3' (SEQ ID NO: 31)

AlfL04: 5'-GGTCGACCTAACACTCTCCCCTGT-3' (SEQ ID NO: 32)

Se amplificó la región del gen de señal de secreción de aMF usando, como molde, el ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE). Se obtuvo la señal de secreción de aMF para la cadena pesada por medio de PCR usando el cebador EcoALF (SEQ ID NO: 26) y el cebador AlfH02 (SEQ ID NO: 27) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se obtuvo la señal de secreción de aMF para la cadena ligera por medio de PCR usando el cebador EcoALF (SEQ ID NO: 26) y el cebador AlfL02 (SEQ ID NO: 30) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperaron los fragmentos de ADN diana amplificados de aproximadamente 0,26 kb.

Se amplificó la región de gen de anticuerpo usando ADNc del anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO2001/08356) como molde. Se obtuvo el fragmento de cadena pesada por medio de PCR usando el cebador AlfH03 (SEQ ID NO: 28) y el cebador AlfH04 (SEQ ID NO: 29) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se obtuvo el fragmento de cadena ligera por medio de PCR usando el cebador AlfL03 (SEQ ID NO: 31) y el cebador AlfL04 (SEQ ID NO: 32) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperaron el fragmento de ADN diana de la región de cadena pesada amplificada de aproximadamente 1,35 kb y el de la región de cadena ligera de aproximadamente 0,65 kb.

Posteriormente, se usaron la región de señal de secreción de aMF para la cadena pesada y la región de cadena pesada de aproximadamente 1,35 kb como moldes para llevar a cabo una PCR usando el cebador EcoALF (SEQ ID NO: 26) y el cebador AlfH04 (SEQ ID NO: 29) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó el fragmento de ADN diana amplificado de aproximadamente 1,6 kb. Además, se usaron la región señal de secreción de aMF para la cadena ligera y la región de cadena ligera de aproximadamente 0,65 kb como moldes para llevar a cabo una PCR usando el cebador EcoALF (SEQ ID NO: 26) y el cebador AlfL04 (SEQ ID NO: 32) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó el fragmento de ADN diana amplificado de aproximadamente 0,9 kb. Se clonaron los fragmentos de ADN recuperados en pCR2.1-TOPO. Basándose en las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de inserción, se encontró que estas secuencias tienen los genes en las que se había fusionado la señal de secreción de aMF en marco a la cadena pesada de anticuerpo y la señal de secreción de aMF se había fusionado en marco a la cadena ligera de anticuerpo, respectivamente. Los plásmidos obtenidos se designaron como TOPO-alfHc y TOPO-alfLc, respectivamente. Se usaron el sitio de enzima de restricción *EcoRI* introducido en el cebador EcoALF (SEQ ID NO: 26) y los sitios de enzima de restricción *Sall* introducidos en el cebador AlfH04 (SEQ ID NO: 29) y el cebador AlfL04 (SEQ ID NO: 32) para recuperar fragmentos de ADN que codifican para el producto de fusión de señal de secreción de aMF y la cadena pesada de anticuerpo y el de la señal de secreción de aMF y la cadena ligera de anticuerpo por medio de digestión con *EcoRI-Sall* a partir de TOPO-alfHc y TOPO-alfLc.

Con el fin de expresar la cadena pesada de anticuerpo y la cadena ligera de anticuerpo en *S. cerevisiae*, se ligaron fragmentos de ADN que codifican para el producto de fusión de señal de secreción de aMF y la cadena pesada de anticuerpo y el producto de fusión de señal de secreción de aMF y la cadena ligera de anticuerpo recuperado por medio de digestión con *EcoRI-SalI* al sitio *EcoRI-SalI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP), que se había introducido en vector lanzadera YEp352 de *E. coli*-levadura (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designaron los plásmidos resultantes como YEp352GAP-II-alfHc y YEp352GAP-II-alfLc, respectivamente. Posteriormente, se usaron los sitios de enzima de restricción *BamHI* en ambos extremos terminales del casete de promotor-terminador de GAP para recuperar un fragmento de gen que codifica para *BamHI*-el promotor de GAP-la señal de secreción de aMF-la cadena pesada de anticuerpo-el terminador de GAP-*BamHI* (fragmento 1) y un fragmento de gen que codifica para *BamHI*-el promotor de GAP-la señal de secreción de aMF-la cadena ligera de anticuerpo-el terminador de GAP-*BamHI* (fragmento 2) a partir de YEp352GAP-II-alfHc y YEp352GAP-II-alfLc, respectivamente. Se introdujeron los fragmentos 1 y 2 en el sitio *BamHI* de YEp352GAP-II-alfHc o YEp352GAP-II-alfLc por medio de ligación de 3 fragmentos, de los que se había escindido el fragmento 1 ó 2. Se designó el vector resultante como YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc (figura 7). Basándose en patrones de escisión de enzima de restricción, se confirmó la introducción en tándem de los fragmentos 1 y 2 en el sentido de avance en YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc. YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc es un vector de expresión de anticuerpo que porta unidades de expresión tanto de cadena pesada de anticuerpo como de cadena ligera.

[Ejemplo 11] Construcción de vector de expresión del gen HAC1 activado de *S. cerevisiae*

La actividad ARNasa de IRE1 activado elimina 252 nucleótidos del ARNm precursor de HAC1 de *S. cerevisiae* para formar ARNm de HAC1 maduro. Este ARNm de HAC1 maduro se traduce en HAC1 activado del que se eliminan 10 residuos de aminoácido del extremo C-terminal y al que se añaden nuevamente 18 residuos de aminoácido (PNAS 97, págs. 4660-4665, 2000). Por tanto, se construyó un gen que codifica para HAC1 activado por medio de PCR de extensión por solapamiento usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos.

HAC-Sac-ATG: 5'-GGAGCTCATGGAAATGACTGATTTTG-3' (SEQ ID NO: 33)

HAC-internalR: 5'-GAATTCAAACCTGACTGCGCTTCTGGATTACGCCAATTGTCAA G-3' (SEQ ID NO: 34)

HAC-internalF: 5'-CTTGACAATTGGCGTAATCCAGAAGCGCAGTCAGGTTTGAATT C-3' (SEQ ID NO: 35)

HAC-Sma-STOP: 5'-GCCCCGGGTCATGAAGTGATGAAGAAATC-3' (SEQ ID NO: 36)

Se usó ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado con el uso de reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador HAC-Sac-ATG (SEQ ID NO: 33) y el cebador HAC-internalR (SEQ ID NO: 34) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Por separado, se llevó a cabo una PCR usando el cebador HAC-internalF (SEQ ID NO: 35) y el cebador HAC-Sma-STOP (SEQ ID NO: 36) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperaron los fragmentos de ADN diana amplificados de aproximadamente 0,66 kb (fragmento A) y de aproximadamente 0,06 kb (fragmento B).

Posteriormente, se usaron el fragmento A y el fragmento B amplificados como moldes para llevar a cabo una PCR usando el cebador HAC-Sac-ATG (SEQ ID NO: 33) y el cebador HAC-Sma-STOP (SEQ ID NO: 36) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces para obtener el fragmento de ADN diana amplificado de aproximadamente 0,7 kb. Se clonó el fragmento de ADN recuperado en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN de inserción, se encontró que el fragmento tiene un gen que codifica para HAC1 activado que comprende 238 residuos de aminoácido. El plásmido se designó como TOPO-aHac1. Se usaron el sitio de enzima de restricción *SacI* que se había introducido en el cebador HAC-Sac-ATG (SEQ ID NO: 33) y el sitio de enzima de restricción *SmaI* que se había introducido en el cebador HAC-Sma-STOP (SEQ ID NO: 36) para recuperar un gen que codifica para HAC1 activado por medio de digestión con *SacI-SmaI*.

Con el fin de expresar HAC1 activado en *S. cerevisiae*, se ligó un gen que codifica para HAC1 activado recuperado por medio de digestión con *SacI-SmaI* al sitio *SacI-SmaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP), que se había introducido en el vector lanzadera YEp351 de *E. coli*-levadura (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-aHAC1 (figura 7). Este vector comprende una unidad de expresión de gen HAC1 activado.

[Ejemplo 12] Construcción de vector de expresión del gen de RRPB1 de humano

Se usó el gen de RRPB1 de humano (KIAA1398, n.º de registro de GenBank: AB037819) facilitado por el Instituto de Investigación de ADN de Kazusa. Con el fin de introducir sitios de enzima de restricción en ambos extremos terminales del gen anterior, se amplificó el gen por medio de PCR usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos, P180kpnatg y P180xbastop (SEQ ID NO: 37 y 38) y el gen de RRPB1 de humano a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 6 minutos, y se repitió este ciclo 30 veces.

P180kpnatg: 5'-GGGTACCATGGATATTTACGACACTC-3' (SEQ ID NO: 37)

P180xbastop: 5'-GTCTAGATCAGACAGAGGTGCCCTCC-3' (SEQ ID NO: 38)

Se recuperó el fragmento resultante de aproximadamente 4.7 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN de inserción, se confirmó que regiones de aproximadamente 600 pb en ambos extremos terminales del fragmento de inserción comprendían de manera apropiada las secuencias de nucleótidos diana. Se designó el plásmido resultante como TOPO-P180. Posteriormente, se digirió TOPO-P180 con las enzimas de restricción *NdeI* y *HpaI*, y se eliminó un fragmento que contenía una región equivalente a una región de entre 110 pb y 4524 pb de KIAA1398. En la región eliminada, se introdujo un fragmento de *NdeI-HpaI* de aproximadamente 4,4 kb de KIAA1398 para construir TOPO-P180N, y se desmetiló el sitio de enzima de restricción *XbaI* con el uso de la cepa SCS110 de *E. coli* (Stratagene). Se usaron los sitios de enzima de restricción *KpnI-XbaI* que se habían introducido en el cebador P180kpnatg (SEQ ID NO: 37) y el cebador P180xbastop (SEQ ID NO: 38) para recuperar un fragmento de *KpnI-XbaI* que comprende un gen que codifica para RRBP1.

Con el fin de expresar RRBP1 en *S. cerevisiae*, se ligó el fragmento de *KpnI-XbaI* recuperado anterior al sitio *KpnI-XbaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP), que se había introducido en el vector lanzadera YEp352 de *E. coli*-levadura (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp352GAP-II-p180. Posteriormente, se digirió YEp352GAP-II-p180 con la enzima de restricción *PvuI*, y se recuperó un fragmento de *PvuI* que contenía el promotor de GAP-el gen de RRBP1-terminador de GAP. Se ligó el fragmento de *PvuI* a un fragmento de *PvuI* que comprende un gen marcador, es decir, una región esencial para la replicación del vector lanzadera YEp351 de *E. coli*-levadura (Yeast 2, págs. 163-167, 1986) para construir YEp351GAP-II-p180 (figura 7). Este vector comprende la unidad de expresión del gen de RRBP1.

[Ejemplo 13] Construcción de vector de coexpresión para el gen HAC1 activado y el gen de RRBP1

Con el fin de introducir el gen HAC1 activado y el gen de RRBP1 con el uso de un único vector en *S. cerevisiae*, se construyó un vector de coexpresión para el gen HAC1 activado y el gen de RRBP1. Se digirió YEp351GAP-II-aHAC1 construido en el ejemplo 11 con la enzima de restricción *HpaI*. Posteriormente, se recuperó un fragmento de *BamHI* que contenía el promotor de GAP-el gen de RRBP1-terminador de GAP de YEp352GAP-II-p180 construido en el ejemplo 12, se proporcionaron extremos romos a ambos extremos terminales usando ADN polimerasa de T4 (Takara Bio), y se introdujo el fragmento resultante en el sitio *HpaI* de YEp351GAP-II-aHAC1. Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-aHAC1/p180 (figura 7). Se analizó la secuencia de nucleótidos para determinar la dirección para introducir el fragmento de *BamHI* que contenía el promotor de GAP-el gen de RRBP1-terminador de GAP introducido. Este vector comprende una unidad de expresión para el gen HAC1 activado y el gen de RRBP1.

[Ejemplo 14] Construcción de cepa de levadura que expresa anticuerpos y cepa de levadura que expresa anticuerpos (*S. cerevisiae*) que expresa el gen HAC1 activado y el gen de RRBP1

Se prepararon células competentes de las cepas BY4741 de *S. cerevisiae* (MATa Δ his3 Δ leu2 Δ met15 Δ ura3) usando el kit Frozen-EZ Yeast Transformation II (ZYMO RESARCH). Se inocularon las cepas BY4741 de *S. cerevisiae* en 5 ml de medio YPAD (medio YPD que contenía adenina al 0,04% (Sigma)), y se usaron las células de levadura obtenidas del cultivo durante la noche (30°C a 310 rpm). Se introdujeron los vectores de expresión construidos en el ejemplo 10 al ejemplo 13 en las cepas BY4741 de *S. cerevisiae* usando el kit Frozen-EZ Yeast Transformation II (ZYMO RESARCH). Se seleccionaron los transformantes crecidos en medio agar ST que comprende agar al 2% (la base de nitrógeno de levadura y medio de sulfato de amonio que comprende glucosa al 2%, adenina al 0,04% y KCl 0,3 M y que carece de uracilo y leucina (Sigma)) como las cepas de levadura que expresan anticuerpos.

YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc que comprende las unidades de expresión de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo tiene el gen marcador URA3 que complementa la mutación que requiere uracilo de un huésped. YEp351 GAP-II (un vector de control en el que no se ha introducido el gen), YEp351GAP-II-aHAC1 (un vector de expresión de HAC1 activado), YEp351GAP-II-p180 (un vector de expresión de RRBP1) y YEp351GAP-II-aHAC1/p180 (un vector de coexpresión para el gen HAC1 activado y RRBP1) comprenden cada uno un gen marcador LEU2 que complementa la mutación que requiere leucina de un huésped. Por tanto, estos vectores se transformaron en un huésped, de modo que los genes sólo podían hacerse crecer cuando ambos vectores se introducían en combinación tal como se muestra a continuación para construir cuatro tipos de cepas de levadura que expresan anticuerpos.

T2K01 de *S. cerevisiae* YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc (URA3)YEp351 GAP-II (LEU2)

T2K02 de *S. cerevisiae* YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc (URA3)YEp351GAP-II-aHAC1 (LEU2)

T2K03 de *S. cerevisiae* YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc (URA3)YEp351GAP-II-p180 (LEU2)

T2K04 de *S. cerevisiae* YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc (URA3)YEp351GAP-II-aHAC1/p180 (LEU2)

[Ejemplo 15] Productividad de anticuerpos mediante cepa de levadura transformada (*S. cerevisiae*)

Se cultivaron las cepas T2K01 de *S. cerevisiae*, T2K02 de *S. cerevisiae*, T2K03 de *S. cerevisiae* y T2K04 de *S. cerevisiae* preparadas en el ejemplo 14 usando medio ST a 30°C durante 3 días. Se inoculó la disolución de cultivo en medio YPAD para dar como resultado una concentración final del 5% en el mismo, y se realizó el cultivo a 30°C durante 3 días. Se preparó un sobrenadante de cultivo a partir de la disolución de cultivo, y se designó el sobrenadante resultante como una muestra que contenía anticuerpos secretados y producidos por levadura. Se sometieron los anticuerpos secretados y producidos a un ensayo cuantitativo por medio de ELISA de tipo sándwich. Se adsorbieron proteínas de receptor de TRAIL que eran antígenos de los anticuerpos anti-receptor de TRAIL en una placa de 96 pocillos, se añadió una muestra de levadura, y se llevó a cabo la detección usando un anticuerpo anti-Fc específico de IgG humana marcado con peroxidasa (anticuerpo frente a IgG humana (Fc) purificado por afinidad marcado con peroxidasa (KPL)) y el sustrato ABTS peroxidasa (KPL). Se usaron los anticuerpos producidos en células animales (NS0) como muestras patrón.

Tal como se muestra en la figura 8A, la cepa T2K03 de *S. cerevisiae* en la que se sólo se había introducido el gen de RRP1 no era sustancialmente diferente de una cepa control, es decir, la cepa T2K01 de *S. cerevisiae*, en lo que se refiere a la productividad. Sin embargo, en el caso de la cepa T2K02 de *S. cerevisiae* en la que sólo se había introducido el gen HAC1 activado, la productividad fue aproximadamente el doble de la de la cepa control, es decir, la cepa T2K01 de *S. cerevisiae*. Además, la productividad de anticuerpos en la cepa T2K04 de *S. cerevisiae* en la que se coexpresaba el gen HAC1 activado y el gen de RRP1 fue significativamente mayor que la de la cepa control, es decir, la cepa T2K01 de *S. cerevisiae*, y una cepa en la que se había introducido únicamente el gen HAC1 activado o el gen de RRP1 (es decir, aproximadamente siete veces mayor que el control). Esto indica que la coexpresión del gen HAC1 activado y el gen de RRP1 produciría efectos equivalentes a o mayores que los efectos sinérgicos sobre la productividad de anticuerpos.

[Ejemplo 16] Productividad de anticuerpos en condiciones en las que se inhibe la formación de la cadena de O-azúcar usando la cepa de levadura transformada (*S. cerevisiae*)

Se cultivaron las cepas T2K01 de *S. cerevisiae*, T2K02 de *S. cerevisiae*, T2K03 de *S. cerevisiae* y T2K04 de *S. cerevisiae* preparadas en el ejemplo 14 usando medio ST a 30°C durante 3 días. Se inoculó la disolución de cultivo hasta una concentración final del 5% en medio YPAD al que se había añadido inicialmente 10 µM de inhibidor de PMT (el derivado de ácido rodanin-3-acético: ácido 5-[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metilen]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinacético (compuesto (1c) descrito en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 14, pág. 3975, 2004), y se realizó el cultivo a 30°C durante 3 días. Se preparó un sobrenadante de cultivo a partir de la disolución de cultivo, y se designó el sobrenadante resultante como una muestra que contenía anticuerpos secretados y producidos por levadura. De la misma manera que en el ejemplo 15, se sometió la muestra a ensayo cuantitativo por medio de ELISA de tipo sándwich usando anticuerpos producidos en células animales (NS0) como muestras patrón.

Tal como se muestra en la figura 8B, la productividad de anticuerpos de la cepa T2K02 de *S. cerevisiae* en la que se había introducido el gen HAC1 activado y la de la cepa T2K03 de *S. cerevisiae* en la que se había introducido el gen de RRP1 fueron aparentemente mayores que en la cepa control, es decir, la cepa T2K01 de *S. cerevisiae*. Además, la cantidad de anticuerpos producidos por la cepa T2K04 de *S. cerevisiae* en la que se coexpresaban el gen HAC1 activado y el gen de RRP1 fue significativamente mayor que en la cepa control, es decir, la cepa T2K01 de *S. cerevisiae*, y una cepa en la que se había introducido únicamente el gen HAC1 activado o el gen de RRP1 (es decir, aproximadamente ocho veces mayor que el control). Los efectos sinérgicos de la coexpresión del gen HAC1 activado y el gen de RRP1 sobre la producción de anticuerpos se potenciaron adicionalmente mediante la de la formación de la cadena de O-azúcar.

[Ejemplo 17] Preparación de la cepa deficiente en el gen YPS1 de proteasa de *Ogataea minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1)

Se escindió el vector deficiente en el gen YPS1, pDOMYP1, divulgado en el documento WO 2003/091431 con *Bam*HI y *Cla*I y se transformó en la cepa TK5-3 de *O. minuta* (Δ och1 Δ ura3 Δ ade1) divulgada en el documento WO 2003/091431 por medio de un método de impulsos eléctricos. Con el fin de confirmar que se perturbaban los genes YPS1 de tales genes, se sintetizaron los siguientes cebadores.

DY5; 5'-CTCAAGGGCCTGGAGACTACG-3' (SEQ ID NO: 49)

DY3; 5'-CGGGATTCCCAGAGTCGCTCACC-3' (SEQ ID NO: 50)

Se usó ADN cromosómico aislado de la cepa transformada como molde para llevar a cabo una PCR usando los cebadores DY5 y DY3 a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se detectó un fragmento de ADN de 3,7 kb amplificado de una cepa en la que se había introducido el plásmido en su locus de YPS1. Se designó la cepa seleccionada como la cepa YK4 de *O. minuta* (Δ och1 Δ ura3 Δ ade1 Δ yps1::URA3). Una vez cultivada la cepa YK4 de *O. minuta* en medio YPD hasta una fase

estacionaria, se obtuvieron cepas que mostraban resistencia a ácido 5-fluoroorótico (5-FOA). Se usó ADN cromosómico de la cepa resistente a 5-FOA como molde para llevar a cabo una PCR usando los cebadores DY5 y DY3 a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 3 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se detectó un fragmento de ADN de 1,2 kb amplificado a partir de una cepa que carecía de URA3. Esta cepa $\Delta och1\Delta ura3\Delta ade1\Delta yps1$ se designó como cepa YK5 de *O. minuta*.

[Ejemplo 18] Preparación de cepa productora de gen de anticuerpo sintético (*O. minuta*) y producción de anticuerpos

(1) Construcción de vector de expresión de gen de anticuerpo sintético

Se escindió pOMexGP1U divulgado en el documento WO 2003/091431 con *SpeI*, se le proporcionaron extremos romos, y entonces se ligó. Se sometieron el sitio *SaI* y el sitio EcoT22I del plásmido resultante a cambio de ligador con el sitio *SpeI* y el sitio *BamHI*, respectivamente. Se designó el plásmido resultante como pOMexGP1U Δ Sp.

Se diseñó un gen a partir de la secuencia de aminoácidos del gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO2002/094880) mientras se tenía en cuenta la frecuencia del uso de codones de *O. minuta*, y se sintetizó artificialmente un gen de anticuerpo a partir del mismo (Takara Bio). Se añadió la señal de lisozima de pollo o señal de SUC2 de *S. cerevisiae* al extremo N-terminal de los genes de la cadena ligera y la cadena pesada, y se añadieron secuencias de nucleótidos de los sitios de enzima de restricción (el sitio *XbaI* en el lado 5' y el sitio *BamHI* en el lado 3') a ambos extremos terminales (secuencias de nucleótidos: SEQ ID NO: 51, 53, 55 y 57; secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 52, 54, 56 y 58). Se introdujeron dos tipos de fragmentos de genes de cadena ligera que tenían diferentes señales que se habían digerido con *XbaI* y *BamHI* en el vector pOMexGP1A preparado en el ejemplo 1 (2). Se designaron los vectores resultantes como pOMexGPA/AbSUC y pOMexGPA/AbLys. Se introdujeron dos tipos de fragmentos de genes de cadena pesada que emitían diferentes señales que se habían digerido con *XbaI* y *BamHI* en el sitio *SpeI*-*BamHI* del vector pOMexGP1U Δ Sp. Se designaron los vectores resultantes como pOMexGPU Δ Sp/ AbSUC y pOMexGPU Δ Sp/AbLys.

Se usó pOMexPGHy (ejemplo 1 (3-4)) como molde para llevar a cabo una PCR usando el cebador de ADN PGKHy-F (SEQ ID NO: 59) y el cebador de ADN PGKHy-R (SEQ ID NO: 60) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, y se repitió este ciclo 20 veces. Por tanto, se amplificó el gen resistente a higromicina B.

PGKHy-F: 5'-ATAGAACTAGCAACTAGATGAAAAAGCCTGAACTCAC-3' (SEQ ID NO: 59)

PGKHy-R: 5'-CAAATCCCACGGATCACTATTCCTTTGCCCTCGGAC-3' (SEQ ID NO: 60)

Se introdujo el fragmento de gen amplificado en pOMexPGHy digerido con *SpeI*-*BglII* usando el kit In-Fusion (BD Bioscience), y se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de inserción. Se usó el plásmido resultante como molde para llevar a cabo una PCR usando el cebador de ADN PGKpUC-p (SEQ ID NO: 61) y el cebador de ADN PGKpUC-t (SEQ ID NO: 62) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 20 veces. Por tanto, se amplificó un fragmento de gen que contenía el promotor de PGK-gen resistente a higromicina B-terminador de PGK.

PGKpUC-p: 5'-AATTCGAGCTCGGTACAGGGATACATGGGATACCAAAG-3' (SEQ ID NO: 61)

PGKpUC-t: 5'-GAGGATCCCCGGGTACCAGGGTCGATTTTCTTGGTCTGA-3' (SEQ ID NO: 62)

Se introdujo el fragmento de gen amplificado en pUC118 digerido con *Asp718I* (Takara Bio) usando el kit In-Fusion (BD Bioscience), y se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de inserción. Se designó el plásmido resultante como PGKHyg/pUC118. Se digirió pOMexGP1U Δ Sp con *HindIII* y *KpnI*, se aisló un casete que comprendía el promotor-terminador de GAP, y se insertó el casete aislado en PGKHyg/pUC118 digerido con *HindIII*-*KpnI*. Se designó el plásmido resultante como GAP/HyG/pUC118. Posteriormente, se digirió pUC19 (Takara Bio) con *NdeI* y *EcoRI*, se le proporcionaron extremos romos y entonces se ligó para eliminar una región *NdeI*-*EcoRI* dentro de pUC19. Se digirió este plásmido con *HindIII*-*SacI*, y se introdujo un fragmento de gen que comprendía el promotor-terminador de GAP aislado de GAP/HyG/pUC118 por medio de digestión con *HindIII*-*SacI* y el promotor de PGK-gen resistente a higromicina B-terminador de PGK. Se designó el plásmido resultante como pOMexHy.

Se introdujo el fragmento de gen de cadena pesada de anticuerpo al que se había añadido la señal de lisozima de pollo digerida con *XbaI*-*BamHI* en pOMexHy tratado con *SpeI*-*BamHI*, y se designó el vector resultante como pOMexHy/AbLys.

(2) Preparación de cepa de levadura que expresa gen de anticuerpo

Se usaron los vectores de expresión de anticuerpos digeridos con *NotI*, es decir, pOMexGPA/AbLys y pOMexGPU Δ Sp/AbLys, para transformar la cepa YK5 de *O. minuta* ($\Delta och1\Delta yps1\Delta ura3\Delta ade1$) por medio de

electroporación. Se emplearon las condiciones para electroporación descritas en el documento WO 2003/091431. Se seleccionaron las células transformadas en medio de placa de agar SD (glucosa al 2%, base de nitrógeno de levadura al 0,67% (Difco)). Se cultivó una sola colonia en medio B2YP4G (base de nitrógeno de levadura al 1,34% (Difco), extracto de levadura al 2% (Difco), polipeptona al 4% (Difco), glicerol al 4% y tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0)) a 27°C durante 4 días. Se preparó un sobrenadante de cultivo a partir de la disolución de cultivo, se llevó a cabo análisis de tipo Western de la manera descrita en el ejemplo 7 para seleccionar una cepa productora de anticuerpos en la que se habían introducido genes de la cadena ligera y la cadena pesada de anticuerpo, y se designó la cepa resultante como la cepa AA1 de *O. minuta*. Tal como se muestra en la figura 9, la cantidad de anticuerpos secretados por la cepa AA1 de *O. minuta* fue significativamente mayor que la secretada por la cepa AO1 de *O. minuta* AO1 preparada en el ejemplo 5.

Se introdujeron los vectores de expresión de anticuerpos digeridos con *NotI*, es decir, pOMexGPA/AbSUC y pOMexGPU Δ Sp/AbSUC, en la cepa TK5-3 de *O. minuta* (Δ och1 Δ ura3 Δ ade1) descrita en el documento WO 2003/091431 para obtener una cepa YY1 de *O. minuta* que expresa anticuerpos. Se emplearon métodos de electroporación y selección de cepas descritos anteriormente.

[Ejemplo 19] Adquisición de gen HAC1 activado de *P. pastoris* y construcción de vector de expresión

Se obtuvo el gen HAC1 activado de *P. pastoris* a partir de las células (cepa GS115 de *P. pastoris*) de la misma manera que en el ejemplo 3. Se sintetizó el ADNc a partir de la cepa GS115 de *P. pastoris* de la misma manera que en el ejemplo 3. Se amplificó este ADNc por medio de PCR usando el cebador de ADN HACp1-1 (SEQ ID NO: 63) y el cebador HACp1-12 (SEQ ID NO: 64) mostrado a continuación a 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, y se repitió este ciclo 30 veces. Se clonó el producto amplificado en pCR2.1-TOPO (Invitrogen), y se confirmaron las secuencias de nucleótidos derivadas de los dos tipos de fragmentos de genes amplificados por PCR (SEQ ID NO: 65 y 66).

HACp1-1: 5'-ATGCCCGTAGATTCTTCTCATAAGACAGC-3' (SEQ ID NO: 63)

HACp1-12: 5'-CAAAGTCATTTAAATCAAATGCATTAGCGG-3' (SEQ ID NO: 64)

Una de las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 65) de los dos tipos de fragmento de ADNc obtenidos estaba de acuerdo con la secuencia genómica; sin embargo, la otra secuencia (SEQ ID NO: 66) era parcialmente deficiente y estaba acortada. Esto indica que tal secuencia deficiente era un fragmento de ADNc que se había sometido a corte y empalme mediante Irf1p activado por UPR. Con el fin de obtener ADNc de longitud completa de HAC1 activado, se llevó a cabo una PCR a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto usando el cebador de ADN speHACp1F (SEQ ID NO: 67) y el cebador de ADN bglHACp1R (SEQ ID NO: 68) mostrados a continuación y un conjunto de ADNc que se consideró que contenía el ADNc activado de HAC1 descrito anteriormente, y se repitió este ciclo 20 veces.

speHACp1F: 5'-gactagtATGCCCGTAGATTCTTCTCATA-3' (SEQ ID NO: 67)

bglHACp1R: 5'-cagatctCTATTCCTGGAAGAATACAAAGT-3' (SEQ ID NO: 68)

El fragmento resultante de aproximadamente 1 kb contenía una región entre el codón de iniciación y el codón de terminación del gen HAC1 activado de *P. pastoris* (SEQ ID NO: 69), que es equivalente a la secuencia de aminoácidos de Hac1p activado que comprende 304 residuos de aminoácido (SEQ ID NO: 70). Se trató el fragmento resultante con *SpeI* y *BglII*, se aisló, y entonces se introdujo en el pOMexPGHy tratado con *SpeI*-*BglII* (ejemplo 1 (3-4)). Se designó el vector resultante como pOMexPGHy/PpHac1. Este vector comprende la unidad de expresión del gen HAC1 activado derivado de *P. pastoris*.

[Ejemplo 20] Construcción de vector de expresión del gen HAC1 activado de *S. cerevisiae*

Se usó TOPO-aHac1 que contenía el gen HAC1 activado de *S. cerevisiae* preparado en el ejemplo 11 como molde para llevar a cabo una PCR usando el cebador de ADN SchAC-XbaF (SEQ ID NO: 71) y el cebador de ADN SchAC-BamR (SEQ ID NO: 72) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, y se repitió este ciclo 20 veces. Por tanto, se amplificó el gen HAC1 activado de *S. cerevisiae*.

SchAC-XbaF: 5'-gtctagaATGGAAATGACTGATTTTGAAC-3' (SEQ ID NO: 71)

SchAC-BamR: 5'-cggatccTCATGAAGTGATGAAGAAATCAT-3' (SEQ ID NO: 72)

Se digirió el fragmento resultante con *XbaI* y *BamHI*, y se recuperó un gen que codifica para HAC1 activado derivado de *S. cerevisiae*. Tras el aislamiento, se introdujo el gen en el pOMexPGHy tratado con *SpeI*-*BglII* (ejemplo 1 (3-4)). Se designó el vector resultante como pOMexPGHy/SchHac1. Este vector comprende la unidad de expresión del gen HAC1 activado derivado de *S. cerevisiae*.

[Ejemplo 21] Producción de anticuerpos por la cepa de *O. minuta* en la que se han introducido los genes HAC1 activados de *O. minuta*, *P. pastoris* y *S. cerevisiae*

(1) Preparación de la cepa de *O. minuta* en la que se han introducido los genes HAC1 activados de *O. minuta*, *P. pastoris* y *S. cerevisiae*

Se introdujeron el vector de expresión del gen HAC1 activado derivado de *O. minuta* digerido con Aor51HI; es decir, pOMexPGHy/Hac1, el vector de expresión del gen HAC1 activado derivado de *P. pastoris*; es decir, pOMexPGHy/PpHac1, y el vector de expresión del gen HAC1 activado derivado de *S. cerevisiae*; es decir, pOMexPGHy/SchHac1, en la cepa AA1 de *O. minuta* productora de anticuerpos hecha crecer en el ejemplo 18 por medio de electroporación. Se confirmó la introducción del gen HAC1 activado en la cepa transformada seleccionando cepas en medio de placa de agar YPD al que se había añadido higromicina B hasta una concentración de 50 µg/ml, cultivando las mismas, y extrayendo luego el genoma. Se sometió la cepa en la que se había introducido el vector de expresión del gen HAC1 activado derivado de *O. minuta*, pOMexPGHy/Hac1, a PCR usando el cebador de ADN speHAC1F (SEQ ID NO: 20) y el cebador bglHAC1R (SEQ ID NO: 21) descritos en el ejemplo 3. Se sometió la cepa en la que se había introducido el gen HAC1 activado derivado de *P. pastoris* a PCR usando el cebador de ADN speHACp1F (SEQ ID NO: 67) y el cebador bglHACp1R (SEQ ID NO: 68) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, y se repitió este ciclo 30 veces. Se sometió la cepa en la que se había introducido el gen HAC1 activado derivado de *S. cerevisiae* a PCR en las mismas condiciones, excepto por el uso del cebador de ADN SchHAC-XbaF (SEQ ID NO: 71) y el cebador SchHAC-BamR (SEQ ID NO: 72). Se designaron las cepas resultantes como la cepa AA2omH de *O. minuta*, la cepa AA2ppH de *O. minuta* y la cepa AA2scH de *O. minuta*. Simultáneamente, se introdujo pOMexPGHy digerido con Aor51HI en la cepa AA1 de *O. minuta* para obtener la cepa AA2Hy de *O. minuta* como control.

(2) Confirmación de la secreción de anticuerpos por cepa productora de anticuerpos en la que se había introducido el gen HAC1

Se cultivaron las cepas productoras de anticuerpos en las que se habían introducido los genes HAC1 preparados en (1) anteriormente; es decir, la cepa AA2omH de *O. minuta*, la cepa AA2ppH de *O. minuta*, la cepa AA2scH de *O. minuta* y la cepa AA2Hy de *O. minuta*, de la misma manera descrita en el ejemplo 18 (2), y se llevó a cabo análisis de tipo Western en condiciones no reductoras. Los resultados son tal como se muestra en la figura 10. Es decir, se observó de manera más significativa la adición de una cadena de azúcar a la molécula de anticuerpo pero no se observaron los efectos de aceleración notable de la secreción de agregados de anticuerpo-H2L2 en la cepa AA2omH de *O. minuta*, la cepa AA2ppH de *O. minuta* y la cepa AA2scH de *O. minutas*, en comparación con la cepa AA2Hy de *O. minuta* control preparada en (1) anteriormente. Por tanto, podían esperarse efectos de producción similares por medio de la introducción del gen HAC1 derivado de una especie deferente de un huésped.

(3) Productividad de anticuerpos secretores por la cepa de *O. minuta* productora de anticuerpos en la que se había introducido el gen HAC1 (cuantificación por medio de análisis homogéneo basado en TR-FRET)

Se aplicó tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,2) que comprende 12 µl de anticuerpo anti-IgG humana marcado con LANCE Eu-W1024 0,97 µg/ml (PerkinElmer), 8,3 µg/ml de anticuerpo de ratón anti-IgG humana conjugado con biotina (BD Bioscience), estreptavidina Surelight APC 16,7 µg/ml (PerkinElmer) y el 10% de Block Ace (Dainippon Pharmaceutical) a una placa de semiárea de 96 pocillos (Corning), y se introdujeron en la misma 2 µl de una disolución de muestra preparada diluyendo adecuadamente la disolución de cultivo preparada en (2) anteriormente con tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,2) que contenía el 10% de Block Ace, seguido por agitación. Se sometió la disolución de muestra a la reacción a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 hora, y entonces se sometió a ensayo la fluorescencia usando EnVision (PerkinElmer). Se determinó la cantidad de anticuerpos agregados producidos basándose en el valor a 665 nm/615 nm. Se usaron los anticuerpos producidos en células animales (CHO) como muestras patrón. Tal como se muestra en la figura 11, no se observó aceleración significativa de secreción de anticuerpos en la cepa AA2omH de *O. minuta*, la cepa AA2ppH de *O. minuta* y la cepa AA2scH de *O. minuta* en las que se habían introducido los genes HAC1 activados, en comparación con la cepa AA2Hy de *O. minuta*. Sin embargo, podían esperarse efectos similares de producción incluso por medio de introducción del gen HAC1 derivado de una especie diferente de un huésped.

(4) Producción de anticuerpos por la cepa de *O. minuta* en la que se había introducido el gen HAC1 usando inhibidor de PMT (1c)

Se inoculó un asa de siembra de platino de la cepa AA2omH de *O. minuta*, la cepa AA2ppH de *O. minuta*, la cepa AA2scH de *O. minuta* y la cepa AA2Hy de *O. minuta* en 5 ml de medio B2YP4G, se cultivó a 27°C durante 1 día, y entonces se diluyó con medio B2YP4G para ajustar la DO600 a 10. Se añadió al mismo el inhibidor de PMT descrito en el ejemplo 9 (1c: concentración de disolución madre: 10 mM) hasta una concentración de 2 µM en el mismo. Se realizó el cultivo a 27°C durante 3 días adicionales, se sometió a ensayo la DO600 cada 24 horas, y se añadieron 0,04 µM de cada inhibidor de PMT (1c) cuando el valor de DO600 aumentaba en 1. Se preparó un sobrenadante de cultivo a partir de la disolución de cultivo, y se midió la cantidad de producción de anticuerpos mediante el método

descrito en el ejemplo 21 (3). Los resultados se muestran en la figura 11. Se encontró que la cepa AA2omH de *O. minuta*, la cepa AA2ppH de *O. minuta* y la cepa AA2sch de *O. minuta* en las que se había introducido el gen HAC1 activado pueden presentar efectos más significativos de acelerar la secreción de anticuerpos cultivándolas con la adición del inhibidor de PMT, en comparación con la cepa AA2Hy de *O. minuta* control.

Por tanto, se encontró que se lograban efectos de aceleración de la secreción de anticuerpos con el uso de genes HAC1 de diferentes especies.

[Ejemplo 22] Aislamiento de gen de PMT derivado de *O. minuta*

Se obtuvo el gen de PMT1 derivado de *O. minuta* por medio de PCR usando ADN cromosómico de la cepa IFO10746 de *O. minuta* como molde y el cebador de ADN PM1-5 (SEQ ID NO: 73) y el cebador de ADN PM1-3 (SEQ ID NO: 74) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces.

PM1-5: 5'-ATGGCGGGCAAAA.AATCAGAAATCTAGCGCG-3' (SEQ ID NO: 73)

PM1-3: 5'-TTACAACTCGTCTTTGACTAGAGGCGGGGA-3' (SEQ ID NO: 74)

Se recuperó el fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 2,4 kb y se clonó usando el kit de clonación TOPO TA. Se aisló el ADN de plásmido del clon resultante, y se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de inserción (SEQ ID NO: 75) Por tanto, se seleccionó un clon que tenía una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 76), que es altamente homóloga a la secuencia de aminoácidos del gen de PMT1 derivado de *S. cerevisiae* del fragmento de ADN de inserción del plásmido. Se designó el plásmido aislado como pOmPM1.

Se obtuvo el gen de PMT2 derivado de *O. minuta* usando el cebador de ADN PM2-5 (SEQ ID NO: 77) y el cebador de ADN PM2-3 (SEQ ID NO: 78), se obtuvo el gen de PMT4 usando el cebador de ADN PM4-5 (SEQ ID NO: 79) y el cebador de ADN PM4-3 (SEQ ID NO: 80), se obtuvo el gen de PMT5 usando el cebador de ADN PM5-5 (SEQ ID NO: 81) y el cebador de ADN PM5-3 (SEQ ID NO: 82) y se obtuvo el gen de PMT6 usando el cebador de ADN PM6-5 (SEQ ID NO: 83) y el cebador de ADN PM6-3 (SEQ ID NO: 84), de la misma manera que en el caso del gen de PMT1. Se designaron los plásmidos que comprendían el gen de PMT2 (secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 85; secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 86), el gen de PMT4 (secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 87; secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 88), el gen de PMT5 (secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 89; secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 90) y el gen de PMT6 (secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 91; secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 92) como pOmPM2, pOmPM4, pOmPM5 y pOmPM6, respectivamente.

PM2-5: 5'-ATGGGCGAACGTACGGGCAAAAAGTGCCTC-3' (SEQ ID NO: 77)

PM2-3: 5'-CTAATCGGAAATTCTCCACGTGCTCAAGAG-3' (SEQ ID NO: 78)

PM4-5: 5'-ATGGGGCCCCAAAATAAAGACCGGCAAGAAA-3' (SEQ ID NO: 79)

PM4-3: 5'-CTATTTAGCAAAATGCAGTTTGATGTTGAG-3' (SEQ ID NO: 80)

PM5-5: 5'-ATGGACGAGAAAAACATCTCTGGCTTAGAA-3' (SEQ ID NO: 81)

PM5-3: 5'-CTACTCACTATAGACGGAGCAGTCGATCGA-3' (SEQ ID NO: 82)

PM6-5: 5'-ATGTCCGAGTCAGAGCTGAGAAACCGCAAA-3' (SEQ ID NO: 83)

PM6-3: 5'-CTAAGCTATACGCCAGGTGGAAACCCAGTT-3' (SEQ ID NO: 84)

[Ejemplo 23] Preparación del vector de perturbación o inactivación mediante inserción el gen de PMT para *O. minuta*

(1) Preparación del vector de inactivación mediante inserción del gen de PMT

(1-1) Preparación del gen de inactivación mediante inserción del gen de PMT1

Con el fin de aislar una secuencia parcial del gen de PMT1 con el uso de pOmPM1 obtenido en el ejemplo 22, se usaron el siguiente cebador de ADN PMT1hIII (SEQ ID NO: 93) y el cebador de ADN PMT1Kp (SEQ ID NO: 94) para llevar a cabo una PCR a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 15 veces.

PMT1hIII: 5'-caagcttGGACCTACAACACGTCCGAAGAA-3' (SEQ ID NO: 93)

PMT1Kp: 5'-cgggtaccGGTTTGATACCTTGGGTGGCACA-3' (SEQ ID NO: 94)

Se digirió el fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1,6 kb con *HindIII* y *KpnI* y se recuperó. Posteriormente, se digirió pPICZ α (Invitrogen) con *BglII* y se le proporcionaron extremos romos. Se insertó en el mismo el ligador *HindIII*, se digirió adicionalmente con *BamHI*, y se le proporcionaron extremos romos, seguido por inserción del ligador *KpnI*. Se designó el plásmido resultante como pZ-Hd-Kp. Se digirió pZ-Hd-Kp con *HindIII* y *KpnI*, se aisló un fragmento de ADN de 2,0 kb que contenía un gen resistente a zeocina, y se insertó en el mismo la secuencia parcial del gen de PMT1 amplificada por PCR. Se determinó la secuencia de nucleótidos de la secuencia parcial del gen de PMT1 insertado, y entonces se designó el plásmido resultante como pOmPM1dZ. pOmPM1dZ es capaz de inactivar mediante inserción la región estructural del gen (CDS) y la región de promotor del gen de PMT1 de *O. minuta* e inhibir la transcripción del gen de PMT1. Por separado, se digirió pOMexGPU Δ Sp preparado en el ejemplo 18 con *HindIII* y *KpnI*, se recuperó un fragmento de gen que contenía el promotor y el terminador de GAP, y se insertó el fragmento recuperado en el fragmento de ADN de 2,0 kb digerido con *HindIII-KpnI* que contenía el gen resistente a zeocina. Se designó el plásmido resultante como GAP/Z.

(1-2) Preparación del vector de inactivación mediante inserción del gen de PMT2

Con el fin de aislar una secuencia parcial del gen de PMT2 con el uso de pOmPM2 obtenido en el ejemplo 22, se usaron el siguiente cebador de ADN PMT2hIII (SEQ ID NO: 95) y el cebador de ADN PMT2Kp (SEQ ID NO: 96) para llevar a cabo una PCR a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 15 veces.

PMT2hIII: 5'-gaagcttACTACATAATTCGTGTACGTGTTC-3' (SEQ ID NO: 95)

PMT2Kp: 5'-cgggtaccGTCGCCGTATTGGTCAGCAATCTC-3' (SEQ ID NO: 96)

Se recuperó el fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1,5 kb y se digirió con *HindIII* y *KpnI*, y entonces se recuperó el fragmento digerido. Se insertó el fragmento de ADN obtenido en un fragmento de ADN de 2,0 kb que contenía un gen resistente a zeocina, que se había aislado de pZ-Hd-Kp por medio de digestión con *HindIII* y *KpnI*, y se determinó la secuencia de nucleótidos de la secuencia parcial del gen de PMT2 insertado. Se designó el plásmido resultante como pOmPM2dZ. pOmPM2dZ es capaz de inactivar mediante inserción la región estructural del gen (CDS) y la región de promotor del gen de PMT2 de *O. minuta* PMT2 e inhibir la transcripción del gen de PMT2.

(1-3) Preparación del vector de inactivación mediante inserción del gen de PMT4

Con el fin de aislar una secuencia parcial del gen de PMT4 con el uso de pOmPM4 obtenido en el ejemplo 22, se usaron el siguiente cebador de ADN PMT4FHdinf (SEQ ID NO: 97) y el cebador de ADN PMT4RKpinf (SEQ ID NO: 98) para llevar a cabo una PCR a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 15 veces.

PMT4FHdinf: 5'-GTCATGAGATCCaagctGATCCCTCAATGGAGATCTACT-3' (SEQ ID NO: 97)

PMT4RKpinf: 5'-GGTGTGTGGGGGATCgGGATGCAAATGGATGGCTCGAAC-3' (SEQ ID NO: 98)

Se insertó el fragmento de ADN obtenido de aproximadamente 1,5 kb en un fragmento de ADN de 2,0 kb que contenía un gen resistente a zeocina, que se había aislado de pZ-Hd-Kp por medio de digestión con *HindIII* y *KpnI* usando el kit In-Fusion (BD Bioscience). Se determinó la secuencia de nucleótidos de la secuencia parcial del gen de PMT4 insertado, y entonces se designó el plásmido resultante como pOmPM4dZ.

(2) Preparación del vector de perturbación del gen de PMT

(2-1) Preparación del vector de perturbación del gen de PMT5

Se digirió pROMU1 que contenía un fragmento de gen que tenía secuencias de repetición de aproximadamente 0,8 kb en el sentido de 5' y en el sentido de 3' del gen estructural URA3 de *O. minuta* divulgado en el documento WO 2003/091431 con *HindIII*, y se le proporcionaron extremos romos, seguido por inserción del ligador *BamHI*. Se digirió el vector resultante con *BamHI* y *BglII*, y se introdujo un fragmento de aproximadamente 3,3 kb que contenía secuencias de repetición y el gen URA3 de *O. minuta* en el pBluescript KS-(Stratagene) digerido con *BamHI*. Se designó el vector resultante como rURApBKS.

Se usó ADN cromosómico de la cepa IFO10746 de *O. minuta* como molde, se usaron el cebador de ADN PMT5maeF2 (SEQ ID NO: 99) y el cebador de ADN PMT5maeR (SEQ ID NO: 100) para llevar a cabo una PCR a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se recuperó el fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1,5 kb y se introdujo en el rURApBKS digerido con *BamHI-HindIII* usando el kit In-Fusion (BD Bioscience). Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de

gen insertado. Se designó el vector resultante como PMT5K/O/rURA3pre.

Se usó ADN cromosómico de la cepa IFO10746 de *O. minuta* como molde, se usaron el cebador de ADN PMT5ushiroF (SEQ ID NO: 101) y el cebador de ADN PMT5ushiroR (SEQ ID NO: 102) para llevar a cabo una PCR a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se recuperó el fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1,5 kb y se introdujo en el PMT5K/O/rURA3pre digerido con *NotI* usando el kit In-Fusion (BD Bioscience). Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de gen insertado. Se designó el vector resultante como PMT5K/O/rURA3.

PMT5maef2: 5'-GACGGTATCGATAAGCTTGATGCGCGGCCCTTCCGACCTT-3' (SEQ ID NO: 99)

PMT5maeR: 5'-CTGGGGAAGCTCGGATCCGGCTCGAGGTCTTCGTTTCA-3' (SEQ ID NO: 100)

PMT5ushiroF: 5'-CTAGTTCTAGAGCGGCCAGGTGCTTTCAGGCAGCAG-3' (SEQ ID NO: 101)

PMT5ushiroR: 5'-CACCGCGGTGGCGGCCAAGCTTGGGTACCGGCTCGCGTAG-3' (SEQ ID NO: 102)

(2-2) Preparación del vector de perturbación del gen de PMT6

Se usó ADN cromosómico de la cepa IFO10746 de *O. minuta* como molde, se usaron el cebador de ADN PMT6inf5'armF (SEQ ID NO: 103) y el cebador de ADN PMT6inf5'armR (SEQ ID NO: 104) para llevar a cabo una PCR a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 2 minutos y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se recuperó el fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 2,8 kb y se introdujo en el rURApBKS digerido con *Bam*HI usando el kit In-Fusion (BD Bioscience). Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de gen insertado. Se designó el vector resultante como PMT6K/O/rURA3pre.

Se usó ADN cromosómico de la cepa IFO10746 de *O. minuta* como molde, se usaron el cebador de ADN PMT6inf3'armF (SEQ ID NO: 105) y el cebador de ADN PMT6inf3'armR2 (SEQ ID NO: 106) para llevar a cabo una PCR a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 2 minutos y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se recuperó el fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 2,5 kb y se introdujo en el PMT6K/O/rURA3pre digerido con *NotI*-*Sac*II usando el kit In-Fusion (BD Bioscience). Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de gen insertado. Se designó el vector resultante como PMT6K/O/rURA3.

PMT6inf5'armF: 5'-GCAGCCCGGGGgatccACGAAACCACGTCCTACT-3' (SEQ ID NO: 103)

PMT6inf5'armR: 5'-GGGGAAGCTcggatcGACTCATCTTGAAACGCA-3' (SEQ ID NO: 104)

PMT6inf3'armF: 5'-AGTTCTAGAGCGGCCTTACCACCATTACATGCC-3' (SEQ ID NO: 105)

PMT6inf3'armR2: 5'-AATTGGAGCTCCACCGCGGCCGCAACTTACTCGACGCTAA-3' (SEQ ID NO: 106)

[Ejemplo 24] Preparación de cepa de *O. minuta* productora de anticuerpos con un gen de PMT perturbado o inactivado mediante inserción y evaluación de la misma

(1) Preparación de cepa de *O. minuta* productora de anticuerpos con un gen de PMT inactivado mediante inserción

En cuanto a los vectores de inactivación mediante inserción del gen de PMT preparados en el ejemplo 23, se digirió el vector de inactivación mediante inserción del gen de PMT1 con *Pst*I, se digirió el vector de inactivación mediante inserción del gen de PMT2 con *Xho*I y se digirió el vector de inactivación mediante inserción del gen de PMT4 con *Hind*III. Se introdujeron estos productos de digestión en la cepa YY1 de *O. minuta* productora de anticuerpos hecha crecer en el ejemplo 18 por medio de electroporación. Se confirmó la interrupción de genes de PMT en las cepas transformadas de la siguiente manera. Se seleccionaron cepas en medio de placa de agar YPD a las que se había añadido zeocina hasta una concentración de 50 µg/ml en el mismo y se cultivaron, seguido por extracción de los genomas. Se sometió el gen de PMT1 a PCR a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minutos, y se repitió este ciclo 30 veces, con el uso de un par de cebadores de DNA de Zeo1 (SEQ ID NO: 107) y PMT1zeo1 (SEQ ID NO: 109) y un par de cebadores de ADN de Zeo2 (SEQ ID NO: 108) y PMT1zeo2 (SEQ ID NO: 110). Se sometió el gen de PMT2 a PCR en las mismas condiciones, con el uso de un par de cebadores de ADN de Zeo1 (SEQ ID NO: 107) y PMT2zeo1 (SEQ ID NO: 111) y un par de cebadores de ADN de Zeo2 (SEQ ID NO: 108) y PMT2zeo2 (SEQ ID NO: 112). Se sometió el gen de PMT4 a PCR en las mismas condiciones, con el uso de un par de cebadores de ADN de Zeo1 (SEQ ID NO: 107) y PMT4PCR3'armF (SEQ ID NO: 113) y un par de cebadores de ADN de Zeo2 (SEQ ID NO: 108) y PMT4PCR5'armR3 (SEQ ID NO: 114). Por tanto, se confirmó la inactivación mediante inserción de los genes de PMT con la introducción de vectores de inactivación mediante inserción.

Zeo1: 5'-GAACGGCACTGGTCAACTTGGCCAT-3' (SEQ ID NO: 107)

Zeo2: 5'-CTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGA-3' (SEQ ID NO: 108)

PMT1zeo1: 5'-GAATTCTAGCCGAGCATGAGCTA-3' (SEQ ID NO: 109)

5 PMT1zeo2: 5'-CGTTCAGACTCTTGTTGATTTTCCAC-3' (SEQ ID NO: 110)

PMT2zeo1: 5'-GCTGTGCCACTGCACGCCTCGACTC-3' (SEQ ID NO: 111)

10 PMT2zeo2: 5'-CTTGTCCCTCTTGAATGGCGAGTG-3' (SEQ ID NO: 112)

PMT4PCR3'armF: 5'-GGAACACGCCAAACATCATG-3' (SEQ ID NO: 113)

PMT4PCR5'armR3: 5'-CACAAGCAGAATCAGGCAC-3' (SEQ ID NO: 114)

15 Se designaron las cepas resultantes como la cepa YY2P1 de *O. minuta* (una cepa con un gen de PMT1 inactivado mediante inserción), la cepa YY2P2 de *O. minuta* (una cepa con un gen de PMT2 inactivado mediante inserción) y la cepa YY2P4 de *O. minuta* (una cepa con un gen de PMT4 inactivado mediante inserción). Además, se introdujo GAP/Z digerido con Sse8387I en la cepa YY1 de *O. minuta*, y se seleccionó una cepa resistente a zeocina para obtener la cepa YY2Z de *O. minuta* como cepa control.

20 (2) Productividad de anticuerpos secretores por la cepa de *O. minuta* productora de anticuerpos con un gen de PMT inactivado mediante inserción

25 Se cultivaron las cepas productoras de anticuerpos con genes de PMT inactivados mediante inserción preparados en (1) anteriormente de la manera descrita en el ejemplo 18 (2), y entonces se llevó a cabo análisis de tipo Western. Los resultados se muestran en la figura 12 y la figura 14. Es decir, la cantidad de secreción de agregados de anticuerpo disminuyó ligeramente con respecto a la lograda por la cepa YY2P1 de *O. minuta* con un gen de PMT1 inactivado mediante inserción, la cepa YY2P2 de *O. minuta* con un gen de PMT2 inactivado mediante inserción y la cepa YY2P4 de *O. minuta* con un gen de PMT4 inactivado mediante inserción, en comparación con la cepa YY2Z de *O. minuta* preparada en (1) anteriormente (figura 12: carril 3 y carril 6; figura 14: carril 3).

30 (3) Productividad de anticuerpos secretores por la cepa de *O. minuta* productora de anticuerpos con un gen de PMT inactivado mediante inserción (cuantificación por medio de análisis homogéneo basado en TR-FRET)

35 Se midió la cantidad de anticuerpos producida en la disolución de cultivo preparada en (2) anteriormente mediante el método descrito en el ejemplo 21 (3). Como muestra patrón, se usaron anticuerpos producidos en células animales (CHO). Tal como se muestra en la figura 13 y la figura 15, las cantidades de agregados de anticuerpo secretadas aumentaron ligeramente en la cepa YY2P1 de *O. minuta* con un gen de PMT1 inactivado mediante inserción, la cepa YY2P2 de *O. minuta* con un gen de PMT2 inactivado mediante inserción y la cepa YY2P4 de *O. minuta* con un gen de PMT4 inactivado mediante inserción, en comparación con la cepa YY2Z de *O. minuta* preparada en (1) anteriormente (figura 13: YY2P1 y YY2P2; figura 15: YY2P4).

(4) Preparación de cepas deficientes en PMT5 y PMT6 y evaluación de las mismas

45 (4-1) Preparación de la cepa deficiente en el gen de PMT5 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt5)

50 Se digirió el vector de perturbación del gen de PMT5, PMT5K/O/rURA3, preparado en el ejemplo 23 (2-1) con *HindIII* y se transformó en la cepa YK5 de *Ogataea minuta* (Δ och1 Δ ura3 Δ ade1 Δ yps1) preparada en el ejemplo 17 por medio del método de impulsos eléctricos. Con el fin de confirmar que se habían perturbado los genes de PMT5 de estas cepas, se sintetizaron los siguientes cebadores.

gPMT5-5: 5'-CGGTGACGACTTCGACTAGTCGAG-3' (SEQ ID NO: 115)

55 gPMT5-2: 5'-CGGTGCTGTTGGCGTCGTCATGGGTG-3' (SEQ ID NO: 116)

gPMT5-3: 5'-GGCGCGTTCCAATTCCACTCTGCTG-3' (SEQ ID NO: 117)

gPMT5-4: 5'-CGACGAGTCCTCTCACCAGGAGGTTG-3' (SEQ ID NO: 118)

60 Se usó ADN cromosómico aislado de la cepa transformada como molde para llevar a cabo una PCR usando el cebador gPMT5-5 (SEQ ID NO: 115) y el cebador gPMT5-2 (SEQ ID NO: 116) a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se detectó un fragmento de ADN amplificado de 4,9 kb de una cepa en la que se había incorporado un plásmido en su locus de PMT5. De manera similar, se usó ADN cromosómico aislado de la cepa transformada como molde para llevar a cabo una PCR usando el cebador gPMT5-3 (SEQ ID NO: 117) y el cebador gPMT5-4 (SEQ ID NO: 118) a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se detectó un fragmento de ADN

amplificado de 4,9 kb de una cepa en la que se había incorporado un plásmido en su locus de PMT5. Se designó la cepa seleccionada como la cepa YK6 de *O. minuta* ($\Delta och1\Delta ura3\Delta ade1\Delta yps1\Delta pmt5::URA3$).

(4-2) Preparación de la cepa deficiente en el gen de PMT6 de *O. minuta* ($\Delta och1\Delta yps1\Delta ura3\Delta ade1\Delta pmt6$)

Se digirió el vector de perturbación del gen de PMT6, PMT6K/O/rURA3, preparado en el ejemplo 23 (2-2) con *Bam*HI y *Not*I y entonces se transformó en la cepa YK5 de *O. minuta* ($\Delta och1\Delta ura3\Delta ade1\Delta yps1$) preparada en el ejemplo 17 por medio del método de impulsos eléctricos. Con el fin de confirmar que se habían perturbado los genes de PMT6 de estas cepas, se sintetizaron los siguientes cebadores.

PMT6 PCR3'armF: 5'-TGTGGGTGCGATCCTGAG-3' (SEQ ID NO: 119)

PMT6 PCR3'armR: 5'-GCCGTCGTTGGAGCAAAACT-3' (SEQ ID NO: 120)

PMT6 PCR5'armF: 5'-GCATGTGCCACTGCTAAA-3' (SEQ ID NO: 121)

PMT6 PCR5'armR: 5'-GACCAACTTTCCCGTGTA-3' (SEQ ID NO: 122)

Se usó ADN cromosómico aislado de la cepa transformada como molde, se usaron el cebador PMT6 PCR3'armF (SEQ ID NO: 119) y el cebador PMT6 PCR3'armR (SEQ ID NO: 120) para llevar a cabo una PCR a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se detectó un fragmento de ADN amplificado de 5,8 kb de una cepa en la que se había incorporado un plásmido en su locus de PMT6. De manera similar, se usó ADN cromosómico aislado de la cepa transformada como molde para llevar a cabo una PCR usando el cebador de PMT6 PCR5'armF (SEQ ID NO: 121) y el cebador de PMT6 PCR5'armR (SEQ ID NO: 122) a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se detectó un fragmento de ADN amplificado de 6,3 kb de una cepa en la que se había incorporado un plásmido en su locus de PMT6. Se designó la cepa seleccionada como la cepa YK7 de *O. minuta* ($\Delta och1\Delta ura3\Delta ade1\Delta yps1\Delta pmt6::URA3$).

(5) Preparación de cepa de *O. minuta* productora de anticuerpos en la que se habían perturbado los genes de PMT5 y PMT6

Se usaron el vector de expresión de anticuerpo digerido con *Not*I, pOMexGPA/AbLys, (preparado en el ejemplo 18 (1)) y el vector de expresión de anticuerpo digerido con *Sse*8387I, pOMexHy/AbLys, (preparado en el ejemplo 18 (1)) para transformar la cepa YK6 de *O. minuta* ($\Delta och1\Delta yps1\Delta ura3\Delta ade1\Delta pmt5::rURA3$) y la cepa YK7 de *O. minuta* ($\Delta och1\Delta yps1\Delta ura3\Delta ade1\Delta pmt6::rURA3$) por medio de electroporación. Se seleccionaron las células transformadas en medio de placa de agar SD (glucosa al 2%, base de nitrógeno de levadura al 0,67% (Difco)) al que se había añadido higromicina B a una concentración de 50 µg/ml en el mismo. Se cultivó una única colonia en medio B2YP4G (base de nitrógeno de levadura al 1,34% (Difco), extracto de levadura al 2% (Difco), polipeptona al 4% (Difco), glicerol al 4%, tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0)) a 27°C durante 4 días. Se preparó un sobrenadante de cultivo a partir de la disolución de cultivo, se llevó a cabo análisis de tipo Western mediante el método descrito en el ejemplo 7, y se seleccionaron cepas productoras de anticuerpos en las que se habían introducido genes de la cadena ligera y la cadena pesada de anticuerpo. Se designaron las cepas resultantes como la cepa AP5 de *O. minuta* (la cepa deficiente en el gen de PMT5) y la cepa AP6 de *O. minuta* (la cepa deficiente en el gen de PMT6). Por separado, se introdujeron el vector de expresión de anticuerpo digerido con *Not*I, pOMexGPA/ AbLys, y el pOMexHy/AbLys digerido con *Sse*8387I en la cepa YK4 de *O. minuta* ($\Delta och1\Delta ura3\Delta ade1\Delta yps1::rURA3$) por medio de electroporación, y se prepararon cepas productoras de anticuerpos y se seleccionaron como cepas control de la misma manera descrita anteriormente. Se designaron las cepas obtenidas como cepas Acon de *O. minuta*.

(6) Productividad de anticuerpos secretores por una cepa de *O. minuta* productora de anticuerpos en la que se habían perturbado los genes de PMT5 y PMT6

Se cultivaron la cepa AP5 de *O. minuta* en la que se había perturbado el gen de PMT5 y la cepa AP6 de *O. minuta* y la cepa Acon de *O. minuta* en la que se había perturbado el gen de PMT6 de la misma manera descrita en el ejemplo 18 (2), y se llevó a cabo análisis de tipo Western no reductor. Se midió la cantidad de anticuerpos producida en la disolución de cultivo de la misma manera descrita en el ejemplo 21 (3). Como muestra patrón, se usaron anticuerpos producidos en células animales (CHO). Los resultados se muestran en la figura 16. Es decir, no hubo diferencia significativa en la productividad de agregados de anticuerpo entre la cepa AP5 de *O. minuta* o la cepa AP6 de *O. minuta* y la cepa Acon de *O. minuta* control.

[Ejemplo 25] Preparación de la cepa de *O. minuta* con un gen de PMT inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 introducido en la misma y evaluación de la misma

(1) Preparación de la cepa de *O. minuta* con un gen de PMT inactivado mediante inserción en la que se había introducido el gen HAC1

Se digirió el vector de expresión del gen HAC1 activado derivado de *O. minuta*, pOMexPGHy/Hac1, preparado en el ejemplo 3 con Aor51HI y se introdujo en la cepa YY2P2 de *O. minuta* (una cepa con un gen de PMT2 inactivado mediante inserción), la cepa YY2P4 de *O. minuta* (una cepa con un gen de PMT4 inactivado mediante inserción) y la cepa YY2Z de *O. minuta* (la cepa control), que se había preparado en el ejemplo 24 (1), por medio de electroporación. Con el fin de confirmar que se había introducido el gen HAC1 activado en la cepa transformada, se seleccionaron las cepas en medio de placa de agar YPD al que se había añadido higromicina B a una concentración de 50 µg/ml en la misma, se cultivaron las cepas, se extrajeron los genomas, y se llevó a cabo una PCR, según el método del ejemplo 6. Se designaron las cepas obtenidas como la cepa YY3P2omH de *O. minuta* (la cepa con un gen de PMT2 inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 introducido en la misma), la cepa YY3P4omH de *O. minuta* (la cepa con un gen de PMT4 inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 introducido en la misma) y la cepa YY3ZomH de *O. minuta* (la cepa control en la que se había introducido el gen HAC1). Simultáneamente, se introdujo pOMexPGHy digerido con Aor51HI en la cepa YY2Z de *O. minuta*, y se obtuvo la cepa YY3ZHy de *O. minuta* (la cepa control en la que se había introducido un vector) como cepa control.

(2) Productividad de anticuerpos secretores por la cepa de *O. minuta* con un gen de PMT inactivado por inserción y con el gen HAC1 introducido en la misma

Se cultivaron las cepas productoras de anticuerpos con un gen de PMT inactivado por inserción y con el gen HAC1 introducido en las mismas preparadas en (1) anteriormente mediante el método descrito en el ejemplo 18 (2), y se llevó a cabo análisis de tipo Western. Los resultados se muestran en la figura 12 y la figura 14. Se encontró que la cepa YY3P2omH de *O. minuta* con un gen de PMT2 inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 introducido en la misma secretaba una cantidad significativamente mayor de anticuerpos que la cepa YY3ZomH de *O. minuta* en la que sólo se había introducido el gen HAC1 y la cepa YY2P2 de *O. minuta* con un gen de PMT2 inactivado mediante inserción (figura 12: carril 7). Se encontró que la cepa YY3P4omH de *O. minuta* con un gen de PMT4 inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 introducido en la misma secretaba una cantidad significativamente mayor de anticuerpos que la cepa YY3ZomH de *O. minuta* en la que sólo se había introducido el gen HAC1 y la cepa YY2P4 de *O. minuta* con un gen de PMT4 inactivado mediante inserción (figura 14: carril 6).

Se midió la cantidad de anticuerpos producida en la disolución de cultivo mediante los métodos descritos en el ejemplo 8 y en el ejemplo 21 (3). Como muestra patrón, se usaron anticuerpos producidos en células animales (CHO). Los resultados se muestran en la figura 13 y en la figura 15. Se encontró que la cepa YY3P2omH de *O. minuta* con un gen de PMT2 inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 introducido en la misma secretaba una cantidad significativamente mayor de agregados de anticuerpo que las cepas control, es decir, la cepa YY3ZomH de *O. minuta* (una cepa en la que sólo se había introducido el gen HAC1), la cepa YY2P2 de *O. minuta* (una cepa con un gen de PMT2 inactivado mediante inserción) y la cepa YY3ZHy de *O. minuta* (una cepa control en la que se había introducido un vector) (figura 13: cepa YY3P2omH de *O. minuta*). Además, se encontró que la cepa YY3P4omH de *O. minuta* con un gen de PMT4 inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 introducido en la misma secretaba una cantidad significativamente mayor de anticuerpos que las cepas control, es decir, la cepa YY3ZomH de *O. minuta* (una cepa en la que sólo se había introducido el gen HAC1), la cepa YY2P4 de *O. minuta* (una cepa con un gen de PMT4 inactivado mediante inserción) y la cepa YY3ZHy de *O. minuta* (una cepa control en la que se había introducido un vector) (figura 15: la cepa YY3P4omH de *O. minuta*).

[Ejemplo 26] Producción de anticuerpos por cepa de *O. minuta* con un gen de PMT inactivado por inserción y con el gen HAC1 introducido en la misma usando el inhibidor de PMT (1c)

Se inoculó un asa de siembra de platino de cepas productoras de anticuerpos con un gen de PMT inactivado por inserción y con el gen HAC1 introducido en las mismas preparadas en el ejemplo 25 (1) en 5 ml de medio B2YP4G, se cultivaron a 27°C durante 1 día, y se diluyeron con medio B2YP4G para ajustar la DO600 a 10. Se añadió la disolución resultante a los inhibidores de PMT descritos en el ejemplo 9 (1c; concentraciones de disoluciones madre: 0,1 mM, 0,5 mM, 2,5 mM y 10 mM) hasta concentraciones de 0,016 µM, 0,08 µM, 0,4 µM y 2,0 µM, respectivamente. Se realizó el cultivo a 27°C durante 3 días adicionales, se midió la DO600 cada 24 horas y se añadieron inhibidores de PMT (1c) en cantidades de 0,00032 µM, 0,0016 µM, 0,008 µM y 0,04 µM, respectivamente, cuando el valor de DO600 aumentaba en 1. Se preparó un sobrenadante de cultivo a partir de la disolución de cultivo, y se llevó a cabo análisis de tipo Western mediante el método descrito en el ejemplo 18 (2). Los resultados se muestran en la figura 17. Además, se cuantificó la productividad de anticuerpos secretores mediante el método descrito en el ejemplo 21 (3). Los resultados se muestran en la figura 18. Se logró la mayor productividad de anticuerpos en la cepa YY3P2omH de *O. minuta* (una cepa con un gen de PMT2 inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 introducido en la misma) cuando se añadió inhibidor de PMT aproximadamente 0,008 µM (concentración de disolución madre: 2,5 mM) cuando el valor de DO600 aumentaba en 1. Se logró la mayor productividad de anticuerpos en la cepa YY3P4omH de *O. minuta* (una cepa con un gen de PMT4 inactivado mediante inserción y con el gen HAC1 introducido en la misma) cuando se añadió inhibidor de PMT aproximadamente 0,04 µM (concentración de disolución madre: 10 mM) cuando el valor de DO600 aumentaba en 1. Puede deducirse que la adición de cadena de azúcar se inhibe fuertemente mediante la inhibición de la expresión del gen de PMT y el uso de inhibidores de PMT en combinación. Con el fin de inhibir la adición de cadena de azúcar en relación con la cepa

en la que se había introducido HAC1, puede esperarse una productividad superior de anticuerpos agregados mediante la inhibición de la actividad de la proteína PMT con la inhibición de la expresión del gen de PMT y el uso de inhibidores de PMT en combinación.

5 [Ejemplo 27] Evaluación del inhibidor de PMT (5a)

Se inoculó un asa de siembra de platino de las cepas YY1 de *O. minuta* en la que se habían introducido genes de anticuerpo en 5 ml de medio B2YP4G, se cultivaron a 27°C durante 1 día, y se diluyeron con medio B2YP4G para ajustar la DO600 a 10. Se añadió a las mismas un inhibidor de PMT (ácido {(5Z)-4-oxo-5-[3-(1-feniletoxi)-4-(2-feniletoxi)benciliden]-2-tioxo-1,3-tiazolidin-3-il}acético (compuesto-5a descrito en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 14, pág. 3975, 2004) que es diferente del inhibidor de PMT (1c) descrito en el ejemplo 9 para dar como resultado una concentración de 1 μ M en ellas. Se realizó el cultivo a 27°C durante 3 días adicionales, se midió la DO600 cada 24 horas y se añadió el inhibidor de PMT en cantidades de 0,02 μ M cuando el valor de DO600 aumentaba en 1. Se preparó un sobrenadante de cultivo a partir de la disolución de cultivo, se llevó a cabo análisis de tipo Western mediante el método descrito en el ejemplo 18 (2), y se cuantificó la productividad de anticuerpos secretados mediante el método descrito en el ejemplo 21 (3). Los resultados se muestran en la figura 19 y en la figura 20. Se consideró que la productividad de agregados de anticuerpo tendía a aumentar por medio de la adición del inhibidor de PMT (5a), que se había examinado nuevamente. Por tanto, se consideró que el inhibidor de PMT (5a) tenía efectos equivalentes a los del inhibidor de PMT (1c) descrito en el ejemplo 9.

20 Aplicabilidad industrial

La presente invención permite la producción secretora de alto nivel de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos en levadura.

25 Lista de secuencias

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Método para la producción secretora de alto nivel de proteínas

<130> PH-3149-PCT

<150> JP2006-136993

<151> 16-05-2006

<160> 122

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador

<400> 1

gngtngaytt yaaygtncn ttrga

25

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador

<400> 2

gynacdccng gyaaytcytt dccytc

26

<210> 3

<211> 9046

<212> ADN

<213> *Ogataea minuta*

<220>
 <221> CDS
 <222> (4766).. (6016)

5 <400> 3
 ggatcccgcc ctcgacgggt gttggtgcgg gataatgttc gttgatgagc caacttcgat 60
 ttttgctgaa acgactgaga cagatccgac agacgaggtg tagttgcgga tcagattttg 120
 catcactctg ctgtttcttt tgatgtgtct ttcgtcgtcc tggaaccccc aactcgatag 180
 cagcgaaagg actttgtcgt ctcgtccac aagcgatagt tttggacgag ctagatatgg 240
 attgacgtag cttcttgtcg aggtggcgga ctcttttttg atgtgggttt cggtaacgga 300
 ttccgacttg gcatgtgatt caatcactcc ctcgtagtgg gacgacacca cgctcatgtt 360
 gtcgtcgtcc tgttgtccgc tgaagtcaaa cggattgctt tttctgtcaa cgggtgtcgac 420
 gacagcgtca acgctcaaca gatctgagtc cacagtctcg acgctggaga cgtccgactc 480
 atgaacagga tacctgaaat tcatctgggt cccaagaaac gtgtctgtgt gtgtctttct 540
 gtgctgtctt ttcgtcattg cttgatattc cccctaaata gttatcacgt acggaactct 600
 ggtaaaaaaa cctgatccgt ttcagatcaa ctacatttaa aatcaggttg ttcctccagc 660
 cccggcgga gctaaagatg gctgggtttt tcaatcagat ggtgaaatat taattttttt 720
 gagccgcaac ccagccccag atccgaggct gtgcagcaga ttcggtcgat aatgtacaa 780
 cgactatgct aaatagggag tgaaaagcag caaaaaaaat gtcttagagg tagtaccttg 840
 gttcttcaaa gacatggaat ttgtggtctc tgaccccatc tccatagaac atcgatggga 900
 atcggaggtc tggatcaacg gtttcctcgt ctatccgctg ttgcgagtag ctttcgtcgt 960
 agtctccatt ggagggtatg ataaatttac ccacctgaac ctcagtgtcg gtgatggacc 1020
 cagcactgat ccgagcatac ccggttcttt tgagtttctt gtacaagatg tactcgcacc 1080

aacgatcgctc atcagtagcg tcgatatcgt gcattcctga cttgtcgctc acgtaggtgt 1140
 tgtaattccc cttgaggggt tcggtcacca agtagctcaa caggatcatt ggcctttctg 1200
 aactgcccac aatttcggaa acaccgagag attgtaaacg gcggtcctca acgtcctctt 1260
 cttgtcccga atggaaaacg acaacgtcca cgagctctcc gtaacagtcc agagtagcgt 1320
 ggatggcagg agccaattcg cccacaggag acggaagcaa gtgatgcgtg gaattgatga 1380
 tcggaaactt ggacaaaagg gccgcacccc aggtatgttt cgttgggttc ggaccgaaat 1440
 cggcgtagat gccgagttct tcggcaattc tttgggtgag atctctgttt cccatgatga 1500
 ttctttgagt gtccgattct aataaaccca caacgtccaa ctccaggtct ttgatcaggt 1560
 ctctcattct gtgctcagat gcccacatgt cgttatcgag accaaagtga atggtccaaa 1620
 taccagccgt gacaagtctg gactggggat ggtagggctt tggtttttcg aactggaatc 1680
 tgttgaaagc gataaatccc gagagcagtg taaagaaaat gaggttaattt gtgatttttt 1740
 tcaacgacga cttcagtcgc tttgaatgcg aaacttcaga ctgctttag ttgaaaacaa 1800
 gaccgcaaat catcagaact gaaacagaca ggatgatatc tgtttttct ctcaacaatg 1860
 gtccaccggg aacaaaggca tatgcgacaa cccagacgtg agccaaagag agcactatgt 1920
 caaacaggaa cgaaagacca aacactagag ccacgccgtc cactttggaa acctgatcaa 1980
 aacaaacagg agtgatgaaa cacagccaga aagcgtatgc cagcccacca gcgtaactga 2040
 tccagccgtt gaaatagtac aggaacaaag ctccgagaac tccgcataa gtgacagact 2100
 tntaggaact ggaccggtag aatccgaaaa aggtccttag acacatgaaa atcaccgtca 2160
 ccgcaccgtg gggaacaggg atcggccgtg tgataggata gccctcccat gtccacagaa 2220
 caatggtaga agagtcggta agcatggcac taatcgagaa aatcagagat ccaaaaccca 2280
 tggtgacag cataagagaa ggcttttgag tcttaagtgg gcctttctca gatacagtcc 2340

cctgtggtag ctttgtgaaa gctgcagctg tcaatccgac aactagaccg gtgaggttcc 2400
accacccggt gtcgctgttc atgatgggcc aaataggatt attggtccag aacgcaaact 2460
tggcgagact ggacagaatg agccccattg taaacgaggt tgcaaacgtt ttcgtagcca 2520
gttgatcatt cagtttgcca atggcagcca cttcggtact taaggcaatg gttgcgaacg 2580
aaacagccgc gccataaacc atcaatctgc aggcagggtc taccaccaag taagccccc 2640
caccgaacaa acaggtgagc gttctagcga cttgaggacg ttttgtgaaa aacagcttca 2700
cctttggaac tgccaagaca aacggagtca atagaaggac acagactgcc tcgtatcccg 2760
agattcccat gtaccacagc gggaagtacc agatacagag gaacaatgag gagtagacag 2820
accagaaaac gaaccaattg atggtgtcga cagtgagttg ccagaaagag ctgctgaact 2880
gagtcgactt cggtaatagc ttcccgtgg aggttggggc cgaggaactt gaagtgccgt 2940
ttattctgtc ttgaatgagc ttgatgtcga aattggcact gaaaaattcg tctcttggtg 3000
ctgaaggctc gagctcgatg atcaggtctt tgaagtccaa gatggaccag gcatcaaagc 3060
caacatcaag aaagatcaac gccattcgc agtatgcgta gtaagaataa gctcccttga 3120
cgtgatgaac cttgtgctgg ataaaaagat acaccagagg gacaagtga ccaaaaaatg 3180
tccatgcggt gtacttctg gctcttctga tcctggaccg tgggtggggac agcttggtga 3240
tagcgaggtc ccacgggata gtcaggacaa tgtaggagat cataaacaca tcgtgcgcgt 3300
cgtgatcatc cgtagaagta atataaacc agcctccaca cgtgatggtt ctgatgaagc 3360
ccgatatcag ggcaagttta gggtacactg aattggcctt gtgcagacga acatacgtta 3420
gtagcagtag taagaaccga ggaccagctg taagcgcgat caaaatctgg aagattgacc 3480
gttcaggata tctgtcacca atggtggccg agacactcgg gaaccactcg tctggatacc 3540
cataatactc gttctcaacg attttgtaaa aatggagcca gcaccaaca gccaaaggcag 3600

ctaaaaaggc agagagcgag cacacagagt gtgcgatcgc aatggcctgt gagttcaacc 3660
 gcactagagg ctgcgagttg ggcccgtctg gaactgccat gatgataaat tgcgagcaaa 3720
 ttgggtgaac atcagcacta aagcgacttg ttcccatcag aatctttaa aacaacacct 3780
 gaaatggacg ttttcagaga tcaggtgtaa ggggtgtttgc ttggaaaaac acgaggaaaa 3840
 gagcttgggc tgggaacacc cgtacaccgg atctagctcc tggctgcggg atctggattt 3900
 aggaaaaaaa caaacgcac gaatgagctt tgtcgcttt agcagagggt agaggtgata 3960
 cactagacag caagagattg gaaaatggcg ggtaagtcgg ctgttgatga aatcttgatg 4020
 acaactactg acatggaaca gaaatcaaag agaaacctga atttagaaag tcgccagacg 4080
 tttcgttcga cgagattgat tacagagacc cgcttgctct aaaaaggca caggagtcga 4140
 tgctgagaga gcagttcatc agaattgagg ttctgaaggt ggtgagaaaa gcgctagaga 4200
 attgctggag ggtgaacggg cccaacggac acgaagagt cggggacctg gccgacaagt 4260
 acctagacat gctgcaaac tcccggggcc aggatacat gggataccaa agaaacgacc 4320
 cgtccaaata ggctggctgc ggctggctgc ggctggctgc agaccgaccg caaaccaact 4380
 gcaggcttgt tgtaggctga ttatttattg actatttatt gaatatttat tgcaccactt 4440
 gtgtgtccc cttgaccatg cgtcgatcga cgcgcgaggc ttaggaagcc cggagcgggg 4500
 aattcacgtg gtgtacgggt gtggaggtct agcacccgag ttttcggaga ggcagatgat 4560
 gcatctccgg ggagtgtcag gcaaggagga atgggcagat cgacggaaga aaggatata 4620
 aaatgttata tttgcacttg tttttgtgaa tatcagcacc caaacaaaat aagacaactt 4680
 atcagtttct taagtattac aagtgagtaa ttgtcaacca gcacagctgt cgtagtgtaa 4740
 aactaacgc cgcatagaac tagca atg tcg tta tcc agc aag ctg tca gtt 4792

Met Ser Leu Ser Ser Lys Leu Ser Val

1

5

aag gac ttg gac gtc tcg ggc aag aga gtg ttc ata aga gtg gac ttc	4840
Lys Asp Leu Asp Val Ser Gly Lys Arg Val Phe Ile Arg Val Asp Phe	
10 15 20 25	
aat gtt cca ttg gac gga gac aag atc acc aac aac caa aga att gtc	4888
Asn Val Pro Leu Asp Gly Asp Lys Ile Thr Asn Asn Gln Arg Ile Val	
30 35 40	
gct gct ttg cca acc att cag tac gtt ctt gag aac aag cca aag gtg	4936
Ala Ala Leu Pro Thr Ile Gln Tyr Val Leu Glu Asn Lys Pro Lys Val	
45 50 55	
gtt gtt ttg gcc tcc cac ttg ggc aga ccc aac gga gag aag aac ctc	4984
Val Val Leu Ala Ser His Leu Gly Arg Pro Asn Gly Glu Lys Asn Leu	
60 65 70	
aag tac aca ttg aag cct gtc gcc aag gaa ctg gag act ctt ttg ggc	5032
Lys Tyr Thr Leu Lys Pro Val Ala Lys Glu Leu Glu Thr Leu Leu Gly	
75 80 85	
cag aaa gtg acc ttc ttg gac gac tgt gtt ggt tct gag gtc gaa tct	5080
Gln Lys Val Thr Phe Leu Asp Asp Cys Val Gly Ser Glu Val Glu Ser	
90 95 100 105	
acc gtc aac tct gcc cct gct ggc tcg gtg att ttg cta gaa aat ttg	5128
Thr Val Asn Ser Ala Pro Ala Gly Ser Val Ile Leu Leu Glu Asn Leu	
110 115 120	
aga ttc cac att gag gag gaa ggc tcg aaa aag act tca gag gga aaa	5176
Arg Phe His Ile Glu Glu Glu Gly Ser Lys Lys Thr Ser Glu Gly Lys	
125 130 135	
gtt aag gct tcc aaa gag gac gtt gaa aaa ttc aga aag caa ctc act	5224
Val Lys Ala Ser Lys Glu Asp Val Glu Lys Phe Arg Lys Gln Leu Thr	
140 145 150	
gct ctg gct gat gtc tac gtt aac gac gct ttc ggt act gct cac aga	5272
Ala Leu Ala Asp Val Tyr Val Asn Asp Ala Phe Gly Thr Ala His Arg	
155 160 165	
gcc cac tcc tcc atg gtc ggt ttc gag ctc gag gac aga gct gct ggc	5320

[illegible]

ttt gcc agc ggt acc aag tcg atg ttg caa gct tgt gtc gag tct gcc 5848
Phe Ala Ser Gly Thr Lys Ser Met Leu Gln Ala Cys Val Glu Ser Ala
350 355 360

cag gcc gga aac acc gtt att atc ggt ggt gga gac act gcc acc gtg 5896
Gln Ala Gly Asn Thr Val Ile Ile Gly Gly Gly Asp Thr Ala Thr Val
365 370 375

gca aag aag ttt ggc ggt gcc gac aag ctg tcc cac gtt tcc act gga 5944
Ala Lys Lys Phe Gly Gly Ala Asp Lys Leu Ser His Val Ser Thr Gly
380 385 390

gga ggt gct tcc ctg gaa ttg ttg gag ggt aag gag ctt cct ggt gtt 5992
Gly Gly Ala Ser Leu Glu Leu Leu Glu Gly Lys Glu Leu Pro Gly Val
395 400 405

gct gct ttg aag agc aag act gct taggtgggat ttgcgtgac tacgtagtgg 6046
Ala Ala Leu Lys Ser Lys Thr Ala
410 415

ttatttttgt agttagtttg actgtctaga aatactcttt gcacagcccc aaataaatta 6106

cactgccgtg aaattcatga gaaaaaagta ccaaagataa acaggggaga aagtgatcgg 6166

gtgtccctc ttgtgtgac cagtcgtgaa cagtaactgat caccacccca gatgactaaa 6226

cacaggcgca aaaacattcc actgacttac atcacacaga gcctagacaa ttccaggacc 6286

aatcagggtt cttcgtttga taaggctcta gtgaacaaac acaacaaca cagatcaaag 6346

actcacaatt ctgtcaaatt ggccagtcta accaagtctt acttgtctgc caagccggtc 6406

caggcaacaa agagcccaac agttgacaaa atcaccaaaa ggatcaaccg aaagtccac 6466

tcgaccaaga aaatcgaccc tgtcgctctt ttctcagggc cctgggggct tcttaccggc 6526

caacttaacg actatttaac gtogattcgc tcaatgaact ctgttttgga ttacgaccag 6586

cccttgacca cggctcagaa gtcgtcgtcg tcgattttgg acatcaaacc gatttcagac 6646

catttgaacg tggtcagggt cgcagagctc gatagcgtga tgctgggctc gttccaaaac 6706

caccagtc gactcaaggc tggcgaccaa attcacattg gagacgatta ctacaatgtt 6766
 ccgtacaacg gaaagtatct cagatgttac tatcgatggt ttaaagtgat atgaggtata 6826
 tacaggatgc cgactagacg gtgaactgtt cgcgcagttg agagtactgg ctggaacggg 6886
 ccggatcaca cttttccaac agttgcgaca caaatgggtcc gtgcacagtt ttttccagag 6946
 tgtttgaaat actcaacaaa ggcatgtact cgtccaggaa ctccttgac atggtggcat 7006
 cgcctttcac tgccaggaat tgaagagcaa ccagcgacgg ggtcaaatct tcccgtttca 7066
 atgcaccgtc aaggactttc ttcattgaca cccagttgtt gcggttggca aaaatgggtga 7126
 ggaaaacaac atccaatctg gaacgaaatt gggcagcagc caggtcgtgt tcgaacattc 7186
 ggggtggacag ttggtacagc ttgtgaacca ttggagagta cttgaagctg taattagggt 7246
 ctgcagttag cgaaccgatc gtaaggaagt tttcgttacc gatctgcgag cccgagatga 7306
 ctaatagagg tattagtttt tgaacgtcct ccgttgacaa aacagggtta taagtgttga 7366
 gaatccggaa gatactgacg tatctcttgt tgaacacctc cgcctctgtc tctactgatt 7426
 tgtgaaattc agacgactgt agcacgagat caatatatct gaacacctcg tcaacagtaa 7486
 cgggtttccc gttggcttgc atggctttga aatggttctc gatcttggtc agagggttaag 7546
 tggctgggtc cttcaaatgc agtgttttta aagcctcaaa tcgctggtg tagttctccg 7606
 aggttaagag ttccggtcta aaagcgctcg agctcgcttg ggtggtgtag agatgtagcc 7666
 ggttcagctg caaaatagtt tgaagattcg agatcctcgg ccgggcagtg tgatagtatc 7726
 tgatcccggc aaagatatcg tcgttgtagc cacggctact tctggctgga tactttgtct 7786
 tctctttcga ccacaggttc tccaagcaca tgacttctct tctctccgcg gtcagaaagt 7846
 ggacgtaaat gttatcgatt ttgcagtcca tcatcatcca ggtatttgct gaggccccgt 7906
 aatcattgct ggcgtagcaa ggggctctct tacccttttt caacagtctt ctgtgatact 7966

tggctagctg gccactgctc agaagacctt ctgccagagg gatggttttc agagtgtgtt 8026
 tgatgaaaag attgagctcc gccgtagctt tctggagatg cttcgaactc tttcctgttc 8086
 caatgatcat gaagtcggcg atctcttggg ctcttcgtt gacctctgcc ccggtgctat 8146
 cgcgcaagtc gaacagggcc agatcggcca tccccagctt ctccgcgata aactcgagaa 8206
 ctggctgcaa gctggccgga gagttgggcg gaagatccgg aatctgaatc tgtctaggct 8266
 gcgaggccaa atccgcagac tcttcagctc tcatgtacca cgggagagct gccgttttga 8326
 cttcttggtg gctgactgga actgacgaga agtcggcgac cagttgctgg gaactggcag 8386
 cgttgtgagg gaagaagccg ctccgaaggc cgcggggcac aggacgcgac accggacaca 8446
 accgacaccg tctccacatt atggctgtat ttggaaaaga ttgagtagtc gatagtttct 8506
 gcaaaagctt tagcaaaca caaacacgcg acgtttgaag acagtttttt ggcagcttcg 8566
 atctgtcgat agttcagtgg tgatctcagt ggtcgtttcg tctaccttga atctctcacc 8626
 ccagatgttg tctctgtgtg aagtttttgt gaatttttca tctttctttt tactcgattt 8686
 tttcctcttc cacgtcgata gtcgcgagac gccttgcgac gcgccgtttt aatttcccaa 8746
 aatttgcaca aacaaaagat aaaaacagga ctgtcgattt gggttttgtg ggaacagaaa 8806
 agaggaaccg tttgaacaat aaagcaacgg tcctccaaaa tcatcctcta ccactcattc 8866
 tcaacacgtg accatcgga acaagttctg gagctctctt caaaccgcga ctcaacatag 8926
 tgttttgtgc caggcccgtg ttttactata aagtgccct caagaacat tagttcgtgc 8986
 tacttgccct cgatttgtgc ttcctaacgg tgtttcaaca atcatgacag gccgggatcc 9046

<210> 4
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> *Ogataea minuta*

<400> 4

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

Leu Leu Asp Lys Val Asp Leu Leu Ile Val Gly Gly Gly Met Ala Phe
225 230 235 240

Thr Phe Asn Lys Val Leu Asn Asp Met Lys Ile Gly Lys Ser Leu Phe
245 250 255

Asp Glu Thr Gly Ala Glu Ile Val Pro Lys Leu Val Glu Lys Ala Lys
260 265 270

Lys Asn Gly Val Lys Ile Val Leu Pro Val Asp Phe Val Thr Ala Asp
275 280 285

Ala Phe Ser Pro Asp Ala Lys Val Gly Tyr Ala Thr Leu Glu Glu Gly
290 295 300

Ile Ala Asp Asp Leu Gln Gly Leu Asp Gly Gly Glu Lys Thr Arg Lys
305 310 315 320

Leu Phe Ala Asp Thr Ile Ala Gln Ala Lys Thr Ile Val Trp Asn Gly
325 330 335

Pro Pro Gly Val Phe Glu Phe Glu Ser Phe Ala Ser Gly Thr Lys Ser
340 345 350

Met Leu Gln Ala Cys Val Glu Ser Ala Gln Ala Gly Asn Thr Val Ile
355 360 365

Ile Gly Gly Gly Asp Thr Ala Thr Val Ala Lys Lys Phe Gly Gly Ala
370 375 380

Asp Lys Leu Ser His Val Ser Thr Gly Gly Gly Ala Ser Leu Glu Leu
385 390 395 400

Leu Glu Gly Lys Glu Leu Pro Gly Val Ala Ala Leu Lys Ser Lys Thr
405 410 415

Ala

<210> 5

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador

	<400> 5 aagcttgaca atgtaggaga tcataaacac atcgtgcgcg tc	42
5	<210> 6 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 6 ggatccagat ctcatatgac tagttgctag ttctatgcgg cgttagtgtt tacactacga	60
15	cagct	65
	<210> 7 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
25	<400> 7 ggatccgtgg gatttgcgtg atctacgtag tggftatttt	40
	<210> 8 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
35	<400> 8 ggtaccgcag tgaaaggcga tgccaccatg tgcaaggagt tc	42
40	<210> 9 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
45	<400> 9 actagtatga gatttccttc aattt	25
50	<210> 10 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
55	<400> 10 gtcgacatga gatttccttc aattt	25
60	<210> 11 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 11	
5	agcttcagcc tctctttat ctagaga	27
	<210> 12	
	<211> 47	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 12	
15	tctctagata aaagagaggc tgaagctcag ctgcagctgc aggagtc	47
	<210> 13	
	<211> 39	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
25	<400> 13	
	ccagatctgg atcctcattt acccgagac agggagagg	39
	<210> 14	
30	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 14	
	tctctagata aaagagaggc tgaagctgaa attgtgtga cacagtc	47
40	<210> 15	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 15	
50	aaagggccct caacactctc ccctgttgaa gctct	35
	<210> 16	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 16	
60	atgacttctt tttagcacc gcatc	25
	<210> 17	
	<211> 23	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador

<400> 17

5 caaaattgca agcaagtaa ccg

23

<210> 18

<211> 1431

<212> ADN

10 <213> *Ogataea minuta*

<400> 18

```

atgacttcct tttcagcacc gcatcaacac cagtctattc cgtcggatgt tcctgtcggg 60
acgcttcctc ctagaaagag ggccaagacc gacgaagaga aggagcaacg cagggttgag 120
cggattctca gaaataggag agccgcccac gcgtcggagg aaaagaaaag aagacatgtt 180
gaacatctcg agacgtatgt gaggggcctg gaggcctcgc ttgcgattta cgagttgaat 240
caatccaaac tgcaaacgat acagtcgact ctcatatctt tgttgacgga gcacgggatc 300
gaatactctg gtattgactt ctcaatccaa gcaacaacaa aagtcagcaa gcctgacggg 360
ctcgacttga cacagacgaa tcctaccaa aaacaaaaga gtttctcaaa gtcactttca 420
aaaaaaatgg gttcttcctc tagcatgaag atgtcggaac tccatctcc tagcttcgac 480
gaggacgtct cttcggatga agacgacgat cttgaagatg acgagggagc agaaattgtc 540
gaggaatcgc caatgacgta tttggacctt ccggatccaa aagcgaacta caaaaagaga 600
aaggctgaag aagcttatat ttctccacct ggctcgacct ccccttccaa attgaagttg 660
gaggaagacg agctgatttt gaagcaagag tacagcaatt tgtttgacga cacggaagac 720
tttttctcta ctgagaagtc ttgcagtttg gaggttgtca aacaaggcga ctctccttcg 780
gaatcattca tcaaacagga agacgatata ctgaaaatac ctgaggctgt tttcaactca 840
gaagaatatc atttgaatcc agtggaggac ctctgtgctt ttaatagcgt gcatcatcca 900
gcagtgatga ttgtatgatt tattgaaaag gcatctcaat aacattgaaa cagtgaagatt 960
tccaaacaag aattgtacaa acgtgacatc atcaaaggta aaatcagaaa aaagttcttt 1020
tttcaggggt atttgtttgt tcttctttct gattttaccg tagttacgtt ttgtctgttt 1080
tttgaggaag tccaagctct tcgagcgttt catgtcgggt tattgcagat gttcgttttg 1140
gtccgcagca ccattatcag cgggggtcgt taacacttca tttgaattcg atgatttctt 1200

gtcatgagga agatagtcta cttggtttta tttagttgga atttggtgtc attgtttgat 1260
gagggggatg gaggtttgat caatcggttt caagttctct ttcgatgaga ttaatttggt 1320
accgtctatg agtttagatc tgacccttgg tgagcttcgg aaaaaagttt gaagttcagc 1380
ctggttccat gccacgcgtg tttggttacg gtaacttgc ttgcaatttt g 1431

```

<210> 19

<211> 1187

<212> ADN

20 <213> *Ogataea minuta*

<400> 19

atgacttcct tttcagcacc gcatcaacac cagtctattc cgtcggatgt tcctgtcgga 60
acgcttcctc ctagaaagag ggcgaagacc gacgaagaga aggagcaacg cagggttgag 120
cggattctca gaaataggag agccgcccac gcgtcgaggg aaaagaaaag aagacatgtt 180
gaacatctcg agacgtatgt gagtggcctg gagtccctcg ttgcgattta cgagttgaat 240
caatccaaac tgcaaacgat acagtcgact ctcatatctt tgttgacgga gcacgggac 300
gaataactctg gtattgactt ctcaatccaa gcaacaacaa aagtcagcaa gcctgacggg 360
ctcgacttga cacagacgaa tcctaccaa aaacaaaaga gtttctcaa gtcactttca 420
aaaaaatgg gttcttcctc tagcatgaag atgtcggaac tccatctcc tagcttcgac 480
gaggacgtct cttcgatga agacgacgat cttgaagatg acgagggagc agaaattgtc 540
gaggaatcgc caatgacgta tttggacctt ccggatccaa aagcgaacta caaaaagaga 600
aaggctgaag aagcttatat ttctccacct ggctcgacct ccccttccaa attgaagttg 660
gaggaagacg agctgatttt gaagcaagag tacagcaatt tgtttgacga cacggaagac 720
tttttctcta ctgagaagtc ttgcagtttg gattgttca aacaaggcga ctctccttcg 780
gaatcattca tcaaacagga agacgatata ctgaaaatac ctgaggctgt tttcaactca 840
gaagaatatc atttgaatcc agtggaggac ctctgtgctt ttaatagcgt gcatcatcca 900
gcagcaccat tatcagcggg ggtcgtaac acttcatttg aattcgatga tttcttgtca 960
tgaggaagat agtctacttg gttttattta gttggaattt ggtgtcattg tttgatgagg 1020
gggatggagg tttgatcaat cggtttcaag ttctcttcg atgagattaa tttgttaccg 1080
tctatgagtt agatcctgac ccttggtgag cttcggaaaa aagtttgaag ttcagcctgg 1140
ttccatgcca cgcgtgtttg gttacggta acttgcttgc aattttg 1187

<210> 20

<211> 28

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador

10

<400> 20

gactagtatg acttcctttt cagcaccg

28

<210> 21

15 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador

<400> 21

cagatctca tgacaagaaa tcatcgaat

29

25 <210> 22

<211> 963

<212> ADN

<213> *Ogataea minuta*

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(963)

<400> 22

atg act tcc ttt tca gca ccg cat caa cac cag tct att ccg tcg gat 48
 Met Thr Ser Phe Ser Ala Pro His Gln His Gln Ser Ile Pro Ser Asp
 1 5 10 15

gtt cct gtc gga acg ctt cct cct aga aag agg gcg aag acc gac gaa 96
 Val Pro Val Gly Thr Leu Pro Pro Arg Lys Arg Ala Lys Thr Asp Glu
 20 25 30

gag aag gag caa cgc agg gtt gag cgg att ctc aga aat agg aga gcc 144
 Glu Lys Glu Gln Arg Arg Val Glu Arg Ile Leu Arg Asn Arg Arg Ala
 35 40 45

gcc cac gcg tcg agg gaa aag aaa aga aga cat gtt gaa cat ctc gag 192
 Ala His Ala Ser Arg Glu Lys Lys Arg Arg His Val Glu His Leu Glu
 50 55 60

acg tat gtg agt ggc ctg gag tcc tcg ctt gcg att tac gag ttg aat 240
 Thr Tyr Val Ser Gly Leu Glu Ser Ser Leu Ala Ile Tyr Glu Leu Asn
 65 70 75 80

caa tcc aaa ctg caa acg ata cag tcg act ctc ata tct ttg ttg acg	288
Gln Ser Lys Leu Gln Thr Ile Gln Ser Thr Leu Ile Ser Leu Leu Thr	
85 90 95	
 gag cac ggg atc gaa tac tct ggt att gac ttc tca atc caa gca aca	336
Glu His Gly Ile Glu Tyr Ser Gly Ile Asp Phe Ser Ile Gln Ala Thr	
100 105 110	
 aca aaa gtc agc aag cct gac ggg ctc gac ttg aca cag acg aat cct	384
Thr Lys Val Ser Lys Pro Asp Gly Leu Asp Leu Thr Gln Thr Asn Pro	
115 120 125	
 acc aaa aaa caa aag agt ttc tca aag tca ctt tca aaa aaa atg ggt	432
Thr Lys Lys Gln Lys Ser Phe Ser Lys Ser Leu Ser Lys Lys Met Gly	
130 135 140	
 tct tcc tct agc atg aag atg tcg gaa ctc cca tct cct agc ttc gac	480
Ser Ser Ser Ser Met Lys Met Ser Glu Leu Pro Ser Pro Ser Phe Asp	
145 150 155 160	
 gag gac gtc tct tcg gat gaa gac gac gat ctt gaa gat gac gag gga	528
Glu Asp Val Ser Ser Asp Glu Asp Asp Asp Leu Glu Asp Asp Glu Gly	
165 170 175	
 gca gaa att gtc gag gaa tcg cca atg acg tat ttg gac ctt ccg gat	576
Ala Glu Ile Val Glu Glu Ser Pro Met Thr Tyr Leu Asp Leu Pro Asp	
180 185 190	
 cca aaa gcg aac tac aaa aag aga aag gct gaa gaa gct tat att tct	624
Pro Lys Ala Asn Tyr Lys Lys Arg Lys Ala Glu Glu Ala Tyr Ile Ser	
195 200 205	
 cca cct ggc tcg acc tcc cct tcc aaa ttg aag ttg gag gaa gac gag	672
Pro Pro Gly Ser Thr Ser Pro Ser Lys Leu Lys Leu Glu Glu Asp Glu	
210 215 220	
 ctg att ttg aag caa gag tac agc aat ttg ttt gac gac acg gaa gac	720
Leu Ile Leu Lys Gln Glu Tyr Ser Asn Leu Phe Asp Asp Thr Glu Asp	
225 230 235 240	
 ttt ttc tct act gag aag tct tgc agt ttg gag ttg ttc aaa caa ggc	768
Phe Phe Ser Thr Glu Lys Ser Cys Ser Leu Glu Leu Phe Lys Gln Gly	

245	250	255	
gac tct cct tct gaa tca ttc atc aaa cag gaa gac gat ata ctg aaa			816
Asp Ser Pro Ser Glu Ser Phe Ile Lys Gln Glu Asp Asp Ile Leu Lys			
260	265	270	
ata cct gag gct gtt ttc aac tca gaa gaa tat cat ttg aat cca gtg			864
Ile Pro Glu Ala Val Phe Asn Ser Glu Glu Tyr His Leu Asn Pro Val			
275	280	285	
gag gac ctc tgt gct ttt aat agc gtg cat cat cca gca gca cca tta			912
Glu Asp Leu Cys Ala Phe Asn Ser Val His His Pro Ala Ala Pro Leu			
290	295	300	
tca gcg ggg gtc gtt aac act tca ttt gaa ttc gat gat ttc ttg tca			960
Ser Ala Gly Val Val Asn Thr Ser Phe Glu Phe Asp Asp Phe Leu Ser			
305	310	315	320
tga			963

<210> 23
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> *Ogataea minuta*

<400> 23
 Met Thr Ser Phe Ser Ala Pro His Gln His Gln Ser Ile Pro Ser Asp
 1 5 10 15
 Val Pro Val Gly Thr Leu Pro Pro Arg Lys Arg Ala Lys Thr Asp Glu
 20 25 30
 Glu Lys Glu Gln Arg Arg Val Glu Arg Ile Leu Arg Asn Arg Arg Ala
 35 40 45
 Ala His Ala Ser Arg Glu Lys Lys Arg Arg His Val Glu His Leu Glu
 50 55 60
 Thr Tyr Val Ser Gly Leu Glu Ser Ser Leu Ala Ile Tyr Glu Leu Asn
 65 70 75 80
 Gln Ser Lys Leu Gln Thr Ile Gln Ser Thr Leu Ile Ser Leu Leu Thr
 85 90 95
 Glu His Gly Ile Glu Tyr Ser Gly Ile Asp Phe Ser Ile Gln Ala Thr
 100 105 110
 Thr Lys Val Ser Lys Pro Asp Gly Leu Asp Leu Thr Gln Thr Asn Pro

115	120	125
Thr Lys Lys Gln Lys Ser Phe Ser Lys Ser Leu Ser Lys Lys Met Gly		
130	135	140
Ser Ser Ser Ser Met Lys Met Ser Glu Leu Pro Ser Pro Ser Phe Asp		
145	150	155
Glu Asp Val Ser Ser Asp Glu Asp Asp Asp Leu Glu Asp Asp Glu Gly		
165	170	175
Ala Glu Ile Val Glu Glu Ser Pro Met Thr Tyr Leu Asp Leu Pro Asp		
180	185	190
Pro Lys Ala Asn Tyr Lys Lys Arg Lys Ala Glu Glu Ala Tyr Ile Ser		
195	200	205
Pro Pro Gly Ser Thr Ser Pro Ser Lys Leu Lys Leu Glu Glu Asp Glu		
210	215	220
Leu Ile Leu Lys Gln Glu Tyr Ser Asn Leu Phe Asp Asp Thr Glu Asp		
225	230	235
Phe Phe Ser Thr Glu Lys Ser Cys Ser Leu Glu Leu Phe Lys Gln Gly		
245	250	255
Asp Ser Pro Ser Glu Ser Phe Ile Lys Gln Glu Asp Asp Ile Leu Lys		
260	265	270
Ile Pro Glu Ala Val Phe Asn Ser Glu Glu Tyr His Leu Asn Pro Val		
275	280	285
Glu Asp Leu Cys Ala Phe Asn Ser Val His His Pro Ala Ala Pro Leu		
290	295	300
Ser Ala Gly Val Val Asn Thr Ser Phe Glu Phe Asp Asp Phe Leu Ser		
305	310	315
		320

<210> 24
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador

<400> 24
 atacaataca aagtcgagac tagtatggat atttacgaca ctcaaacctt

<210> 25
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador

<400> 25
 tctatcaca cggatcagat cttcagacag aggtgccctc ctttgagctg

<210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

50

	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
5	<400> 26 ggaattcatg agatttcctt caat	24
	<210> 27 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
15	<400> 27 ctccaccagc tgtactctc tttctcgag agata	35
	<210> 28 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
25	<400> 28 tatctctcga gaaaagagaa gtacagctgg tggag	35
	<210> 29 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
35	<400> 29 ggtcgactca ttaccggg gacag	25
40	<210> 30 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
50	<400> 30 tgggtcatct gaatgtctt tttctgaga gata	34
	<210> 31 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
60	<400> 31 tatctctcga gaaaagagac attcagatga ccca	34
	<210> 32 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65		

	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
5	<400> 32 ggtcgaccta acactctccc ctgt	24
10	<210> 33 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 33 ggagctcatg gaaatgactg attttg	26
20	<210> 34 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 34 gaattcaaac ctgactgcgc ttctggatta cgccaattgt caag	44
30	<210> 35 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
40	<400> 35 cttgacaatt ggcgtaatcc agaagcgcag tcaggtttga attc	44
45	<210> 36 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 36 gcccggtca tgaagtgatg aagaaatc	28
55	<210> 37 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 37 gggtaccatg gatatttacg acactc	26
65	<210> 38 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador

5 <400> 38
gtctagatca gacagaggtg ccctcc 26

<210> 39

<211> 717

10 <212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

15 <222> (1).. (717)

<400> 39

atg gaa atg act gat ttt gaa cta act agt aat tcg caa tcg aac ttg 48

Met Glu Met Thr Asp Phe Glu Leu Thr Ser Asn Ser Gln Ser Asn Leu

1

5

10

15

gct atc cct acc aac ttc aag tcg act ctg cct cca agg aaa aga gcc 96

Ala Ile Pro Thr Asn Phe Lys Ser Thr Leu Pro Pro Arg Lys Arg Ala

20

25

30

aag aca aaa gag gaa aag gaa cag cga agg atc gag cgt att ttg aga 144

Lys Thr Lys Glu Glu Lys Glu Gln Arg Arg Ile Glu Arg Ile Leu Arg	
35 40 45	
aac aga aga gct gct cac cag agc aga gag aaa aaa aga cta cat ctg	192
Asn Arg Arg Ala Ala His Gln Ser Arg Glu Lys Lys Arg Leu His Leu	
50 55 60	
cag tat ctc gag aga aaa tgt tct ctt ttg gaa aat tta ctg aac agc	240
Gln Tyr Leu Glu Arg Lys Cys Ser Leu Leu Glu Asn Leu Leu Asn Ser	
65 70 75 80	
gtc aac ctt gaa aaa ctg gct gac cac gaa gac gcg ttg act tgc agc	288
Val Asn Leu Glu Lys Leu Ala Asp His Glu Asp Ala Leu Thr Cys Ser	
85 90 95	
cac gac gct ttt gtt gct tct ctt gac gag tac agg gat ttc cag agc	336
His Asp Ala Phe Val Ala Ser Leu Asp Glu Tyr Arg Asp Phe Gln Ser	
100 105 110	
acg agg ggc gct tca ctg gac acc agg gcc agt tcg cac tcg tcg tct	384
Thr Arg Gly Ala Ser Leu Asp Thr Arg Ala Ser Ser His Ser Ser Ser	
115 120 125	
gat acg ttc aca cct tca cct ctg aac tgt aca atg gag cct gcg act	432
Asp Thr Phe Thr Pro Ser Pro Leu Asn Cys Thr Met Glu Pro Ala Thr	
130 135 140	
ttg tcg ccc aag agt atg cgc gat tcc gcg tcg gac caa gag act tca	480
Leu Ser Pro Lys Ser Met Arg Asp Ser Ala Ser Asp Gln Glu Thr Ser	
145 150 155 160	
tgg gag ctg cag atg ttt aag acg gaa aat gta cca gag tcg acg acg	528
Trp Glu Leu Gln Met Phe Lys Thr Glu Asn Val Pro Glu Ser Thr Thr	
165 170 175	
cta cct gcc gta gac aac aac aat ttg ttt gat gcg gtg gcc tcg ccg	576
Leu Pro Ala Val Asp Asn Asn Asn Leu Phe Asp Ala Val Ala Ser Pro	
180 185 190	
ttg gca gac cca ctc tgc gac gat ata gcg gga aac agt cta ccc ttt	624
Leu Ala Asp Pro Leu Cys Asp Asp Ile Ala Gly Asn Ser Leu Pro Phe	
195 200 205	

gac aat tca att gat ctt gac aat tgg cgt aat cca gaa gcg cag tca 672
 Asp Asn Ser Ile Asp Leu Asp Asn Trp Arg Asn Pro Glu Ala Gln Ser
 210 215 220

ggt ttg aat tca ttt gaa ttg aat gat ttc ttc atc act tca tga 717
 Gly Leu Asn Ser Phe Glu Leu Asn Asp Phe Phe Ile Thr Ser
 225 230 235

<210> 40
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 40
 Met Glu Met Thr Asp Phe Glu Leu Thr Ser Asn Ser Gln Ser Asn Leu
 1 5 10 15
 Ala Ile Pro Thr Asn Phe Lys Ser Thr Leu Pro Pro Arg Lys Arg Ala
 20 25 30
 Lys Thr Lys Glu Glu Lys Glu Gln Arg Arg Ile Glu Arg Ile Leu Arg
 35 40 45
 Asn Arg Arg Ala Ala His Gln Ser Arg Glu Lys Lys Arg Leu His Leu
 50 55 60
 Gln Tyr Leu Glu Arg Lys Cys Ser Leu Leu Glu Asn Leu Leu Asn Ser
 65 70 75 80
 Val Asn Leu Glu Lys Leu Ala Asp His Glu Asp Ala Leu Thr Cys Ser
 85 90 95
 His Asp Ala Phe Val Ala Ser Leu Asp Glu Tyr Arg Asp Phe Gln Ser
 100 105 110
 Thr Arg Gly Ala Ser Leu Asp Thr Arg Ala Ser Ser His Ser Ser Ser
 115 120 125
 Asp Thr Phe Thr Pro Ser Pro Leu Asn Cys Thr Met Glu Pro Ala Thr
 130 135 140
 Leu Ser Pro Lys Ser Met Arg Asp Ser Ala Ser Asp Gln Glu Thr Ser
 145 150 155 160
 Trp Glu Leu Gln Met Phe Lys Thr Glu Asn Val Pro Glu Ser Thr Thr
 165 170 175
 Leu Pro Ala Val Asp Asn Asn Asn Leu Phe Asp Ala Val Ala Ser Pro
 180 185 190
 Leu Ala Asp Pro Leu Cys Asp Asp Ile Ala Gly Asn Ser Leu Pro Phe
 195 200 205
 Asp Asn Ser Ile Asp Leu Asp Asn Trp Arg Asn Pro Glu Ala Gln Ser
 210 215 220
 Gly Leu Asn Ser Phe Glu Leu Asn Asp Phe Phe Ile Thr Ser
 225 230 235

5

10

<210> 41
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> *Trichoderma reesei*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1356)

10

<400> 41
 atg gcg ttc cag cag tcg tct ccc ctc gtc aag ttt gag gcc tct ccc 48
 Met Ala Phe Gln Gln Ser Ser Pro Leu Val Lys Phe Glu Ala Ser Pro
 1 5 10 15

 gcc gaa tcc ttc ctc tcc gcc ccc ggc gac aac ttc aca tcc ctc ttc 96
 Ala Glu Ser Phe Leu Ser Ala Pro Gly Asp Asn Phe Thr Ser Leu Phe
 20 25 30

 gcc gac tca aca ccc tca aca ctt aac cct cgg gac atg atg acc cct 144
 Ala Asp Ser Thr Pro Ser Thr Leu Asn Pro Arg Asp Met Met Thr Pro
 35 40 45

 gac agc gtc gcc gac atc gac tct cgc ctg tcc gtc atc ccc gaa tca 192
 Asp Ser Val Ala Asp Ile Asp Ser Arg Leu Ser Val Ile Pro Glu Ser
 50 55 60

 cag gac gcg gaa gat gac gaa tca cac tcc aca tcc gct acc gca ccc 240
 Gln Asp Ala Glu Asp Asp Glu Ser His Ser Thr Ser Ala Thr Ala Pro
 65 70 75 80

 tct acc tca gaa aag aag ccc gtc aag aag agg aaa tca tgg ggc cag 288
 Ser Thr Ser Glu Lys Lys Pro Val Lys Lys Arg Lys Ser Trp Gly Gln
 85 90 95

 gtt ctt cct gag ccc aag acc aac ctc cct cct cga aaa cgt gca aag 336
 Val Leu Pro Glu Pro Lys Thr Asn Leu Pro Pro Arg Lys Arg Ala Lys
 100 105 110

acg gaa gat gaa aag gag cag cgc cgc gtc gag cgt gtt ctc cgc aac	384
Thr Glu Asp Glu Lys Glu Gln Arg Arg Val Glu Arg Val Leu Arg Asn	
115 120 125	
cgc cgc gcc gcg cag tcc tcg cgc gag cgc aag agg ctc gag gtc gag	432
Arg Arg Ala Ala Gln Ser Ser Arg Glu Arg Lys Arg Leu Glu Val Glu	
130 135 140	
gct ctc gag aag cgc aac aag gag ctc gag acg ctc ctc atc aac gtc	480
Ala Leu Glu Lys Arg Asn Lys Glu Leu Glu Thr Leu Leu Ile Asn Val	
145 150 155 160	
cag aag acc aac ctg atc ctc gtc gag gag ctc aac cgc ttc cga cgc	528
Gln Lys Thr Asn Leu Ile Leu Val Glu Glu Leu Asn Arg Phe Arg Arg	
165 170 175	
agc tca ggc gtc gtc acc cgc tcg tcc tcc ccc ctc gac tct ctc cag	576
Ser Ser Gly Val Val Thr Arg Ser Ser Ser Pro Leu Asp Ser Leu Gln	
180 185 190	
gac agc atc act ctc tcc cag caa ctc ttt ggc tcg cgg gat ggc caa	624
Asp Ser Ile Thr Leu Ser Gln Gln Leu Phe Gly Ser Arg Asp Gly Gln	
195 200 205	
acc atg tcc aac ccc gag cag tcc ttg atg gac cag atc atg aga tct	672
Thr Met Ser Asn Pro Glu Gln Ser Leu Met Asp Gln Ile Met Arg Ser	
210 215 220	
gcc gct aac cct acc gtt aac ccg gcc tct ctt tcc ccc tcc ctc ccc	720
Ala Ala Asn Pro Thr Val Asn Pro Ala Ser Leu Ser Pro Ser Leu Pro	
225 230 235 240	
ccc atc tcg gac aag gag ttc cag acc aag gag gag gac gag gaa cag	768
Pro Ile Ser Asp Lys Glu Phe Gln Thr Lys Glu Glu Asp Glu Glu Gln	
245 250 255	
gcc gac gaa gat gaa gag atg gag cag aca tgg cac gag acc aaa gaa	816
Ala Asp Glu Asp Glu Glu Met Glu Gln Thr Trp His Glu Thr Lys Glu	
260 265 270	
gcc gcc gcc gcc aag gag aag aac agc aag cag tcc cgc gtc tcc act	864

Ala Ala Ala Ala Lys Glu Lys Asn Ser Lys Gln Ser Arg Val Ser Thr	
275	280 285
gat tcg aca caa cgt cct gca gtg tca atc ggt gga gat gcc gct gtc	912
Asp Ser Thr Gln Arg Pro Ala Val Ser Ile Gly Gly Asp Ala Ala Val	
290	295 300
cct gtc ttc tca gac gac gcc ggc gca aac tgc ctt ggc ctg gac cct	960
Pro Val Phe Ser Asp Asp Ala Gly Ala Asn Cys Leu Gly Leu Asp Pro	
305	310 315 320
gtt cat cag gat gat ggt cct ttc agc atc ggc cat tct ttc ggc ctg	1008
Val His Gln Asp Asp Gly Pro Phe Ser Ile Gly His Ser Phe Gly Leu	
325	330 335
tca gcg gcc ctt gat gca gat cgc tat ctc ctc gaa agc caa ctt ctc	1056
Ser Ala Ala Leu Asp Ala Asp Arg Tyr Leu Leu Glu Ser Gln Leu Leu	
340	345 350
gct tcg ccc aac gcc tca act gtt gac gac gat tat ctg gct ggt gac	1104
Ala Ser Pro Asn Ala Ser Thr Val Asp Asp Asp Tyr Leu Ala Gly Asp	
355	360 365
tct gcc gcc tgc ttc acg aat cct ctc ccc tcc gac tac gac ttc gac	1152
Ser Ala Ala Cys Phe Thr Asn Pro Leu Pro Ser Asp Tyr Asp Phe Asp	
370	375 380
atc aac gac ttc ctc aca gac gac gca aac cac gcc gcc tat gac att	1200
Ile Asn Asp Phe Leu Thr Asp Asp Ala Asn His Ala Ala Tyr Asp Ile	
385	390 395 400
gtg gca gcg agc aac tat gcc gct gcg gac cgc gag ctc gac ctc gag	1248
Val Ala Ala Ser Asn Tyr Ala Ala Ala Asp Arg Glu Leu Asp Leu Glu	
405	410 415
atc cac gac cct gag aat cag atc cct tcg cga cat tct atc cag cag	1296
Ile His Asp Pro Glu Asn Gln Ile Pro Ser Arg His Ser Ile Gln Gln	
420	425 430
ccc cag tct ggc gcg tcc tct cat gga tgc gac gat ggc ggc att gcg	1344
Pro Gln Ser Gly Ala Ser Ser His Gly Cys Asp Asp Gly Gly Ile Ala	
435	440 445

gtt ggt gtc tga

1356

Val Gly Val

450

<210> 42

<211> 451

5 <212> PRT

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 42

Met Ala Phe Gln Gln Ser Ser Pro Leu Val Lys Phe Glu Ala Ser Pro

1

5

10

15

Ala Glu Ser Phe Leu Ser Ala Pro Gly Asp Asn Phe Thr Ser Leu Phe

20

25

30

Ala Asp Ser Thr Pro Ser Thr Leu Asn Pro Arg Asp Met Met Thr Pro

35

40

45

Asp Ser Val Ala Asp Ile Asp Ser Arg Leu Ser Val Ile Pro Glu Ser

50

55

60

Gln Asp Ala Glu Asp Asp Glu Ser His Ser Thr Ser Ala Thr Ala Pro

65

70

75

80

Ser Thr Ser Glu Lys Lys Pro Val Lys Lys Arg Lys Ser Trp Gly Gln

85

90

95

Val Leu Pro Glu Pro Lys Thr Asn Leu Pro Pro Arg Lys Arg Ala Lys

100

105

110

Thr Glu Asp Glu Lys Glu Gln Arg Arg Val Glu Arg Val Leu Arg Asn

115

120

125

Arg Arg Ala Ala Gln Ser Ser Arg Glu Arg Lys Arg Leu Glu Val Glu

130

135

140

Ala Leu Glu Lys Arg Asn Lys Glu Leu Glu Thr Leu Leu Ile Asn Val

145

150

155

160

Gln Lys Thr Asn Leu Ile Leu Val Glu Glu Leu Asn Arg Phe Arg Arg

165

170

175

Ser Ser Gly Val Val Thr Arg Ser Ser Ser Pro Leu Asp Ser Leu Gln

180

185

190

Asp Ser Ile Thr Leu Ser Gln Gln Leu Phe Gly Ser Arg Asp Gly Gln

195

200

205

Thr Met Ser Asn Pro Glu Gln Ser Leu Met Asp Gln Ile Met Arg Ser

210

215

220

Ala Ala Asn Pro Thr Val Asn Pro Ala Ser Leu Ser Pro Ser Leu Pro

225

230

235

240

Pro Ile Ser Asp Lys Glu Phe Gln Thr Lys Glu Glu Asp Glu Glu Gln

10

245 250 255
 Ala Asp Glu Asp Glu Glu Met Glu Gln Thr Trp His Glu Thr Lys Glu
 260 265 270
 Ala Ala Ala Ala Lys Glu Lys Asn Ser Lys Gln Ser Arg Val Ser Thr
 275 280 285
 Asp Ser Thr Gln Arg Pro Ala Val Ser Ile Gly Gly Asp Ala Ala Val
 290 295 300
 Pro Val Phe Ser Asp Asp Ala Gly Ala Asn Cys Leu Gly Leu Asp Pro
 305 310 315 320
 Val His Gln Asp Asp Gly Pro Phe Ser Ile Gly His Ser Phe Gly Leu
 325 330 335
 Ser Ala Ala Leu Asp Ala Asp Arg Tyr Leu Leu Glu Ser Gln Leu Leu
 340 345 350
 Ala Ser Pro Asn Ala Ser Thr Val Asp Asp Asp Tyr Leu Ala Gly Asp
 355 360 365
 Ser Ala Ala Cys Phe Thr Asn Pro Leu Pro Ser Asp Tyr Asp Phe Asp
 370 375 380
 Ile Asn Asp Phe Leu Thr Asp Asp Ala Asn His Ala Ala Tyr Asp Ile
 385 390 395 400
 Val Ala Ala Ser Asn Tyr Ala Ala Ala Asp Arg Glu Leu Asp Leu Glu
 405 410 415
 Ile His Asp Pro Glu Asn Gln Ile Pro Ser Arg His Ser Ile Gln Gln
 420 425 430
 Pro Gln Ser Gly Ala Ser Ser His Gly Cys Asp Asp Gly Gly Ile Ala
 435 440 445
 Val Gly Val
 450

<210> 43
 <211> 1053
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus nidulans*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1053)

<400> 43
 atg aaa tca gca gac cgg ttt tcg cca gtg aaa atg gag gac gct ttc 48
 Met Lys Ser Ala Asp Arg Phe Ser Pro Val Lys Met Glu Asp Ala Phe
 1 5 10 15

gca aac tct ttg cct act acc ccg tca ttg gag gtt cct gtg ctc act	96
Ala Asn Ser Leu Pro Thr Thr Pro Ser Leu Glu Val Pro Val Leu Thr	
20 25 30	
gtc tcc ccg gct gac aca tct ctt cgg acg aag aat gtg gtg gct cag	144
Val Ser Pro Ala Asp Thr Ser Leu Arg Thr Lys Asn Val Val Ala Gln	
35 40 45	
aca aag cct gag gag aag aag cca gcg aag aaa aga aag tcc tgg ggc	192
Thr Lys Pro Glu Glu Lys Lys Pro Ala Lys Lys Arg Lys Ser Trp Gly	
50 55 60	
cag gaa tta cca gtt ccc aag aca aac tta cct cca aga aaa cgc gct	240
Gln Glu Leu Pro Val Pro Lys Thr Asn Leu Pro Pro Arg Lys Arg Ala	
65 70 75 80	
aag aca gaa gat gag aaa gag cag cgc cgg att gag cga gtt ctt cgc	288
Lys Thr Glu Asp Glu Lys Glu Gln Arg Arg Ile Glu Arg Val Leu Arg	
85 90 95	
aac cgc gca gcc gca caa acc tct cgc gag cgc aag aga ctt gaa atg	336
Asn Arg Ala Ala Ala Gln Thr Ser Arg Glu Arg Lys Arg Leu Glu Met	
100 105 110	
gag aag tta gaa agc gag aag att gat atg gaa caa caa aac cag ttc	384
Glu Lys Leu Glu Ser Glu Lys Ile Asp Met Glu Gln Gln Asn Gln Phe	
115 120 125	
ctt ctt cag cgt ctc gcc cag atg gag gct gag aac aac cgt tta agt	432
Leu Leu Gln Arg Leu Ala Gln Met Glu Ala Glu Asn Asn Arg Leu Ser	
130 135 140	
cag caa gtt gct cag cta tcc gcg gag gtt cgg gga tcc cgc cac agc	480
Gln Gln Val Ala Gln Leu Ser Ala Glu Val Arg Gly Ser Arg His Ser	
145 150 155 160	
act cca act tcc agt tcc ccc gcg tca gtt tcg cca act ctc aca ccg	528
Thr Pro Thr Ser Ser Ser Pro Ala Ser Val Ser Pro Thr Leu Thr Pro	
165 170 175	
act ctt ttt aag cag gaa ggg gat gag gtt cct ctg gac cgc atc cct	576
Thr Leu Phe Lys Gln Glu Gly Asp Glu Val Pro Leu Asp Arg Ile Pro	

180	185	190	
ttt cca act ccc tcc gtg acc gac tac tcc cca act ctt aag cct tca			624
Phe Pro Thr Pro Ser Val Thr Asp Tyr Ser Pro Thr Leu Lys Pro Ser			
195	200	205	
tct ctg gct gag tcc ccc gat ttg aca caa cat cct gca gtg tca gtc			672
Ser Leu Ala Glu Ser Pro Asp Leu Thr Gln His Pro Ala Val Ser Val			
210	215	220	
ggc ggg ctc gaa gga gat gaa agt gcc ctc acg ctt ttc gac ctc gga			720
Gly Gly Leu Glu Gly Asp Glu Ser Ala Leu Thr Leu Phe Asp Leu Gly			
225	230	235	240
gcc agc att aag cat gag cct aca cat gac ctt aca gct cct ctt tct			768
Ala Ser Ile Lys His Glu Pro Thr His Asp Leu Thr Ala Pro Leu Ser			
245	250	255	
gac gat gac ttc cgc cgc cta ttc aac ggt gat tca tcc ctt gag tca			816
Asp Asp Asp Phe Arg Arg Leu Phe Asn Gly Asp Ser Ser Leu Glu Ser			
260	265	270	
gat tct tca ctc ctt gaa gac ggg ttc gcc ttt gac gtt ctc gac tca			864
Asp Ser Ser Leu Leu Glu Asp Gly Phe Ala Phe Asp Val Leu Asp Ser			
275	280	285	
gga gat tta tca gca ttt cca ttt gat tct atg gtt gat ttt gac acc			912
Gly Asp Leu Ser Ala Phe Pro Phe Asp Ser Met Val Asp Phe Asp Thr			
290	295	300	
gag cct gtc acc ctc gaa gat ctc gag caa acc aac ggc ctt tcg gat			960
Glu Pro Val Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Thr Asn Gly Leu Ser Asp			
305	310	315	320
tca gct tct tgc aag gct gct agc ttg caa ccc agc cat ggc gcg tcc			1008
Ser Ala Ser Cys Lys Ala Ala Ser Leu Gln Pro Ser His Gly Ala Ser			
325	330	335	
act tcg cga tgc gac ggg cag ggc att gca gct ggc agt gcg tga			1053
Thr Ser Arg Cys Asp Gly Gln Gly Ile Ala Ala Gly Ser Ala			
340	345	350	

<211> 350
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus nidulans*

5 <400> 44
 Met Lys Ser Ala Asp Arg Phe Ser Pro Val Lys Met Glu Asp Ala Phe
 1 5 10 15
 Ala Asn Ser Leu Pro Thr Thr Pro Ser Leu Glu Val Pro Val Leu Thr
 20 25 30
 Val Ser Pro Ala Asp Thr Ser Leu Arg Thr Lys Asn Val Val Ala Gln
 35 40 45
 Thr Lys Pro Glu Glu Lys Lys Pro Ala Lys Lys Arg Lys Ser Trp Gly
 50 55 60
 Gln Glu Leu Pro Val Pro Lys Thr Asn Leu Pro Pro Arg Lys Arg Ala
 65 70 75 80
 Lys Thr Glu Asp Glu Lys Glu Gln Arg Arg Ile Glu Arg Val Leu Arg
 85 90 95
 Asn Arg Ala Ala Ala Gln Thr Ser Arg Glu Arg Lys Arg Leu Glu Met
 100 105 110
 Glu Lys Leu Glu Ser Glu Lys Ile Asp Met Glu Gln Gln Asn Gln Phe
 115 120 125
 Leu Leu Gln Arg Leu Ala Gln Met Glu Ala Glu Asn Asn Arg Leu Ser
 130 135 140
 Gln Gln Val Ala Gln Leu Ser Ala Glu Val Arg Gly Ser Arg His Ser
 145 150 155 160
 Thr Pro Thr Ser Ser Ser Pro Ala Ser Val Ser Pro Thr Leu Thr Pro
 165 170 175
 Thr Leu Phe Lys Gln Glu Gly Asp Glu Val Pro Leu Asp Arg Ile Pro
 180 185 190
 Phe Pro Thr Pro Ser Val Thr Asp Tyr Ser Pro Thr Leu Lys Pro Ser
 195 200 205
 Ser Leu Ala Glu Ser Pro Asp Leu Thr Gln His Pro Ala Val Ser Val
 210 215 220
 Gly Gly Leu Glu Gly Asp Glu Ser Ala Leu Thr Leu Phe Asp Leu Gly
 225 230 235 240
 Ala Ser Ile Lys His Glu Pro Thr His Asp Leu Thr Ala Pro Leu Ser
 245 250 255
 Asp Asp Asp Phe Arg Arg Leu Phe Asn Gly Asp Ser Ser Leu Glu Ser
 260 265 270
 Asp Ser Ser Leu Leu Glu Asp Gly Phe Ala Phe Asp Val Leu Asp Ser
 275 280 285

Gly Asp Leu Ser Ala Phe Pro Phe Asp Ser Met Val Asp Phe Asp Thr
 290 295 300
 Glu Pro Val Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Thr Asn Gly Leu Ser Asp
 305 310 315 320
 Ser Ala Ser Cys Lys Ala Ala Ser Leu Gln Pro Ser His Gly Ala Ser
 325 330 335
 Thr Ser Arg Cys Asp Gly Gln Gly Ile Ala Ala Gly Ser Ala
 340 345 350

<210> 45
 <211> 5468
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (285).. (4967)

10

<400> 45
 ggtatcgata agcttgatgg agcggacggc agacggggcg ggcggcgtca gggtcgcagc 60
 gtctacagct gctcgggggc gggtttcttgg cggaggcttg gccggctcct ctctcccggc 120
 tccgcggcgg ctgcgaaggc ggcggctcct gccctctcgc tttccctctc gcgtctctgg 180
 ctgcagaaag aagcttccgg ttctgaggtc ctggagggtc catttcctc tctgttgaag 240
 caaaggccgg ggcagacctc ctagtgaaag gaaagcaagc cagg atg gat att tac 296
 Met Asp Ile Tyr
 1

gac act caa acc ttg ggg gtt gtg gtc ttt gga gga ttc atg gtt gtt 344
 Asp Thr Gln Thr Leu Gly Val Val Val Phe Gly Gly Phe Met Val Val
 5 10 15 20

tct gcc att ggc atc ttc ctg gtg tcg act ttc tcc atg aag gaa acg 392
 Ser Ala Ile Gly Ile Phe Leu Val Ser Thr Phe Ser Met Lys Glu Thr
 25 30 35

tca tat gaa gaa gcc cta gcc aac cag cgc aag gag atg gcg aaa act 440
 Ser Tyr Glu Glu Ala Leu Ala Asn Gln Arg Lys Glu Met Ala Lys Thr
 40 45 50

cac cac cag aaa gtc gag aag aaa aag aag gag aaa aca gtg gag aag	488
His His Gln Lys Val Glu Lys Lys Lys Lys Glu Lys Thr Val Glu Lys	
55 60 65	
aaa gga aag acc aag aaa aag gaa gag aaa cct aat ggg aag ata cct	536
Lys Gly Lys Thr Lys Lys Lys Glu Glu Lys Pro Asn Gly Lys Ile Pro	
70 75 80	
gat cat gat cca gcc ccc aat gtg act gtc ctc ctt cga gaa cca gtg	584
Asp His Asp Pro Ala Pro Asn Val Thr Val Leu Leu Arg Glu Pro Val	
85 90 95 100	
cgg gct cct gct gtg gct gtg gct cca acc cca gtg cag ccc ccc att	632
Arg Ala Pro Ala Val Ala Val Ala Pro Thr Pro Val Gln Pro Pro Ile	
105 110 115	
atc gtt gct cct gtc gcc aca gtt cca gcc atg ccc cag gag aag ctg	680
Ile Val Ala Pro Val Ala Thr Val Pro Ala Met Pro Gln Glu Lys Leu	
120 125 130	
gcc tcc tcc ccc aag gac aaa aag aag aag gag aaa aaa gtg gca aaa	728
Ala Ser Ser Pro Lys Asp Lys Lys Lys Lys Glu Lys Lys Val Ala Lys	
135 140 145	
gtg gaa cca gct gtc agc tct gta gtg aat tcc atc cag gtt ctc act	776
Val Glu Pro Ala Val Ser Ser Val Val Asn Ser Ile Gln Val Leu Thr	
150 155 160	
tcg aag gct gcc atc ttg gaa act gct ccc aag gag gtg ccg atg gtg	824
Ser Lys Ala Ala Ile Leu Glu Thr Ala Pro Lys Glu Val Pro Met Val	
165 170 175 180	
gtg gtg ccc cca gtg ggt gcc aag ggc aac aca cca gcc act ggc act	872
Val Val Pro Pro Val Gly Ala Lys Gly Asn Thr Pro Ala Thr Gly Thr	
185 190 195	
act cag ggc aaa aag gcg gag ggg act cag aat caa agc aaa aag gct	920
Thr Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Gln Asn Gln Ser Lys Lys Ala	
200 205 210	
gaa gga gcc cca aac cag ggc aga aag gca gag gga acc cca aac cag	968

Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Arg Lys Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln	
215	220 225
ggc aaa aag aca gag gga acc cca aac caa ggg aaa aag gca gag gga	1016
Gly Lys Lys Thr Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly	
230	235 240
acc cca aac caa ggc aaa aag gca gaa gga acc cca aac caa ggc aaa	1064
Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys	
245	250 255 260
aag gcg gag ggg gcc cag aac cag ggt aaa aag gta gat aca acc cca	1112
Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Val Asp Thr Thr Pro	
265	270 275
aac cag ggg aaa aag gtg gag ggg gcc cca acc cag ggc aga aag gcc	1160
Asn Gln Gly Lys Lys Val Glu Gly Ala Pro Thr Gln Gly Arg Lys Ala	
280	285 290
gag ggg gct cag aac cag gcc aaa aag gta gaa ggg gcc cag aac cag	1208
Glu Gly Ala Gln Asn Gln Ala Lys Lys Val Glu Gly Ala Gln Asn Gln	
295	300 305
ggc aaa aag gca gag ggg gcc cag aat cag ggc aaa aag gga gag ggg	1256
Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Gly Glu Gly	
310	315 320
gcc cag aac cag ggc aag aag gcc gag ggg gcc cag aat cag ggc aag	1304
Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys	
325	330 335 340
aag gcc gag ggg gcc cag aat cag ggc aag aag gcc gag ggg gcc cag	1352
Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln	
345	350 355
aat cag ggc aag aag gcc gag ggg gcc cag aat cag ggc aag aag gct	1400
Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala	
360	365 370
gag ggg gct cag aac cag ggc aaa aag gcc gag ggg gct cag aac cag	1448
Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln	
375	380 385

ggc aaa aaa gta gaa ggg gcc cag aac cag ggc aag aag gct gag ggt	1496
Gly Lys Lys Val Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly	
390 395 400	
gcc cag aac cag ggc aaa aag gcc gag ggg gcc cag aat cag ggc aaa	1544
Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys	
405 410 415 420	
aag gcc gag ggg gcc cag aac cag ggc aag aag gca gag ggg gcc cag	1592
Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln	
425 430 435	
aac cag ggc aag aag gcc gag ggg gcc cag aac cag gac aag aag gcc	1640
Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Asp Lys Lys Ala	
440 445 450	
gag ggg gcc cag aac cag ggc agg aag gcc gag ggg gcc cag aac cag	1688
Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Arg Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln	
455 460 465	
ggc agg aag gcc gag ggg gcc cag aac cag ggc aag aag gcc gag ggg	1736
Gly Arg Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly	
470 475 480	
gcc ccg aac cag ggc aag aag gcc gag ggg gcc ccg aac cag ggc aag	1784
Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys	
485 490 495 500	
aag gcc gag ggg acc ccg aac cag ggc aag aag gcc gag ggg acc ccg	1832
Lys Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Pro	
505 510 515	
aac cag ggc aag aag gcc gag ggg acc ccg aac cag ggc aag aag gcc	1880
Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala	
520 525 530	
gag ggg gcc cag aac cag ggc aag aag gcc gag ggg gcc cag aac cag	1928
Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln	
535 540 545	
ggc aag aag gcc gag ggg acc ccg aac cag ggc aag aag gcc gag ggg	1976

Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Thr	Pro	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly		
550							555				560						
gcc	cag	aac	cag	ggc	aag	aag	gcc	gag	ggg	gcc	cag	aac	cag	ggc	aag	2024	
Ala	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ala	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys		
565					570					575					580		
aag	gcc	gag	ggg	gcc	cag	aac	cag	ggc	aag	aag	gcc	gag	ggg	gcc	cag	2072	
Lys	Ala	Glu	Gly	Ala	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ala	Gln		
				585					590					595			
aac	cag	ggc	aag	aag	gcc	gag	ggg	gcc	cag	aac	cag	ggc	aag	aag	gcc	2120	
Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ala	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala		
			600					605					610				
gag	ggt	gct	cag	aac	cag	ggc	aaa	aaa	gta	gaa	ggg	gcc	cag	aac	cag	2168	
Glu	Gly	Ala	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Val	Glu	Gly	Ala	Gln	Asn	Gln		
		615					620					625					
ggc	aag	aag	gct	gag	ggg	gcc	cag	aac	cag	ggc	aag	aag	gcc	gag	ggg	2216	
Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ala	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly		
	630					635					640						
gct	cag	aac	cag	ggc	aaa	aag	gcc	gag	gga	gcc	cag	aac	cag	ggc	caa	2264	
Ala	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ala	Gln	Asn	Gln	Gly	Gln		
645					650					655					660		
aaa	gga	gag	gga	gcc	cag	aat	cag	ggt	aaa	aag	aca	gaa	ggg	gct	cag	2312	
Lys	Gly	Glu	Gly	Ala	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Thr	Glu	Gly	Ala	Gln		
				665					670					675			
ggc	aaa	aag	gca	gaa	agg	agt	ccc	aac	caa	ggc	aaa	aaa	gga	gag	gga	2360	
Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Arg	Ser	Pro	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Gly	Glu	Gly		
			680					685					690				
gct	ccc	atc	cag	ggc	aaa	aag	gca	gat	tcg	gtt	gct	aat	cag	ggc	aca	2408	
Ala	Pro	Ile	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Asp	Ser	Val	Ala	Asn	Gln	Gly	Thr		
		695					700					705					
aag	gta	gag	ggt	att	aca	aac	cag	ggg	aaa	aaa	gca	gaa	ggg	tcc	ccc	2456	
Lys	Val	Glu	Gly	Ile	Thr	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Pro		
	710					715					720						

agt	gaa	ggc	aaa	aag	gca	gaa	ggg	tcc	ccc	aac	caa	ggc	aaa	aag	gca	2504
Ser	Glu	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Pro	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	
725					730					735					740	
gac	gca	gct	gcc	aat	cag	ggt	aaa	aag	aca	gag	tca	gct	tct	gtc	cag	2552
Asp	Ala	Ala	Ala	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Thr	Glu	Ser	Ala	Ser	Val	Gln	
				745					750					755		
ggc	aga	aat	aca	gat	gtg	gcc	cag	agc	cca	gag	gca	cca	aag	caa	gag	2600
Gly	Arg	Asn	Thr	Asp	Val	Ala	Gln	Ser	Pro	Glu	Ala	Pro	Lys	Gln	Glu	
			760					765						770		
gct	cct	gcc	aag	aag	aag	tct	ggt	tca	aag	aaa	aaa	ggt	gag	cct	ggg	2648
Ala	Pro	Ala	Lys	Lys	Lys	Ser	Gly	Ser	Lys	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	
		775					780						785			
ccc	cca	gat	gcc	gac	ggc	cct	ctc	tac	ctc	ccc	tac	aag	acg	ctg	gtc	2696
Pro	Pro	Asp	Ala	Asp	Gly	Pro	Leu	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Lys	Thr	Leu	Val	
	790					795					800					
tcc	acg	gtt	ggg	agc	atg	gtg	ttc	aac	gag	ggc	gag	gcc	cag	cgg	ctc	2744
Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Met	Val	Phe	Asn	Glu	Gly	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	
805					810					815					820	
atc	gag	atc	ctg	tct	gag	aag	gct	ggc	atc	att	cag	gac	acc	tgg	cac	2792
Ile	Glu	Ile	Leu	Ser	Glu	Lys	Ala	Gly	Ile	Ile	Gln	Asp	Thr	Trp	His	
				825					830					835		
aag	gcc	act	cag	aag	ggt	gac	cct	gtg	gcg	att	ctg	aaa	cgc	cag	ctg	2840
Lys	Ala	Thr	Gln	Lys	Gly	Asp	Pro	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Arg	Gln	Leu	
			840					845					850			
gaa	gag	aag	gaa	aaa	ctg	ctg	gcc	aca	gaa	cag	gaa	gat	gcg	gct	gtc	2888
Glu	Glu	Lys	Glu	Lys	Leu	Leu	Ala	Thr	Glu	Gln	Glu	Asp	Ala	Ala	Val	
		855					860					865				
gcc	aag	agc	aaa	ctg	agg	gag	ctc	aac	aag	gag	atg	gca	gca	gaa	aag	2936
Ala	Lys	Ser	Lys	Leu	Arg	Glu	Leu	Asn	Lys	Glu	Met	Ala	Ala	Glu	Lys	
	870					875					880					
gcc	aaa	gca	gca	gcc	ggg	gag	gcc	aaa	gtg	aaa	aag	cag	ctg	gtg	gcc	2984

Ala Lys Ala Ala Ala Gly Glu Ala Lys Val Lys Lys Gln Leu Val Ala	
885	890 895 900
cgg gag cag gag atc acg gct gtg cag gca cgc atg cag gcc agc tac	3032
Arg Glu Gln Glu Ile Thr Ala Val Gln Ala Arg Met Gln Ala Ser Tyr	
905 910 915	
cgg gag cac gtg aag gag gtg cag cag ctg cag ggc aag atc cgg act	3080
Arg Glu His Val Lys Glu Val Gln Gln Leu Gln Gly Lys Ile Arg Thr	
920 925 930	
ctt cag gag cag ctg gag aat ggc ccc aac acg cag ctg gcc cgc ctg	3128
Leu Gln Glu Gln Leu Glu Asn Gly Pro Asn Thr Gln Leu Ala Arg Leu	
935 940 945	
cag cag gag aac tcc atc ctg cgg gat gcc ttg aac cag gcc acg agc	3176
Gln Gln Glu Asn Ser Ile Leu Arg Asp Ala Leu Asn Gln Ala Thr Ser	
950 955 960	
cag gtg gag agc aag cag aac gca gag ctg gcc aag ctt cgg cag gag	3224
Gln Val Glu Ser Lys Gln Asn Ala Glu Leu Ala Lys Leu Arg Gln Glu	
965 970 975 980	
ctc agc aag gtc agc aaa gag ctg gtg gag aag tca gag gct gtg cgg	3272
Leu Ser Lys Val Ser Lys Glu Leu Val Glu Lys Ser Glu Ala Val Arg	
985 990 995	
caa gat gag cag cag cgg aaa gct ctg gaa gcc aag gca gct gcc ttc	3320
Gln Asp Glu Gln Gln Arg Lys Ala Leu Glu Ala Lys Ala Ala Ala Phe	
1000 1005 1010	
gag aag cag gtc ctg cag ctg cag gcg tcc cac agg gag agt gag gag	3368
Glu Lys Gln Val Leu Gln Leu Gln Ala Ser His Arg Glu Ser Glu Glu	
1015 1020 1025	
gcc ctg cag aag cgc ctg gac gag gtc agc cgg gag ctg tgc cac acg	3416
Ala Leu Gln Lys Arg Leu Asp Glu Val Ser Arg Glu Leu Cys His Thr	
1030 1035 1040	
cag agc agc cac gcc agc ctc cgg gcg gat gcc gag aag gcc cag gag	3464
Gln Ser Ser His Ala Ser Leu Arg Ala Asp Ala Glu Lys Ala Gln Glu	
1045 1050 1055 1060	

caa cag cag cag atg gcc gag ctg cac agc aag tta cag tcc tcc gag	3512
Gln Gln Gln Gln Met Ala Glu Leu His Ser Lys Leu Gln Ser Ser Glu	
1065 1070 1075	
gcg gag gtg cgc agc aaa tgc gag gag ctg agt ggc ctc cac ggg cag	3560
Ala Glu Val Arg Ser Lys Cys Glu Glu Leu Ser Gly Leu His Gly Gln	
1080 1085 1090	
ctc cag gag gcc agg gcg gag aac tcc cag ctc aca gag aga atc cgt	3608
Leu Gln Glu Ala Arg Ala Glu Asn Ser Gln Leu Thr Glu Arg Ile Arg	
1095 1100 1105	
tcc att gag gcc ctg ctg gag gcg ggc cag gcg cgg gat gcc cag gac	3656
Ser Ile Glu Ala Leu Leu Glu Ala Gly Gln Ala Arg Asp Ala Gln Asp	
1110 1115 1120	
gtc cag gcc agc cag gcg gag gct gac cag cag cag act cgc ctc aag	3704
Val Gln Ala Ser Gln Ala Glu Ala Asp Gln Gln Gln Thr Arg Leu Lys	
1125 1130 1135 1140	
gag ctg gag tcc cag gtg tgc ggt ctg gag aag gag gcc atc gag ctc	3752
Glu Leu Glu Ser Gln Val Ser Gly Leu Glu Lys Glu Ala Ile Glu Leu	
1145 1150 1155	
agg gag gcc gtc gag cag cag aaa gtg aag aac aat gac ctc cgg gag	3800
Arg Glu Ala Val Glu Gln Gln Lys Val Lys Asn Asn Asp Leu Arg Glu	
1160 1165 1170	
aag aac tgg aag gcc atg gag gca ctg gcc acg gcc gag cag gcc tgc	3848
Lys Asn Trp Lys Ala Met Glu Ala Leu Ala Thr Ala Glu Gln Ala Cys	
1175 1180 1185	
aag gag aag ctg cac tcc ctg acc cag gcc aag gag gaa tcg gag aag	3896
Lys Glu Lys Leu His Ser Leu Thr Gln Ala Lys Glu Glu Ser Glu Lys	
1190 1195 1200	
cag ctc tgt ctg att gag gcg cag acc atg gag gcc ctg ctg gct ctg	3944
Gln Leu Cys Leu Ile Glu Ala Gln Thr Met Glu Ala Leu Leu Ala Leu	
1205 1210 1215 1220	
ctc cca gaa ctc tct gtc ttg gca caa cag aat tac acc gag tgg ctg	3992

Leu Pro Glu Leu Ser Val Leu Ala Gln Gln Asn Tyr Thr Glu Trp Leu	
1225	1230 1235
cag gat ctc aaa gag aaa ggc ccc acg ctg ctg aag cac ccg cca gct	4040
Gln Asp Leu Lys Glu Lys Gly Pro Thr Leu Leu Lys His Pro Pro Ala	
1240	1245 1250
ccc gcg gag ccc tcc tcg gac ctg gcc tcc aag ttg agg gag gcc gag	4088
Pro Ala Glu Pro Ser Ser Asp Leu Ala Ser Lys Leu Arg Glu Ala Glu	
1255	1260 1265
gag acg cag agc aca ctg cag gcc gag tgt gac cag tac cgc agc atc	4136
Glu Thr Gln Ser Thr Leu Gln Ala Glu Cys Asp Gln Tyr Arg Ser Ile	
1270	1275 1280
ctg gcg gag acg gag ggc atg ctc aga gac ctg cag aag agc gtg gag	4184
Leu Ala Glu Thr Glu Gly Met Leu Arg Asp Leu Gln Lys Ser Val Glu	
1285	1290 1295 1300
gag gag gag cag gtg tgg agg gcc aag gtg ggc gcc gca gag gag gag	4232
Glu Glu Glu Gln Val Trp Arg Ala Lys Val Gly Ala Ala Glu Glu Glu	
1305	1310 1315
ctc cag aag tcc cgg gtc aca gtg aag cat ctc gaa gag att gta gag	4280
Leu Gln Lys Ser Arg Val Thr Val Lys His Leu Glu Glu Ile Val Glu	
1320	1325 1330
aag cta aaa gga gaa ctt gaa agt tcg gac cag gtg agg gag cac acg	4328
Lys Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ser Ser Asp Gln Val Arg Glu His Thr	
1335	1340 1345
ttg cat ttg gag gca gag ctg gaa aag cac atg gcg gcc gcc agc gcc	4376
Leu His Leu Glu Ala Glu Leu Glu Lys His Met Ala Ala Ala Ser Ala	
1350	1355 1360
gag tgc cag aac tac gcc aag gag gtg gca ggg ctg agg caa ctt ctc	4424
Glu Cys Gln Asn Tyr Ala Lys Glu Val Ala Gly Leu Arg Gln Leu Leu	
1365	1370 1375 1380
cta gaa tct caa tct cag ctc gat gcc gcc aag agc gaa gcc cag aaa	4472
Leu Glu Ser Gln Ser Gln Leu Asp Ala Ala Lys Ser Glu Ala Gln Lys	
1385	1390 1395

cag agc gat gag ctt gcc ctg gtc agg cag cag ttg agt gaa atg aag	4520
Gln Ser Asp Glu Leu Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Ser Glu Met Lys	
1400 1405 1410	
agc cac gta gag gat ggt gac ata gct ggg gcc cca gct tcc tcc cca	4568
Ser His Val Glu Asp Gly Asp Ile Ala Gly Ala Pro Ala Ser Ser Pro	
1415 1420 1425	
gag gcg ccc cca gcc gag cag gac ccc gtt cag ctg aag acg cag ctg	4616
Glu Ala Pro Pro Ala Glu Gln Asp Pro Val Gln Leu Lys Thr Gln Leu	
1430 1435 1440	
gag tgg aca gaa gcc atc ctg gag gat gag cag aca cag cgg cag aag	4664
Glu Trp Thr Glu Ala Ile Leu Glu Asp Glu Gln Thr Gln Arg Gln Lys	
1445 1450 1455 1460	
ctc acg gcc gag ttt gag gag gct cag acc tcg gca tgt cgg tta caa	4712
Leu Thr Ala Glu Phe Glu Glu Ala Gln Thr Ser Ala Cys Arg Leu Gln	
1465 1470 1475	
gaa gaa ttg gag aag ctc cgc aca gcc ggc ccc cta gag tct tca gaa	4760
Glu Glu Leu Glu Lys Leu Arg Thr Ala Gly Pro Leu Glu Ser Ser Glu	
1480 1485 1490	
aca gag gag gcc tca cag ctg aag gag aga cta gaa aaa gag aag aag	4808
Thr Glu Glu Ala Ser Gln Leu Lys Glu Arg Leu Glu Lys Glu Lys Lys	
1495 1500 1505	
tta aca agt gac ctg ggg cgc gcc gcc acg aga ctg cag gag ctt ctg	4856
Leu Thr Ser Asp Leu Gly Arg Ala Ala Thr Arg Leu Gln Glu Leu Leu	
1510 1515 1520	
aag acg acc cag gag cag ctg gca agg gag aag gac acg gtg aag aag	4904
Lys Thr Thr Gln Glu Gln Leu Ala Arg Glu Lys Asp Thr Val Lys Lys	
1525 1530 1535 1540	
ctg cag gaa cag ctg gaa aag gca gag gac ggc agc agc tca aag gag	4952
Leu Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Glu Asp Gly Ser Ser Ser Lys Glu	
1545 1550 1555	
ggc acc tct gtc tga gtttctctt tggaaaaaga agttactgtt caacttacca	5007

Gly Thr Ser Val

1560

aaatgcctta cacattcctt acaaataaac caaccaacct acacagcgtt atccaggccc 5067

aacttccggt actccgagag aagccatgag agacaagtct cttagagcca cagaagtaga 5127

ccttccagag cccagtttg taaatgaacc tgtgtcacat ttgataaaca ctatcctggg 5187

cgcagccccg ggccaccgcc gagtgcgcc aaagccctgg ttgactctga cagccccgtg 5247

gggtgtgtggg aggccgggcg ctctggggtc tgtctgtcag tgcaatcgtt tagtgttttt 5307

tcagtggggc ggggcgggaa gcggttgga cgggcagcc agttctcaa ggctgtgggg 5367

ccgactggag gccacagccc ctcacccta gacgttgcca accagaactg acgtgtgacc 5427

tcctgggtgt tgatgccatt aaaaccaacg ttggtgccc g 5468

<210> 46

<211> 1560

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

Met Asp Ile Tyr Asp Thr Gln Thr Leu Gly Val Val Val Phe Gly Gly

1

5

10

15

Phe Met Val Val Ser Ala Ile Gly Ile Phe Leu Val Ser Thr Phe Ser

20

25

30

Met Lys Glu Thr Ser Tyr Glu Glu Ala Leu Ala Asn Gln Arg Lys Glu

35

40

45

Met Ala Lys Thr His His Gln Lys Val Glu Lys Lys Lys Lys Glu Lys

50

55

60

Thr Val Glu Lys Lys Gly Lys Thr Lys Lys Lys Glu Glu Lys Pro Asn

65

70

75

80

Gly Lys Ile Pro Asp His Asp Pro Ala Pro Asn Val Thr Val Leu Leu

85

90

95

Arg Glu Pro Val Arg Ala Pro Ala Val Ala Val Ala Pro Thr Pro Val

100

105

110

Gln Pro Pro Ile Ile Val Ala Pro Val Ala Thr Val Pro Ala Met Pro

115

120

125

5

Gln Glu Lys Leu Ala Ser Ser Pro Lys Asp Lys Lys Lys Lys Glu Lys
 130 135 140
 Lys Val Ala Lys Val Glu Pro Ala Val Ser Ser Val Val Asn Ser Ile
 145 150 155 160
 Gln Val Leu Thr Ser Lys Ala Ala Ile Leu Glu Thr Ala Pro Lys Glu
 165 170 175
 Val Pro Met Val Val Val Pro Pro Val Gly Ala Lys Gly Asn Thr Pro
 180 185 190
 Ala Thr Gly Thr Thr Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Gln Asn Gln
 195 200 205
 Ser Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Arg Lys Ala Glu Gly
 210 215 220
 Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Thr Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys
 225 230 235 240
 Lys Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Pro
 245 250 255
 Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Val
 260 265 270
 Asp Thr Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Val Glu Gly Ala Pro Thr Gln
 275 280 285
 Gly Arg Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Ala Lys Lys Val Glu Gly
 290 295 300
 Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys
 305 310 315 320
 Lys Gly Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln
 325 330 335
 Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala
 340 345 350
 Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln
 355 360 365
 Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly
 370 375 380
 Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Val Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys
 385 390 395 400
 Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln
 405 410 415
 Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala
 420 425 430
 Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln
 435 440 445
 Asp Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Arg Lys Ala Glu Gly
 450 455 460

Ala Gln Asn Gln Gly Arg Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys			
465	470	475	480
Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro			
	485	490	495
Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala			
	500	505	510
Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln			
	515	520	525
Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly			
	530	535	540
Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys			
545	550	555	560
Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln			
	565	570	575
Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala			
	580	585	590
Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln			
	595	600	605
Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Val Glu Gly			
	610	615	620
Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys			
625	630	635	640
Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln			
	645	650	655
Asn Gln Gly Gln Lys Gly Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Thr			
	660	665	670
Glu Gly Ala Gln Gly Lys Lys Ala Glu Arg Ser Pro Asn Gln Gly Lys			
	675	680	685
Lys Gly Glu Gly Ala Pro Ile Gln Gly Lys Lys Ala Asp Ser Val Ala			
	690	695	700
Asn Gln Gly Thr Lys Val Glu Gly Ile Thr Asn Gln Gly Lys Lys Ala			
705	710	715	720
Glu Gly Ser Pro Ser Glu Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ser Pro Asn Gln			
	725	730	735
Gly Lys Lys Ala Asp Ala Ala Ala Asn Gln Gly Lys Lys Thr Glu Ser			
	740	745	750
Ala Ser Val Gln Gly Arg Asn Thr Asp Val Ala Gln Ser Pro Glu Ala			
	755	760	765
Pro Lys Gln Glu Ala Pro Ala Lys Lys Lys Ser Gly Ser Lys Lys Lys			
	770	775	780
Gly Glu Pro Gly Pro Pro Asp Ala Asp Gly Pro Leu Tyr Leu Pro Tyr			
785	790	795	800

Lys Thr Leu Val Ser Thr Val Gly Ser Met Val Phe Asn Glu Gly Glu			
	805	810	815
Ala Gln Arg Leu Ile Glu Ile Leu Ser Glu Lys Ala Gly Ile Ile Gln			
	820	825	830
Asp Thr Trp His Lys Ala Thr Gln Lys Gly Asp Pro Val Ala Ile Leu			
	835	840	845
Lys Arg Gln Leu Glu Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Thr Glu Gln Glu			
	850	855	860
Asp Ala Ala Val Ala Lys Ser Lys Leu Arg Glu Leu Asn Lys Glu Met			
865	870	875	880
Ala Ala Glu Lys Ala Lys Ala Ala Ala Gly Glu Ala Lys Val Lys Lys			
	885	890	895
Gln Leu Val Ala Arg Glu Gln Glu Ile Thr Ala Val Gln Ala Arg Met			
	900	905	910
Gln Ala Ser Tyr Arg Glu His Val Lys Glu Val Gln Gln Leu Gln Gly			
	915	920	925
Lys Ile Arg Thr Leu Gln Glu Gln Leu Glu Asn Gly Pro Asn Thr Gln			
930	935	940	
Leu Ala Arg Leu Gln Gln Glu Asn Ser Ile Leu Arg Asp Ala Leu Asn			
945	950	955	960
Gln Ala Thr Ser Gln Val Glu Ser Lys Gln Asn Ala Glu Leu Ala Lys			
	965	970	975
Leu Arg Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Lys Glu Leu Val Glu Lys Ser			
	980	985	990
Glu Ala Val Arg Gln Asp Glu Gln Gln Arg Lys Ala Leu Glu Ala Lys			
	995	1000	1005
Ala Ala Ala Phe Glu Lys Gln Val Leu Gln Leu Gln Ala Ser His Arg			
1010	1015	1020	
Glu Ser Glu Glu Ala Leu Gln Lys Arg Leu Asp Glu Val Ser Arg Glu			
1025	1030	1035	1040
Leu Cys His Thr Gln Ser Ser His Ala Ser Leu Arg Ala Asp Ala Glu			
	1045	1050	1055
Lys Ala Gln Glu Gln Gln Gln Met Ala Glu Leu His Ser Lys Leu			
	1060	1065	1070
Gln Ser Ser Glu Ala Glu Val Arg Ser Lys Cys Glu Glu Leu Ser Gly			
	1075	1080	1085
Leu His Gly Gln Leu Gln Glu Ala Arg Ala Glu Asn Ser Gln Leu Thr			
	1090	1095	1100
Glu Arg Ile Arg Ser Ile Glu Ala Leu Leu Glu Ala Gly Gln Ala Arg			
1105	1110	1115	1120
Asp Ala Gln Asp Val Gln Ala Ser Gln Ala Glu Ala Asp Gln Gln Gln			
	1125	1130	1135

Thr Arg Leu Lys Glu Leu Glu Ser Gln Val Ser Gly Leu Glu Lys Glu
 1140 1145 1150
 Ala Ile Glu Leu Arg Glu Ala Val Glu Gln Gln Lys Val Lys Asn Asn
 1155 1160 1165
 Asp Leu Arg Glu Lys Asn Trp Lys Ala Met Glu Ala Leu Ala Thr Ala
 1170 1175 1180
 Glu Gln Ala Cys Lys Glu Lys Leu His Ser Leu Thr Gln Ala Lys Glu
 1185 1190 1195 1200
 Glu Ser Glu Lys Gln Leu Cys Leu Ile Glu Ala Gln Thr Met Glu Ala
 1205 1210 1215
 Leu Leu Ala Leu Leu Pro Glu Leu Ser Val Leu Ala Gln Gln Asn Tyr
 1220 1225 1230
 Thr Glu Trp Leu Gln Asp Leu Lys Glu Lys Gly Pro Thr Leu Leu Lys
 1235 1240 1245
 His Pro Pro Ala Pro Ala Glu Pro Ser Ser Asp Leu Ala Ser Lys Leu
 1250 1255 1260
 Arg Glu Ala Glu Glu Thr Gln Ser Thr Leu Gln Ala Glu Cys Asp Gln
 1265 1270 1275 1280
 Tyr Arg Ser Ile Leu Ala Glu Thr Glu Gly Met Leu Arg Asp Leu Gln
 1285 1290 1295
 Lys Ser Val Glu Glu Glu Glu Gln Val Trp Arg Ala Lys Val Gly Ala
 1300 1305 1310
 Ala Glu Glu Glu Leu Gln Lys Ser Arg Val Thr Val Lys His Leu Glu
 1315 1320 1325
 Glu Ile Val Glu Lys Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ser Ser Asp Gln Val
 1330 1335 1340
 Arg Glu His Thr Leu His Leu Glu Ala Glu Leu Glu Lys His Met Ala
 1345 1350 1355 1360
 Ala Ala Ser Ala Glu Cys Gln Asn Tyr Ala Lys Glu Val Ala Gly Leu
 1365 1370 1375
 Arg Gln Leu Leu Leu Glu Ser Gln Ser Gln Leu Asp Ala Ala Lys Ser
 1380 1385 1390
 Glu Ala Gln Lys Gln Ser Asp Glu Leu Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu
 1395 1400 1405
 Ser Glu Met Lys Ser His Val Glu Asp Gly Asp Ile Ala Gly Ala Pro
 1410 1415 1420
 Ala Ser Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Gln Asp Pro Val Gln Leu
 1425 1430 1435 1440
 Lys Thr Gln Leu Glu Trp Thr Glu Ala Ile Leu Glu Asp Glu Gln Thr
 1445 1450 1455
 Gln Arg Gln Lys Leu Thr Ala Glu Phe Glu Glu Ala Gln Thr Ser Ala
 1460 1465 1470

Cys Arg Leu Gln Glu Glu Leu Glu Lys Leu Arg Thr Ala Gly Pro Leu
1475 1480 1485
Glu Ser Ser Glu Thr Glu Glu Ala Ser Gln Leu Lys Glu Arg Leu Glu
1490 1495 1500
Lys Glu Lys Lys Leu Thr Ser Asp Leu Gly Arg Ala Ala Thr Arg Leu
1505 1510 1515 1520
Gln Glu Leu Leu Lys Thr Thr Gln Glu Gln Leu Ala Arg Glu Lys Asp
1525 1530 1535
Thr Val Lys Lys Leu Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Glu Asp Gly Ser
1540 1545 1550
Ser Ser Lys Glu Gly Thr Ser Val
1555 1560

<210> 47
<211> 5425
5 <212> ADN
<213> *Canis familiaris*

<220>
10 <221> CDS
<222> (244)..(4848)

<400> 47
gaggcagaaa gtgccacgac tccacacgcg cgcacgcagc cagcgagcgg ccggagcggg 60
cggcggacgg ggcggacggc ggtggggctc cggcgctgc agctgctcgg ggcggcttct 120
cggcggaggg tcggccggt cctctctccc ggctccgcgg cggcggcggc ggcggcggcg 180
gctcctgccc ttctgctctc cctcccgcgt ctccggctgc aggtaaaggg aaagcaagcc 240

agg atg gat att tac gac act cag acc ttg ggg gtt atg gta ttc ggt 288
Met Asp Ile Tyr Asp Thr Gln Thr Leu Gly Val Met Val Phe Gly
1 5 10 15

gga ttc atg gtc gtt tct gcc atc ggc atc ttc ctg gtg tca acc ttt 336
Gly Phe Met Val Val Ser Ala Ile Gly Ile Phe Leu Val Ser Thr Phe
20 25 30

tcc atg aag gag acg tca tat gaa gaa gcc cta gcc aac cag cgc aag 384
Ser Met Lys Glu Thr Ser Tyr Glu Glu Ala Leu Ala Asn Gln Arg Lys
35 40 45

gag atg gca aaa act cac cac cag aaa gta gag aag aaa aag aag gag	432
Glu Met Ala Lys Thr His His Gln Lys Val Glu Lys Lys Lys Lys Glu	
50 55 60	
aaa aca gtg gag aag aaa gga aaa acc aag aaa aag gaa gag aaa cct	480
Lys Thr Val Glu Lys Lys Gly Lys Thr Lys Lys Lys Glu Glu Lys Pro	
65 70 75	
aac ggg aag ata cct gac cat gag cca gcc ccc aat gtg acc atc ctt	528
Asn Gly Lys Ile Pro Asp His Glu Pro Ala Pro Asn Val Thr Ile Leu	
80 85 90 95	
ctc aaa gac cca gtg agg gca ccc gca gtg ccc gtg gct cca act ccg	576
Leu Lys Asp Pro Val Arg Ala Pro Ala Val Pro Val Ala Pro Thr Pro	
100 105 110	
gtc cag cct cct gtg gtc att gcc cct gta gcc aca gta cca gcc atg	624
Val Gln Pro Pro Val Val Ile Ala Pro Val Ala Thr Val Pro Ala Met	
115 120 125	
ccc caa gag aag ttg gcc cct tct cct aag gac aaa aag aaa aag gag	672
Pro Gln Glu Lys Leu Ala Pro Ser Pro Lys Asp Lys Lys Lys Lys Glu	
130 135 140	
aaa aaa gtg gca aag gtg gaa cca gca gtc agt tct gta gtg aat tcc	720
Lys Lys Val Ala Lys Val Glu Pro Ala Val Ser Ser Val Val Asn Ser	
145 150 155	
gtc caa gtt ctt gcc tcc aag gct gcc atc tta gaa act gct ccc aag	768
Val Gln Val Leu Ala Ser Lys Ala Ala Ile Leu Glu Thr Ala Pro Lys	
160 165 170 175	
gag gtg cct atg gtg gtt gtg ccc cca gtg ggt gcc aag gcc ggt acc	816
Glu Val Pro Met Val Val Val Pro Pro Val Gly Ala Lys Ala Gly Thr	
180 185 190	
cca gcc acc agc act gca cag ggc aaa aag gca gag gga gcc cag aac	864
Pro Ala Thr Ser Thr Ala Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn	
195 200 205	
cag agc aga aag gca gag gga gcc ccc aac cag ggc aaa aag gca gag	912

Gln Ser Arg Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu	
210 215 220	
ggg gcc ctc aac caa ggc aaa aag gca gag ggg gcc cag aat cag ggc	960
Gly Ala Leu Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly	
225 230 235	
aaa aag gta gaa gtg gcc cca aac caa ggc aaa aag gca gag ggg ggc	1008
Lys Lys Val Glu Val Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Gly	
240 245 250 255	
cag aat cag ggc aaa aag gta gaa ggg gcc cag aat cag ggc aaa aag	1056
Gln Asn Gln Gly Lys Lys Val Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys	
260 265 270	
gca gaa gga acc cca aac cag ggc aaa aag gca gaa ggg gcc ccc aac	1104
Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn	
275 280 285	
caa ggc aaa aag aca gat ggg gct ccc aac cag ggc aaa aag tca gaa	1152
Gln Gly Lys Lys Thr Asp Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ser Glu	
290 295 300	
gga gct cca aac cag ggc aaa aag gca gag ggg gcc cag aat cag ggc	1200
Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly	
305 310 315	
aaa aag gta gaa gtg gcc cca aac caa ggc aaa aag gca gag ggg ggc	1248
Lys Lys Val Glu Val Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Gly	
320 325 330 335	
cag aat cag ggc aaa aag gta gaa ggg gcc cag aat cag ggc aaa aag	1296
Gln Asn Gln Gly Lys Lys Val Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys	
340 345 350	
gca gaa gga acc cca aac cag ggc aaa aag gca gaa ggg gcc ccc aac	1344
Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn	
355 360 365	
caa ggc aaa aag aca gat ggg gct ccc aac cag ggc aaa aag tca gaa	1392
Gln Gly Lys Lys Thr Asp Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ser Glu	
370 375 380	

gga gct cca aac cag ggc aaa aaa gta gag ggg gcc cag aat caa ggc	1440
Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Val Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly	
385 390 395	
aaa aag gta gag ggg gtg cag aat cag ggc aaa aaa gcc gaa gga gca	1488
Lys Lys Val Glu Gly Val Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala	
400 405 410 415	
cag aat cag ggc aaa aag gca gaa ggg acc tcc agc cag ggt aga aaa	1536
Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Ser Ser Gln Gly Arg Lys	
420 425 430	
gag gag ggg acc cca aac ctg ggc aaa aag gca gag ggg agc ccc aat	1584
Glu Glu Gly Thr Pro Asn Leu Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ser Pro Asn	
435 440 445	
cag ggc aaa aag gtg gaa gtg gtt cag aac cag agc aaa aag gta gag	1632
Gln Gly Lys Lys Val Glu Val Val Gln Asn Gln Ser Lys Lys Val Glu	
450 455 460	
gga gcc ccc aac cag ggc aaa aaa gca gag ggg tct cag aac cag ggc	1680
Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ser Gln Asn Gln Gly	
465 470 475	
aaa aag aca gaa ggg gcc tcc aac caa ggc aaa aag gtg gat ggg gct	1728
Lys Lys Thr Glu Gly Ala Ser Asn Gln Gly Lys Lys Val Asp Gly Ala	
480 485 490 495	
cag aac cag ggc aaa aag gca gag gga gcc ccc aac cag ggt aaa aag	1776
Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys	
500 505 510	
gta gag ggg gct cag aac cag ggc aaa aag gca gag ggg acc ccc aac	1824
Val Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Pro Asn	
515 520 525	
cag ggt aaa aag gca gag ggg gct cag aac cag ggc aaa aag gca gag	1872
Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu	
530 535 540	
ggg gct ccc aac cag ggc aaa aag gca gag ggg gct ccc aac cag ggc	1920

Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly	
545	550 555
aaa aag gca gag ggg gct ccc aac cag ggc aaa aag gca gag ggg gct	1968
Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala	
560	565 570 575
ccc aac cag ggc aaa aag gca gag gcg gct ccc aac cag ggc aaa aag	2016
Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Ala Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys	
580	585 590
gca gag ggg gct ccc aac cag ggc aaa aag gca gag ggg gct ccc aac	2064
Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn	
595	600 605
cag ggc aaa aag gca gag gcg gct ccc aac cag ggc aaa aag gca gag	2112
Gln Gly Lys Lys Ala Glu Ala Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu	
610	615 620
ggg gct ccc aac cag ggc aaa aag gca gag ggg gct ccc aac cag ggc	2160
Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly	
625	630 635
aaa aag gca gag ggg gct ccc aac cag ggc aaa aag gca gag ggg gcc	2208
Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala	
640	645 650 655
cag aat cag ggc aaa aag gca gag ggg gct ccc aac cag ggt aaa aag	2256
Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys	
660	665 670
gca gat ttg gtt gct aat caa ggc aca aag gca gag ggt gtt gca ggc	2304
Ala Asp Leu Val Ala Asn Gln Gly Thr Lys Ala Glu Gly Val Ala Gly	
675	680 685
cag ggg aaa aaa gca gag ggg gcc ccc aat caa ggc aaa aag gga gaa	2352
Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Gly Glu	
690	695 700
gga acc cca aac cag ggc aaa aag tca gaa gga tct ccc aac cag ggc	2400
Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ser Glu Gly Ser Pro Asn Gln Gly	
705	710 715

aaa aag gtg gat gcg tct gcc aat cag agt aaa agg gca gag tca gct	2448
Lys Lys Val Asp Ala Ser Ala Asn Gln Ser Lys Arg Ala Glu Ser Ala	
720 725 730 735	
cct atc caa ggc aaa aat gca gat atg gtc cag agc caa gag gca cca	2496
Pro Ile Gln Gly Lys Asn Ala Asp Met Val Gln Ser Gln Glu Ala Pro	
740 745 750	
aag caa gag gct cct gca aag aag aaa tct ggt tca aag aag aaa ggt	2544
Lys Gln Glu Ala Pro Ala Lys Lys Lys Ser Gly Ser Lys Lys Lys Gly	
755 760 765	
gag cct ggg cct cca gac tct gac agc cct ctc tac ctc ccc tac aag	2592
Glu Pro Gly Pro Pro Asp Ser Asp Ser Pro Leu Tyr Leu Pro Tyr Lys	
770 775 780	
acg ctg gtc tcc aca gtt gga agc atg gta ttc aac gag ggt gag gcc	2640
Thr Leu Val Ser Thr Val Gly Ser Met Val Phe Asn Glu Gly Glu Ala	
785 790 795	
cag cgg ctc att gag atc ctg tcc gag aag gct ggt gtc att caa gac	2688
Gln Arg Leu Ile Glu Ile Leu Ser Glu Lys Ala Gly Val Ile Gln Asp	
800 805 810 815	
acc tgg cat aag gct act cag aag ggt gac ccc gtg gcg att ctg aag	2736
Thr Trp His Lys Ala Thr Gln Lys Gly Asp Pro Val Ala Ile Leu Lys	
820 825 830	
cgc cag cta gaa gag aag gag aag ctg ctg gcc aca gag cag gag gac	2784
Arg Gln Leu Glu Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Thr Glu Gln Glu Asp	
835 840 845	
gcg gct gtt gcg aag agc aaa ctg agg gag gtg aat aag gag ctg gca	2832
Ala Ala Val Ala Lys Ser Lys Leu Arg Glu Val Asn Lys Glu Leu Ala	
850 855 860	
gca gaa aag gct aag gca gca gcg ggg gag gcc aag gtg aag aag cag	2880
Ala Glu Lys Ala Lys Ala Ala Ala Gly Glu Ala Lys Val Lys Lys Gln	
865 870 875	
ctg gtg gcc cgg gag cag gag atc aca gcc gtg cag gcg cgc atc gaa	2928

Leu	Val	Ala	Arg	Glu	Gln	Glu	Ile	Thr	Ala	Val	Gln	Ala	Arg	Ile	Glu	
880						885					890				895	
gcc	agc	tac	cgg	gag	cat	gtg	aag	gag	gtg	cag	cag	ctg	cag	ggc	aag	2976
Ala	Ser	Tyr	Arg	Glu	His	Val	Lys	Glu	Val	Gln	Gln	Leu	Gln	Gly	Lys	
				900					905					910		
atc	cgg	acc	ctt	cag	gag	cag	ttg	gag	aac	ggc	ccc	aac	aca	cag	ctg	3024
Ile	Arg	Thr	Leu	Gln	Glu	Gln	Leu	Glu	Asn	Gly	Pro	Asn	Thr	Gln	Leu	
				915				920					925			
gcc	cgt	ctg	cag	cag	gaa	aat	tcc	atc	ctg	agg	gat	gcc	ttg	aac	cag	3072
Ala	Arg	Leu	Gln	Gln	Glu	Asn	Ser	Ile	Leu	Arg	Asp	Ala	Leu	Asn	Gln	
		930					935					940				
gcc	acg	agc	cag	gtg	gag	agc	aag	cag	aac	acc	gag	ctg	gcc	aag	ctc	3120
Ala	Thr	Ser	Gln	Val	Glu	Ser	Lys	Gln	Asn	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Leu	
	945					950					955					
cgg	cag	gag	ctc	agc	aag	gtc	agc	aag	gag	ctg	gtg	gag	aaa	tca	gag	3168
Arg	Gln	Glu	Leu	Ser	Lys	Val	Ser	Lys	Glu	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Glu	
960					965					970					975	
gct	gcg	cgg	cag	gag	gaa	cag	cag	cga	aag	gcc	ctg	gag	acc	aaa	aca	3216
Ala	Ala	Arg	Gln	Glu	Glu	Gln	Gln	Arg	Lys	Ala	Leu	Glu	Thr	Lys	Thr	
				980					985					990		
gcc	gcc	ttg	gag	aag	cag	gtc	cta	cag	ctg	caa	gca	tct	cac	aag	gag	3264
Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Gln	Val	Leu	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	His	Lys	Glu	
			995					1000					1005			
agt	gag	gag	gcc	ctg	cag	aag	cgc	ctg	gac	gag	gtc	agc	cgg	gag	cta	3312
Ser	Glu	Glu	Ala	Leu	Gln	Lys	Arg	Leu	Asp	Glu	Val	Ser	Arg	Glu	Leu	
	1010						1015					1020				
tgc	cgc	tcc	cag	acc	agc	cat	gcc	agc	ctg	cgg	gcg	gat	gcc	gag	aag	3360
Cys	Arg	Ser	Gln	Thr	Ser	His	Ala	Ser	Leu	Arg	Ala	Asp	Ala	Glu	Lys	
	1025					1030					1035					
gcc	cag	gag	cag	cag	cag	cag	atg	gct	gag	ctg	cac	agc	aaa	ctt	cag	3408
Ala	Gln	Glu	Gln	Gln	Gln	Gln	Met	Ala	Glu	Leu	His	Ser	Lys	Leu	Gln	
1040					1045					1050					1055	

tcc tcc gag gcg gag gtg aaa agc aag tct gag gag ctg agt ggt ctc	3456
Ser Ser Glu Ala Glu Val Lys Ser Lys Ser Glu Glu Leu Ser Gly Leu	
1060 1065 1070	
cat ggg cag ctc aag gag gcc agg gcc gag aac tca cag ctc atg gag	3504
His Gly Gln Leu Lys Glu Ala Arg Ala Glu Asn Ser Gln Leu Met Glu	
1075 1080 1085	
aga atc cgg tcc atc gag gcc ctg ctg gag gcg ggc cag gcc cgg gac	3552
Arg Ile Arg Ser Ile Glu Ala Leu Leu Glu Ala Gly Gln Ala Arg Asp	
1090 1095 1100	
acc cag gat gcc cag gcc agc cga gcg gag cat cag gcc cgc ctc aag	3600
Thr Gln Asp Ala Gln Ala Ser Arg Ala Glu His Gln Ala Arg Leu Lys	
1105 1110 1115	
gag cta gag tcc cag gtg tgg tgc ctg gag aag gag gcc acc gag ctc	3648
Glu Leu Glu Ser Gln Val Trp Cys Leu Glu Lys Glu Ala Thr Glu Leu	
1120 1125 1130 1135	
aag gag gct gtt gag cag cag aaa gtg aag aac aac gac ctc cga gag	3696
Lys Glu Ala Val Glu Gln Gln Lys Val Lys Asn Asn Asp Leu Arg Glu	
1140 1145 1150	
aag aac tgg aag gcc atg gag gct ctg gcc tcg gcc gag aga gcc tgc	3744
Lys Asn Trp Lys Ala Met Glu Ala Leu Ala Ser Ala Glu Arg Ala Cys	
1155 1160 1165	
gag gag aag ctc cgc tcc tta acc cag gcc aag gag gaa tcc gag aag	3792
Glu Glu Lys Leu Arg Ser Leu Thr Gln Ala Lys Glu Glu Ser Glu Lys	
1170 1175 1180	
cag ctc agc ctg acg gag gcc cag acc aag gag gcc ctg ctg gcc ctg	3840
Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Gln Thr Lys Glu Ala Leu Leu Ala Leu	
1185 1190 1195	
ttg ccg gct ctc tcc agc tca gcc ccc cag agt tac acc gag tgg ctg	3888
Leu Pro Ala Leu Ser Ser Ser Ala Pro Gln Ser Tyr Thr Glu Trp Leu	
1200 1205 1210 1215	
cag gaa ctc cga gag aag ggc ccg gag ctg ctg aag cag cgg ccg gct	3936

Gln Glu Leu Arg Glu Lys Gly Pro Glu Leu Leu Lys Gln Arg Pro Ala	
1220	1225
1230	
gac aca gat ccg tcc tcg gac ctg gct tcc aag ctg agg gag gct gag 3984	
Asp Thr Asp Pro Ser Ser Asp Leu Ala Ser Lys Leu Arg Glu Ala Glu	
1235	1240
1245	
gag acc cag aac aat ctg cag gcc gag tgt gac cag tac cgc acc atc 4032	
Glu Thr Gln Asn Asn Leu Gln Ala Glu Cys Asp Gln Tyr Arg Thr Ile	
1250	1255
1260	
ctg gca gag acg gag ggc atg ctc aaa gac ctg cag aag agt gtg gag 4080	
Leu Ala Glu Thr Glu Gly Met Leu Lys Asp Leu Gln Lys Ser Val Glu	
1265	1270
1275	
gag gag gag cag gtg tgg aag gcc aaa gtg agc gcc acg gag gag gag 4128	
Glu Glu Glu Gln Val Trp Lys Ala Lys Val Ser Ala Thr Glu Glu Glu	
1280	1285
1290	1295
ctt cag aag tca cgg gtc aca gtg aaa cat ctc gaa gac att gta gag 4176	
Leu Gln Lys Ser Arg Val Thr Val Lys His Leu Glu Asp Ile Val Glu	
1300	1305
1310	
aag cta aaa gga gaa ctt gaa agt tca gag cag gtg agg gag cac acc 4224	
Lys Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ser Ser Glu Gln Val Arg Glu His Thr	
1315	1320
1325	
tca cat ctg gaa gca gag ctg gag aag cac atg gca gct gcc agc gct 4272	
Ser His Leu Glu Ala Glu Leu Glu Lys His Met Ala Ala Ala Ser Ala	
1330	1335
1340	
gag tgc cag agc tac gcc aag gag gtg gcg ggg ttg agg caa ctt tta 4320	
Glu Cys Gln Ser Tyr Ala Lys Glu Val Ala Gly Leu Arg Gln Leu Leu	
1345	1350
1355	
tta gag tct cag tct cag ctg gat gca gcc aag agt gaa gcc cag aaa 4368	
Leu Glu Ser Gln Ser Gln Leu Asp Ala Ala Lys Ser Glu Ala Gln Lys	
1360	1365
1370	1375
caa agc aat gag ctc gcc ctg gtc agg cag cag ttg agt gag atg aag 4416	
Gln Ser Asn Glu Leu Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Ser Glu Met Lys	
1380	1385
1390	

agc cac gta gag gat ggt gac gta gct ggg tcc cca gct gcc ccc cca 4464
 Ser His Val Glu Asp Gly Asp Val Ala Gly Ser Pro Ala Ala Pro Pro
 1395 1400 1405

gca gag cag gac cct gtc gag ctg aag gcg cag ctg gag cgg aca gag 4512
 Ala Glu Gln Asp Pro Val Glu Leu Lys Ala Gln Leu Glu Arg Thr Glu
 1410 1415 1420

gcc acc ctg gag gac gag cag gcg ctg cgg agg aag ctc acg gcc gag 4560
 Ala Thr Leu Glu Asp Glu Gln Ala Leu Arg Arg Lys Leu Thr Ala Glu
 1425 1430 1435

ttc cag gag gct cag agc tct gcg tgc cgg ctc cag gcc gag ctg gag 4608
 Phe Gln Glu Ala Gln Ser Ser Ala Cys Arg Leu Gln Ala Glu Leu Glu
 1440 1445 1450 1455

aag ctc cgc agc aca ggg ccc ctg gag tct tca gca gca gag gag gcc 4656
 Lys Leu Arg Ser Thr Gly Pro Leu Glu Ser Ser Ala Ala Glu Glu Ala
 1460 1465 1470

aca cag ctg aag gag aga cta gaa aaa gag aag aaa cta acc agt gac 4704
 Thr Gln Leu Lys Glu Arg Leu Glu Lys Glu Lys Lys Leu Thr Ser Asp
 1475 1480 1485

ctg gga cat gct gcc acc aaa ttg cag gag ctt ttg aag acc acc cag 4752
 Leu Gly His Ala Ala Thr Lys Leu Gln Glu Leu Leu Lys Thr Thr Gln
 1490 1495 1500

gag cag ctg gca aag gag aga gac aca gtg aag aag ttg cag gag cag 4800
 Glu Gln Leu Ala Lys Glu Arg Asp Thr Val Lys Lys Leu Gln Glu Gln
 1505 1510 1515

ttg gac aaa aca gac gac agc agc tca aag gag ggc act tct gtc tga 4848
 Leu Asp Lys Thr Asp Asp Ser Ser Ser Lys Glu Gly Thr Ser Val
 1520 1525 1530 1535

gtctgtcttt cgggaaaaga agttccatt caactacca aaatgcctta cacattcctt 4908

acaaataaat aaaccaacca acacaccgtt atccaggccc aacctccagt agctctgaga 4968

gaagccatga gagactctta gaatcacaga aatagacctt ccagaccctt tgtttgtaaa 5028

agaacctttg tcacattga taaacactat tccccaggac cagccctgga ccaccaccga 5088
gcagacgcca aagcccttac cagctctgtg acagacccca gggatatgtgc tggggaggcc 5148
gggacgctgg gtatctgtat gtcaatcagt gcaattgttt tcttcccctg ggttgggggt 5208
caggaggcga gcggcctggt ggtgagtctc cagggtgtg gagcagactg gaggggcccc 5268
gccagccggg gaggcagcag cctctcacc ccgggggaag ttgccagcaa gaactgatgt 5328
gtgacttcct ggatgttaat gccattaaaa ccaacattgt tgcccgcaa aaaaaaaaaa 5388
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 5425

<210> 48
<211> 1534
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

<400> 48
Met Asp Ile Tyr Asp Thr Gln Thr Leu Gly Val Met Val Phe Gly Gly
1 5 10 15
Phe Met Val Val Ser Ala Ile Gly Ile Phe Leu Val Ser Thr Phe Ser
20 25 30
Met Lys Glu Thr Ser Tyr Glu Glu Ala Leu Ala Asn Gln Arg Lys Glu
35 40 45
Met Ala Lys Thr His His Gln Lys Val Glu Lys Lys Lys Lys Glu Lys
50 55 60
Thr Val Glu Lys Lys Gly Lys Thr Lys Lys Lys Glu Glu Lys Pro Asn
65 70 75 80
Gly Lys Ile Pro Asp His Glu Pro Ala Pro Asn Val Thr Ile Leu Leu
85 90 95
Lys Asp Pro Val Arg Ala Pro Ala Val Pro Val Ala Pro Thr Pro Val
100 105 110
Gln Pro Pro Val Val Ile Ala Pro Val Ala Thr Val Pro Ala Met Pro
115 120 125
Gln Glu Lys Leu Ala Pro Ser Pro Lys Asp Lys Lys Lys Lys Glu Lys
130 135 140
Lys Val Ala Lys Val Glu Pro Ala Val Ser Ser Val Val Asn Ser Val
145 150 155 160

Gln Val Leu Ala Ser Lys Ala Ala Ile Leu Glu Thr Ala Pro Lys Glu			
	165	170	175
Val Pro Met Val Val Val Pro Pro Val Gly Ala Lys Ala Gly Thr Pro			
	180	185	190
Ala Thr Ser Thr Ala Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln			
	195	200	205
Ser Arg Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly			
	210	215	220
Ala Leu Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys			
225	230	235	240
Lys Val Glu Val Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Gly Gln			
	245	250	255
Asn Gln Gly Lys Lys Val Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala			
	260	265	270
Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln			
	275	280	285
Gly Lys Lys Thr Asp Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ser Glu Gly			
	290	295	300
Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys			
305	310	315	320
Lys Val Glu Val Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Gly Gln			
	325	330	335
Asn Gln Gly Lys Lys Val Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala			
	340	345	350
Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln			
	355	360	365
Gly Lys Lys Thr Asp Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ser Glu Gly			
	370	375	380
Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Val Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys			
385	390	395	400
Lys Val Glu Gly Val Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln			
	405	410	415
Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Ser Ser Gln Gly Arg Lys Glu			
	420	425	430
Glu Gly Thr Pro Asn Leu Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ser Pro Asn Gln			
	435	440	445
Gly Lys Lys Val Glu Val Val Gln Asn Gln Ser Lys Lys Val Glu Gly			
	450	455	460
Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ser Gln Asn Gln Gly Lys			
465	470	475	480
Lys Thr Glu Gly Ala Ser Asn Gln Gly Lys Lys Val Asp Gly Ala Gln			
	485	490	495

Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Val		
500	505	510
Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln		
515	520	525
Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly		
530	535	540
Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys		
545	550	555
Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro		
565	570	575
Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Ala Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala		
580	585	590
Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln		
595	600	605
Gly Lys Lys Ala Glu Ala Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly		
610	615	620
Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys		
625	630	635
Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Gln		
645	650	655
Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala		
660	665	670
Asp Leu Val Ala Asn Gln Gly Thr Lys Ala Glu Gly Val Ala Gly Gln		
675	680	685
Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Gly Glu Gly		
690	695	700
Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ser Glu Gly Ser Pro Asn Gln Gly Lys		
705	710	715
Lys Val Asp Ala Ser Ala Asn Gln Ser Lys Arg Ala Glu Ser Ala Pro		
725	730	735
Ile Gln Gly Lys Asn Ala Asp Met Val Gln Ser Gln Glu Ala Pro Lys		
740	745	750
Gln Glu Ala Pro Ala Lys Lys Lys Ser Gly Ser Lys Lys Lys Gly Glu		
755	760	765
Pro Gly Pro Pro Asp Ser Asp Ser Pro Leu Tyr Leu Pro Tyr Lys Thr		
770	775	780
Leu Val Ser Thr Val Gly Ser Met Val Phe Asn Glu Gly Glu Ala Gln		
785	790	795
Arg Leu Ile Glu Ile Leu Ser Glu Lys Ala Gly Val Ile Gln Asp Thr		
805	810	815
Trp His Lys Ala Thr Gln Lys Gly Asp Pro Val Ala Ile Leu Lys Arg		
820	825	830

Gln Leu Glu Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Thr Glu Gln Glu Asp Ala		
835	840	845
Ala Val Ala Lys Ser Lys Leu Arg Glu Val Asn Lys Glu Leu Ala Ala		
850	855	860
Glu Lys Ala Lys Ala Ala Ala Gly Glu Ala Lys Val Lys Lys Gln Leu		
865	870	875
Val Ala Arg Glu Gln Glu Ile Thr Ala Val Gln Ala Arg Ile Glu Ala		
	885	890
Ser Tyr Arg Glu His Val Lys Glu Val Gln Gln Leu Gln Gly Lys Ile		
900	905	910
Arg Thr Leu Gln Glu Gln Leu Glu Asn Gly Pro Asn Thr Gln Leu Ala		
915	920	925
Arg Leu Gln Gln Glu Asn Ser Ile Leu Arg Asp Ala Leu Asn Gln Ala		
930	935	940
Thr Ser Gln Val Glu Ser Lys Gln Asn Thr Glu Leu Ala Lys Leu Arg		
945	950	955
Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Lys Glu Leu Val Glu Lys Ser Glu Ala		
	965	970
Ala Arg Gln Glu Glu Gln Gln Arg Lys Ala Leu Glu Thr Lys Thr Ala		
	980	985
Ala Leu Glu Lys Gln Val Leu Gln Leu Gln Ala Ser His Lys Glu Ser		
995	1000	1005
Glu Glu Ala Leu Gln Lys Arg Leu Asp Glu Val Ser Arg Glu Leu Cys		
1010	1015	1020
Arg Ser Gln Thr Ser His Ala Ser Leu Arg Ala Asp Ala Glu Lys Ala		
1025	1030	1035
Gln Glu Gln Gln Gln Gln Met Ala Glu Leu His Ser Lys Leu Gln Ser		
	1045	1050
Ser Glu Ala Glu Val Lys Ser Lys Ser Glu Glu Leu Ser Gly Leu His		
1060	1065	1070
Gly Gln Leu Lys Glu Ala Arg Ala Glu Asn Ser Gln Leu Met Glu Arg		
1075	1080	1085
Ile Arg Ser Ile Glu Ala Leu Leu Glu Ala Gly Gln Ala Arg Asp Thr		
1090	1095	1100
Gln Asp Ala Gln Ala Ser Arg Ala Glu His Gln Ala Arg Leu Lys Glu		
1105	1110	1115
Leu Glu Ser Gln Val Trp Cys Leu Glu Lys Glu Ala Thr Glu Leu Lys		
	1125	1130
Glu Ala Val Glu Gln Gln Lys Val Lys Asn Asn Asp Leu Arg Glu Lys		
	1140	1145
Asn Trp Lys Ala Met Glu Ala Leu Ala Ser Ala Glu Arg Ala Cys Glu		
1155	1160	1165

Glu Lys Leu Arg Ser Leu Thr Gln Ala Lys Glu Glu Ser Glu Lys Gln
 1170 1175 1180
 Leu Ser Leu Thr Glu Ala Gln Thr Lys Glu Ala Leu Leu Ala Leu Leu
 1185 1190 1195 1200
 Pro Ala Leu Ser Ser Ser Ala Pro Gln Ser Tyr Thr Glu Trp Leu Gln
 1205 1210 1215
 Glu Leu Arg Glu Lys Gly Pro Glu Leu Leu Lys Gln Arg Pro Ala Asp
 1220 1225 1230
 Thr Asp Pro Ser Ser Asp Leu Ala Ser Lys Leu Arg Glu Ala Glu Glu
 1235 1240 1245
 Thr Gln Asn Asn Leu Gln Ala Glu Cys Asp Gln Tyr Arg Thr Ile Leu
 1250 1255 1260
 Ala Glu Thr Glu Gly Met Leu Lys Asp Leu Gln Lys Ser Val Glu Glu
 1265 1270 1275 1280
 Glu Glu Gln Val Trp Lys Ala Lys Val Ser Ala Thr Glu Glu Glu Leu
 1285 1290 1295
 Gln Lys Ser Arg Val Thr Val Lys His Leu Glu Asp Ile Val Glu Lys
 1300 1305 1310
 Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ser Ser Glu Gln Val Arg Glu His Thr Ser
 1315 1320 1325
 His Leu Glu Ala Glu Leu Glu Lys His Met Ala Ala Ala Ser Ala Glu
 1330 1335 1340
 Cys Gln Ser Tyr Ala Lys Glu Val Ala Gly Leu Arg Gln Leu Leu Leu
 1345 1350 1355 1360
 Glu Ser Gln Ser Gln Leu Asp Ala Ala Lys Ser Glu Ala Gln Lys Gln
 1365 1370 1375
 Ser Asn Glu Leu Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Ser Glu Met Lys Ser
 1380 1385 1390
 His Val Glu Asp Gly Asp Val Ala Gly Ser Pro Ala Ala Pro Pro Ala
 1395 1400 1405
 Glu Gln Asp Pro Val Glu Leu Lys Ala Gln Leu Glu Arg Thr Glu Ala
 1410 1415 1420
 Thr Leu Glu Asp Glu Gln Ala Leu Arg Arg Lys Leu Thr Ala Glu Phe
 1425 1430 1435 1440
 Gln Glu Ala Gln Ser Ser Ala Cys Arg Leu Gln Ala Glu Leu Glu Lys
 1445 1450 1455
 Leu Arg Ser Thr Gly Pro Leu Glu Ser Ser Ala Ala Glu Glu Ala Thr
 1460 1465 1470
 Gln Leu Lys Glu Arg Leu Glu Lys Glu Lys Lys Leu Thr Ser Asp Leu
 1475 1480 1485
 Gly His Ala Ala Thr Lys Leu Gln Glu Leu Leu Lys Thr Thr Gln Glu
 1490 1495 1500

Gln Leu Ala Lys Glu Arg Asp Thr Val Lys Lys Leu Gln Glu Gln Leu
 1505 1510 1515 1520
 Asp Lys Thr Asp Asp Ser Ser Ser Lys Glu Gly Thr Ser Val
 1525 1530

5 <210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 49
 ctcaagggcc tggagactac g 21

15 <210> 50
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 50
 cgggattccc gagtcgctca cc 22

25 <210> 51
 <211> 1416
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> nucleótido sintético

<400> 51
 tctagaatgt tgttgcaagc cttcttggtc ttgttggtg gtttcgctgc taagatttcc 60

gctcaattgc agttgcaaga gtccggtcca ggattgggta agccatccga gaccttgtcc 120

ttgacctgta ccgtttccgg tggttccatc atctccaagt cctcctactg gggatggatc	180
agacaaccac caggaaaggg tttggagtgg atcggttcca tctactactc cggttccacc	240
ttctacaacc catccttgaa gtccagagtt accatctccg ttgacacctc caagaaccaa	300
ttctccttga agttgtcctc cgttaccgct gctgacaccg ctgtttacta ctgtgctaga	360
ttgaccgttg ctgagttcga ctactgggggt caaggaacct tggttaccgt ttcctccgct	420
tccaccaagg gtccatccgt tttcccattg gctccatcct ccaagtccac ctccggtgga	480
acogctgctt tgggttggtt ggtcaaggac tacttcccag agccagtcac cgtttcctgg	540
aactccggtg ctttgacctc cgggtgtcac accttcccag ctgttttgca atcctccggt	600
ttgtactcct tgtcctccgt cgttaccggt ccacctcctt ccttgggtac tcaaacctac	660
atctgcaacg tcaaccacaa gccatccaac accaagggtg acaagaaggt tgagccaaag	720
tcctgtgaca agaccacac ctgtccacca tgtccagctc cagagttggt ggggtgtcct	780
tctgttttct tgttcccacc aaagccaaag gacaccttga tgatctccag aaccccagag	840
gttacctgtg ttgtcgttga cgtttcccac gaggaccag aggttaagtt caactggtac	900
gttgacggtg ttgaggttca caacgctaag accaagccaa gagaggagca atacaactcc	960
acctacagag ttgtttccgt cttgaccggt ttgcaccaag actggttgaa cggaaaggag	1020
tacaagtgca aggtttccaa caaggctttg ccagctccaa tcgaaaagac catctccaag	1080
gctaagggtc aaccaagaga gccacaagtt tacaccttgc caccatccag agatgagttg	1140
accaagaacc aagtttcctt gacctgcttg gtcaagggtt tctaccatc cgacatcgct	1200
gttgagtggg agtccaacgg tcaaccagag aacaactaca agaccacccc accagttttg	1260
gactccgacg gttccttctt cttgtactcc aagttgaccg ttgacaagtc cagatggcaa	1320
caaggtaacg ttttctcctg ctccgttatg cagaggtt tgacacaacca ctacacccaa	1380
aagtccttgt ccttgtcccc aggtaaagtaa ggatcc	1416

<210> 52
 <211> 1416
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> nucleótido sintético

 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (7).. (1410)

 <400> 52
 tctaga atg ttg ttg caa gcc ttc ttg ttc ttg ttg gct ggt ttc gct 48
 Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10

 gct aag att tcc gct caa ttg cag ttg caa gag tcc ggt cca gga ttg 96
 Ala Lys Ile Ser Ala Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 15 20 25 30

 gtt aag cca tcc gag acc ttg tcc ttg acc tgt acc gtt tcc ggt ggt 144
 Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly
 35 40 45

 tcc atc atc tcc aag tcc tcc tac tgg gga tgg atc aga caa cca cca 192
 Ser Ile Ile Ser Lys Ser Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro
 50 55 60

 gga aag ggt ttg gag tgg atc ggt tcc atc tac tac tcc ggt tcc acc 240
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 65 70 75

 ttc tac aac cca tcc ttg aag tcc aga gtt acc atc tcc gtt gac acc 288
 Phe Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr
 80 85 90
 15

tcc aag aac caa ttc tcc ttg aag ttg tcc tcc gtt acc gct gct gac	336
Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp	
95 100 105 110	
acc gct gtt tac tac tgt gct aga ttg acc gtt gct gag ttc gac tac	384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Val Ala Glu Phe Asp Tyr	
115 120 125	
tgg ggt caa gga acc ttg gtt acc gtt tcc tcc gct tcc acc aag ggt	432
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly	
130 135 140	
cca tcc gtt ttc cca ttg gct cca tcc tcc aag tcc acc tcc ggt gga	480
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly	
145 150 155	
acc gct gct ttg ggt tgt ttg gtc aag gac tac ttc cca gag cca gtc	528
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val	
160 165 170	
acc gtt tcc tgg aac tcc ggt gct ttg acc tcc ggt gtt cac acc ttc	576
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe	
175 180 185 190	
cca gct gtt ttg caa tcc tcc ggt ttg tac tcc ttg tcc tcc gtc gtt	624
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val	
195 200 205	
acc gtt cca tcc tcc tcc ttg ggt act caa acc tac atc tgc aac gtc	672
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val	
210 215 220	
aac cac aag cca tcc aac acc aag gtt gac aag aag gtt gag cca aag	720
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys	
225 230 235	
tcc tgt gac aag acc cac acc tgt cca cca tgt cca gct cca gag ttg	768
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	
240 245 250	
ttg ggt ggt cct tct gtt ttc ttg ttc cca cca aag cca aag gac acc	816
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	

255	260	265	270	
ttg atg atc tcc aga acc cca gag gtt acc tgt gtt gtc gtt gac gtt				864
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val				
	275	280	285	
tcc cac gag gac cca gag gtt aag ttc aac tgg tac gtt gac ggt gtt				912
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val				
	290	295	300	
gag gtt cac aac gct aag acc aag cca aga gag gag caa tac aac tcc				960
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser				
	305	310	315	
acc tac aga gtt gtt tcc gtc ttg acc gtt ttg cac caa gac tgg ttg				1008
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu				
	320	325	330	
aac gga aag gag tac aag tgc aag gtt tcc aac aag gct ttg cca gct				1056
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala				
335	340	345	350	
cca atc gaa aag acc atc tcc aag gct aag ggt caa cca aga gag cca				1104
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro				
	355	360	365	
caa gtt tac acc ttg cca cca tcc aga gat gag ttg acc aag aac caa				1152
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln				
	370	375	380	
gtt tcc ttg acc tgc ttg gtc aag ggt ttc tac cca tcc gac atc gct				1200
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala				
	385	390	395	
gtt gag tgg gag tcc aac ggt caa cca gag aac aac tac aag acc acc				1248
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr				
400	405	410		
cca cca gtt ttg gac tcc gac ggt tcc ttc ttc ttg tac tcc aag ttg				1296
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu				
415	420	425	430	

	acc gtt gac aag tcc aga tgg caa caa ggt aac gtt ttc tcc tgc tcc	1344
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	
	435 440 445	
	gtt atg cac gag gct ttg cac aac cac tac acc caa aag tcc ttg tcc	1392
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	
	450 455 460	
	ttg tcc cca ggt aag taa ggatcc	1416
	Leu Ser Pro Gly Lys	
	465	
	<210> 53	
	<211> 714	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> nucleótido sintético	
10	<400> 53	
	tctagaatgt tggtgcaagc cttcttggtc ttgttggtg gtttcgctgc taagatttcc	60
	gctgagatcg ttttgaccca atccccagct accttgctct tgtccccagg tgagagagcc	120
	accttgctct gtagagcttc ccaatccgtt tcctccttct tggcttggtta ccaacaaaag	180
	ccaggtcaag cccaagatt gttgatctac gacgcttcca acagagctac cggtatccca	240
	gctagattct cgggttcgg ttccggaacc gacttcacct tgaccatctc ctccttgag	300
	ccagaggact tcgctgttta ctactgcca caaagatcca actggccatt gaccttcggt	360
	ccaggtacta aggttgacat caagagaacc gtgtgtgctc catccgtttt catcttccca	420
	ccatccgacg agcaattgaa gtccgtact gttccgttg ttgcttggt gaacaacttc	480
	taccaagag aggctaaggt tcaatggaag gttgacaacg ctttgcaatc cggtaactcc	540
	caagagtccg ttaccgagca agactccaag gactccacct actccttgct ctccaccttg	600
	accttgctca aggetgacta cgagaagcac aaggtttacg cttgtgaggt taccaccaa	660
	ggtttgctct cccagttac caagtccttc aacagaggtg agtgctaagg atcc	714
15	<210> 54	
	<211> 714	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

<220>
<223> nucleótido sintético

5 <220>
<221> CDS
<222> (7)..(708)

<400> 54

tctaga atg ttg ttg caa gcc ttc ttg ttc ttg ttg gct ggt ttc gct	48
Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala	
1 5 10	

gct aag att tcc gct gag atc gtt ttg acc caa tcc cca gct acc ttg	96
Ala Lys Ile Ser Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu	
15 20 25 30	

tcc ttg tcc cca ggt gag aga gcc acc ttg tcc tgt aga gct tcc caa	144
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln	
35 40 45	

tcc gtt tcc tcc ttc ttg gct tgg tac caa caa aag cca ggt caa gcc	192
Ser Val Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala	
50 55 60	

cca aga ttg ttg atc tac gac gct tcc aac aga gct acc ggt atc cca	240
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro	
65 70 75	

gct aga ttc tcc ggt tcc ggt tcc gga acc gac ttc acc ttg acc atc	288
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	
80 85 90	

10

tcc tcc ttg gag cca gag gac ttc gct gtt tac tac tgc caa caa aga 336
 Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
 95 100 105 110

tcc aac tgg cca ttg acc ttc ggt cca ggt act aag gtt gac atc aag 384
 Ser Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 115 120 125

aga acc gtt gct gct cca tcc gtt ttc atc ttc cca cca tcc gac gag 432
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140

caa ttg aag tcc ggt act gct tcc gtt gtt tgc ttg ttg aac aac ttc 480
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155

tac cca aga gag gct aag gtt caa tgg aag gtt gac aac gct ttg caa 528
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 160 165 170

tcc ggt aac tcc caa gag tcc gtt acc gag caa gac tcc aag gac tcc 576
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 175 180 185 190

acc tac tcc ttg tcc tcc acc ttg acc ttg tcc aag gct gac tac gag 624
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205

aag cac aag gtt tac gct tgt gag gtt acc cac caa ggt ttg tcc tcc 672
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220

cca gtt acc aag tcc ttc aac aga ggt gag tgc taa ggatcc 714
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 55
 <211> 1437
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> nucleótido sintético

<400> 55

tctagaatgt tgggtaagaa cgaccaatg tgcttggctt tggctttgtt gggtttgacc	60
gctttgttgg gtatctgtca aggacaattg cagttgcaag agtccggtcc aggattggtt	120
aagccatccg agacctgtc cttgacctgt accgtttccg gtggttccat catctccaag	180
tcctcctact ggggatggat cagacaacca ccaggaaagg gtttgagtg gatcggttcc	240
atctactact ccggttccac cttctacaac ccacccctga agtccagagt taccatctcc	300
gttgacacct ccaagaacca attctccttg aagttgtcct ccgttaccgc tgctgacacc	360
gctgtttact actgtgctag attgaccgtt gctgagttcg actactgggg tcaaggaacc	420
ttggttaccg tttcctccgc ttccaccaag ggtccatccg ttttccatt ggctccatcc	480
tccaagtcca cctccggtgg aaccgctgct ttgggttgtt tggtaagga ctacttcca	540
gagccagtca ccgtttcctg gaactccggt gctttgacct ccggtgttca caccttcca	600
gctgttttgc aatcctccgg tttgtactcc ttgtcctccg tcgttaccgt tccatcctcc	660
tccttgggta ctcaaacta catctgcaac gtcaaccaca agccatcaa caccaaggtt	720
gacaagaagg ttgagccaaa gtcctgtgac aagaccaca cctgtccacc atgtccagct	780
ccagagtigt tgggtggtcc ttctgttttc ttgttccac caaagccaaa ggacaccttg	840
atgatctcca gaacccaga ggttacctgt gttgtcgttg acgtttcca cgaggacca	900
gaggttaagt tcaactggta cgttgacggt gttgaggttc acaacgctaa gaccaagcca	960
agagaggagc aatacaactc cacctacaga gttgtttccg tcttgaccgt tttgcacaa	1020
gactggttga acggaaagga gtacaagtgc aaggtttcca acaaggcttt gccagctcca	1080
atcgaaaaga ccatctcaa ggctaagggt caaccaagag agccacaagt ttacaccttg	1140

ccaccatcca gagatgagtt gaccaagaac caagtttcct tgacctgctt ggtcaagggt 1200

ttctacccat cgcacatcgc tgttgagtgg gagtccaacg gtcaaccaga gaacaactac 1260

aagaccaccc caccagtttt ggactccgac ggttccttct tcttgacttc caagttgacc 1320

gttgacaagt ccagatggca acaaggtaac gttttctcct gctccgttat gcacgaggct 1380

ttgcacaacc actacaccca aaagtccttg tccttgtccc caggtaagta aggatcc 1437

<210> 56

<211> 1437

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> nucleótido sintético

<220>

<221> CDS

<222> (7).. (1431)

<400> 56

tctaga atg ttg ggt aag aac gac cca atg tgc ttg gtc ttg gtc ttg 48

Met Leu Gly Lys Asn Asp Pro Met Cys Leu Val Leu Val Leu

1

5

10

ttg ggt ttg acc gct ttg ttg ggt atc tgt caa gga caa ttg cag ttg 96

Leu Gly Leu Thr Ala Leu Leu Gly Ile Cys Gln Gly Gln Leu Gln Leu

15

20

25

30

caa gag tcc ggt cca gga ttg gtt aag cca tcc gag acc ttg tcc ttg 144

Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu

35

40

45

acc tgt acc gtt tcc ggt ggt tcc atc atc tcc aag tcc tcc tac tgg 192

Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ile Ser Lys Ser Ser Tyr Trp

50

55

60

gga tgg atc aga caa cca cca gga aag ggt ttg gag tgg atc ggt tcc Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser 65 70 75	240
atc tac tac tcc ggt tcc acc ttc tac aac cca tcc ttg aag tcc aga Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Phe Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg 80 85 90	288
gtt acc atc tcc gtt gac acc tcc aag aac caa ttc tcc ttg aag ttg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu 95 100 105 110	336
tcc tcc gtt acc gct gct gac acc gct gtt tac tac tgt gct aga ttg Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu 115 120 125	384
acc gtt gct gag ttc gac tac tgg ggt caa gga acc ttg gtt acc gtt Thr Val Ala Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val 130 135 140	432
tcc tcc gct tcc acc aag ggt cca tcc gtt ttc cca ttg gct cca tcc Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser 145 150 155	480
tcc aag tcc acc tcc ggt gga acc gct gct ttg ggt tgt ttg gtc aag Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys 160 165 170	528
gac tac ttc cca gag cca gtc acc gtt tcc tgg aac tcc ggt gct ttg Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu 175 180 185 190	576
acc tcc ggt gtt cac acc ttc cca gct gtt ttg caa tcc tcc ggt ttg Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu 195 200 205	624
tac tcc ttg tcc tcc gtc gtt acc gtt cca tcc tcc tcc ttg ggt act Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr 210 215 220	672
caa acc tac atc tgc aac gtc aac cac aag cca tcc aac acc aag gtt Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val	720

225	230	235	
gac aag aag gtt gag cca aag tcc tgt gac aag acc cac acc tgt cca			768
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro			
240	245	250	
cca tgt cca gct cca gag ttg ttg ggt ggt cct tct gtt ttc ttg ttc			816
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
255	260	265	270
cca cca aag cca aag gac acc ttg atg atc tcc aga acc cca gag gtt			864
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
275	280	285	
acc tgt gtt gtc gtt gac gtt tcc cac gag gac cca gag gtt aag ttc			912
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe			
290	295	300	
aac tgg tac gtt gac ggt gtt gag gtt cac aac gct aag acc aag cca			960
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
305	310	315	
aga gag gag caa tac aac tcc acc tac aga gtt gtt tcc gtc ttg acc			1008
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
320	325	330	
gtt ttg cac caa gac tgg ttg aac gga aag gag tac aag tgc aag gtt			1056
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
335	340	345	350
tcc aac aag gct ttg cca gct cca atc gaa aag acc atc tcc aag gct			1104
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala			
355	360	365	
aag ggt caa cca aga gag cca caa gtt tac acc ttg cca cca tcc aga			1152
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg			
370	375	380	
gat gag ttg acc aag aac caa gtt tcc ttg acc tgc ttg gtc aag ggt			1200
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly			
385	390	395	

ttc tac cca tcc gac atc gct gtt gag tgg gag tcc aac ggt caa cca 1248
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
400 405 410

gag aac aac tac aag acc acc cca cca gtt ttg gac tcc gac ggt tcc 1296
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
415 420 425 430

ttc ttc ttg tac tcc aag ttg acc gtt gac aag tcc aga tgg caa caa 1344
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
435 440 445

ggt aac gtt ttc tcc tgc tcc gtt atg cac gag gct ttg cac aac cac 1392
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
450 455 460

tac acc caa aag tcc ttg tcc ttg tcc cca ggt aag taa ggatcc 1437
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 57
<211> 735
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> nucleótido sintético

10 <400> 57
tctagaatgt tgggtaagaa cgacccaatg tgcttggtct tggctcttggt gggtttgacc 60

gctttgttgg gtatctgtca aggagagatc gttttgaccc aatccccagc taccttgtcc 120

ttgtccccag gtgagagagc caccttgtcc tgtagagctt cccaatccgt ttctccttc 180

ttggcttggt accaacaaaa gccagggtcaa gcccgaagat tggtgatcta cgacgcttcc 240

aacagagcta ccggtatccc agctagattc tccggttccg gttccggaac cgacttcacc 300

ttgaccatct cctccttgga gccagaggac ttgctgttt actactgcca acaaagatcc 360

aactggccat tgaccttcgg tccaggtact aagggtgaca tcaagagaac cgttgctgct 420
ccatccgttt tcattctccc accatccgac gagcaattga agtccggtac tgcttccgtt 480
gtttgcttgt tgaacaactt ctaccaaga gaggctaagg ttcaatggaa ggttgacaac 540
gctttgcaat ccggttaactc ccaagagtcc gttaccgagc aagactccaa ggactccacc 600
tactccttgt cctccacett gaccttgtcc aaggctgact acgagaagca caaggtttac 660
gcttgtgagg ttaccacca aggtttgtcc tccccagtta ccaagtcctt caacagaggt 720
gagtgctaag gatcc 735

<210> 58
<211> 735
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> nucleótido sintético

<220>
<221> CDS
<222> (7)..(729)

15 <400> 58
tctaga atg ttg ggt aag aac gac cca atg tgc ttg gtc ttg gtc ttg 48
Met Leu Gly Lys Asn Asp Pro Met Cys Leu Val Leu Val Leu
1 5 10
ttg ggt ttg acc gct ttg ttg ggt atc tgt caa gga gag atc gtt ttg 96
Leu Gly Leu Thr Ala Leu Leu Gly Ile Cys Gln Gly Glu Ile Val Leu
15 20 25 30
acc caa tcc cca gct acc ttg tcc ttg tcc cca ggt gag aga gcc acc 144
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
35 40 45
ttg tcc tgt aga gct tcc caa tcc gtt tcc tcc ttc ttg gct tgg tac 192

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr	
50 55 60	
caa caa aag cca ggt caa gcc cca aga ttg ttg atc tac gac gct tcc	240
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser	
65 70 75	
aac aga gct acc ggt atc cca gct aga ttc tcc ggt tcc ggt tcc gga	288
Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly	
80 85 90	
acc gac ttc acc ttg acc atc tcc tcc ttg gag cca gag gac ttc gct	336
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala	
95 100 105 110	
gtt tac tac tgc caa caa aga tcc aac tgg cca ttg acc ttc ggt cca	384
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Pro	
115 120 125	
ggt act aag gtt gac atc aag aga acc gtt gct gct cca tcc gtt ttc	432
Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe	
130 135 140	
atc ttc cca cca tcc gac gag caa ttg aag tcc ggt act gct tcc gtt	480
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val	
145 150 155	
gtt tgc ttg ttg aac aac ttc tac cca aga gag gct aag gtt caa tgg	528
Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp	
160 165 170	
aag gtt gac aac gct ttg caa tcc ggt aac tcc caa gag tcc gtt acc	576
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr	
175 180 185 190	
gag caa gac tcc aag gac tcc acc tac tcc ttg tcc tcc acc ttg acc	624
Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr	
195 200 205	
ttg tcc aag gct gac tac gag aag cac aag gtt tac gct tgt gag gtt	672
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val	
210 215 220	

acc cac caa ggt ttg tcc tcc cca gtt acc aag tcc ttc aac aga ggt 720
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 225 230 235

gag tgc taa ggatcc 735
 Glu Cys
 240

5 <210> 59
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 59
 atagaactag caactagatg aaaaagcctg aactcac 37

15 <210> 60
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 60
 caaatccac ggatcactat tccttgccc tcggac 36

25 <210> 61
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 61
 aattcgagct cggtagagg atacatggga taccaaag 38

35 <210> 62
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> cebador

<400> 62
 gaggatccc ggtaccagg gtcgatttc ttggtcga 38

45 <210> 63
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> cebador

55 <400> 63
 atgcccgtag attcttctca taagacagc 29

5 <210> 64
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

10 <400> 64
 caaagtcatt taaatcaaat gcattagcgg

30

15 <210> 65
 <211> 1220
 <212> ADN
 <213> *Pichia pastoris*
 <400> 65

atgcccgtag attctttctca taagacagct agcccacttc cacctcgtaa aagagcaaag 60
acggaagaag aaaaggagca gcgtcgagtg gaacgtatcc tacgtaatag gagagcggcc 120
catgcttcca gagagaagaa acgaagacac gttgaatttc tggaaaacca cgtcgtcgac 180
ctggaatctg cacttcaaga atcagccaaa gccactaaca agttgaaaga aatacaagat 240
atcattgttt caaggttgga agccttaggt ggtaccgtct cagatttgga tttacagtt 300
ccggaagtgc attttccaa atcttctgat ttggaacca tgtctgatct ctcaacttct 360
tcgaaatcgg agaaagcatc tacatccact cgcagatctt tgactgagga tctggacgaa 420
gatgacgtcg ctgaatatga cgacgaagaa gaggacgaag agttaccag gaaaatgaaa 480
gtcttaaacg acaaaaacaa gagcacatct atcaagcagg agaagttgaa tgaacttcca 540
tctcctttgt catccgattt ttcagacgta gatgaagaaa agtcaactct cacacattta 600
aagttgcaac agcaacaaca acaaccagta gacaattatg tttctactcc tttgagtctt 660
ccggaggatt cagttgattt tattaacca ggtaacttaa aaatagagtc cgatgagaac 720
ttcttgttga gttcaaatc tttacaaata aaacacgaaa atgacaccga ctacattact 780
acagctccat caggttccat caatgatttt ttttaattctt atgacattag cgagtcgaat 840
cggttgcac atccagcagt gatgacggat tcatctttac acattacagc aggctccac 900
ggctttttct ctttgattgg ggggggggaa agttctgtag cagggaggcg cagttcagtt 960
ggcacatatc agttgacatg catagcgatc aggtgattgc tcttgtaac tggatgcca 1020
agtcaaccgt tttcggcgta cctactactc tactttaact cttgaattga gatgaaacaa 1080
tcgcccttgt tcgagacgcg tagttaattt aagatgaatc aatttgcaac aaaagaacaa 1140
acgaaaaaga taacagcaaa ctttaagttc gtggtctgca gcaccattta ccgctaagtc 1200
atttgattta aatgactttg 1220

<211> 898
<212> ADN
<213> *Pichia pastoris*

5 <400> 66
atgcccgtag attcttctca taagacagct agcccacttc cacctcgtaa aagagcaaag 60
acggaagaag aaaaggagca gcgtcgagtg gaacgtatcc tacgtaatag gagagcggcc 120
catgcttcca gagagaagaa acgaagacac gttgaatttc tggaaaacca cgtcgtcgac 180
ctggaatctg cacttcaaga atcagccaaa gccactaaca agttgaaaga aatacaagat 240
atcattgttt caaggttgga agccttaggt ggtaccgtct cagatttgga tttaacagtt 300
ccggaagtcg attttcccaa atcttctgat ttggaacca tgtctgatct ctcaacttct 360
tcgaaatcgg agaaagcatc tacatccact cgcagatctt tgactgagga tctggacgaa 420
gatgacgtcg ctgaatatga cgacgaagaa gaggacgaag agttaccag gaaaatgaaa 480
gtcttaaagc acaaaaacaa gagcacatct atcaagcagg agaagttgaa tgaacttcca 540
tctcctttgt catccgattt ttcagacgta gatgaagaaa agtcaactct cacacattta 600
aagttgcaac agcaacaaca acaaccagta gacaattatg tttctactcc tttgagtctt 660
ccggaggatt cagttgattt tattaacca ggtaacttaa aaatagagtc cgatgagaac 720
ttcttgttga gttcaatac ttacaaata aaacacgaaa atgacaccga ctacattact 780
acagctccat caggttccat caatgatttt ttttaattctt atgacattag cgagtcgaat 840
cggttgcatc atccagcagc accatttacc gctaatacat ttgatttaaa tgactttg 898

<210> 67
<211> 29
10 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

15 <400> 67
gactagtatg ccgtagatt ctctcata

29

20 <210> 68
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

5 <400> 68
cagatctcta ttctggaag aatacaaagt 30

<210> 69
<211> 915
10 <212> ADN
<213> *Pichia pastoris*

<400> 69
atgcccgtag attctttctca taagacagct agcccacttc cacctcgtaa aagagcaaag 60
acggaagaag aaaaggagca gcgtcgagtg gaacgtatcc tacgtaatag gagagcggcc 120
catgcttcca gagagaagaa acgaagacac gttgaatttc tggaaaacca cgtcgtcgac 180
ctggaatctg cacttcaaga atcagccaaa gccactaaca agttgaaaga aatacaagat 240
atcattgttt caaggttgga agccttaggt ggtaccgtct cagatttgga tttaacagtt 300
ccggaagtcg attttcccaa atcttctgat ttggaaccca tgtctgatct ctcaacttct 360
15 tcgaaatcgg agaaagcatc tacatccact cgcagatctt tgactgagga tctggacgaa 420
gatgacgtcg ctgaatatga cgacgaagaa gaggacgaag agttaccag gaaaatgaaa 480
gtcttaaacg acaaaaacaa gagcacatct atcaagcagg agaagttgaa tgaacttcca 540
tctcctttgt catccgattt ttcagacgta gatgaagaaa agtcaactct cacacattta 600
aagttgcaac agcaacaaca acaaccagta gacaattatg tttctactcc tttgagtctt 660
ccggaggatt cagttgattt tattaaccca ggtaacttaa aaatagagtc cgatgagaac 720
ttcttggtga gttcaatac tttacaaata aaacacgaaa atgacaccga ctacattact 780
acagctccat caggttccat caatgatitt ttttaattctt atgacattag cgagtcgaat 840
cggttgcatc atccagcagc accatttacc gctaatacat ttgatttaaa tgactttgta 900
ttcttcagg aatag 915

<210> 70
<211> 304
20 <212> PRT
<213> *Pichia pastoris*

<400> 70

Met Pro Val Asp Ser Ser His Lys Thr Ala Ser Pro Leu Pro Pro Arg
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Thr Glu Glu Glu Lys Glu Gln Arg Arg Val Glu Arg
20 25 30

Ile Leu Arg Asn Arg Arg Ala Ala His Ala Ser Arg Glu Lys Lys Arg
35 40 45

Arg His Val Glu Phe Leu Glu Asn His Val Val Asp Leu Glu Ser Ala
50 55 60

Leu Gln Glu Ser Ala Lys Ala Thr Asn Lys Leu Lys Glu Ile Gln Asp
65 70 75 80

Ile Ile Val Ser Arg Leu Glu Ala Leu Gly Gly Thr Val Ser Asp Leu
85 90 95

Asp Leu Thr Val Pro Glu Val Asp Phe Pro Lys Ser Ser Asp Leu Glu
100 105 110

Pro Met Ser Asp Leu Ser Thr Ser Ser Lys Ser Glu Lys Ala Ser Thr
115 120 125

Ser Thr Arg Arg Ser Leu Thr Glu Asp Leu Asp Glu Asp Asp Val Ala
130 135 140

Glu Tyr Asp Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Pro Arg Lys Met Lys
145 150 155 160

Val Leu Asn Asp Lys Asn Lys Ser Thr Ser Ile Lys Gln Glu Lys Leu
165 170 175

Asn Glu Leu Pro Ser Pro Leu Ser Ser Asp Phe Ser Asp Val Asp Glu
180 185 190

Glu Lys Ser Thr Leu Thr His Leu Lys Leu Gln Gln Gln Gln Gln
195 200 205

Pro Val Asp Asn Tyr Val Ser Thr Pro Leu Ser Leu Pro Glu Asp Ser
210 215 220

Val Asp Phe Ile Asn Pro Gly Asn Leu Lys Ile Glu Ser Asp Glu Asn
225 230 235 240

Phe Leu Leu Ser Ser Asn Thr Leu Gln Ile Lys His Glu Asn Asp Thr
245 250 255

Asp Tyr Ile Thr Thr Ala Pro Ser Gly Ser Ile Asn Asp Phe Phe Asn
260 265 270

Ser Tyr Asp Ile Ser Glu Ser Asn Arg Leu His His Pro Ala Ala Pro
275 280 285

Phe Thr Ala Asn Ala Phe Asp Leu Asn Asp Phe Val Phe Phe Gln Glu
290 295 300

5	<210> 71 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador <400> 71 gtctagaatg gaaatgactg attttgaact	30
15	<210> 72 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador <400> 72 cggatcctca tgaagtgatg aagaaatcat	30
25	<210> 73 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador <400> 73 atggcgggca aaaatcagaa atctagcgcg	30
35	<210> 74 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	

<220>
<223> cebador

5 <400> 74
ttacaactcg tcttgacta gaggcgggga 30

<210> 75
<211> 2520
10 <212> ADN
<213> *Ogataea minuta*

<400> 75
atggcgggca aaaatcagaa atctagcgcg accaccgctc agtcgttgag gggcgacacc 60

acaacagaaac tcgtgttgca aaaggggaag ttgaggacct atatcaaaac agagttgtca 120

gaggacacat tgagccacag ggtactgaac acgacgagcg agaagttggt gttggtgttg 180

ctgacagttt ttgctgccgt gattcgtttc cgcagtctca gcttcctga ctcagtggta 240

tttgacgagg ttcactttgg aggatttggc agaaaataca tcctgggaaa cttcttcag 300

gatgttcac	cgccattggc	caaactgta	tttgcctcgg	ttggatacct	aggcggattc	360
aagggtgatt	ttgagtttgc	gtctattgg	gacaagttcc	cgacctctgt	tccatatgtt	420
ctgatgagag	aatgagtg	gctcctcagt	gttgaacag	tggttctcat	gtacttaacc	480
ttgcgggcct	cgggctgcaa	gccaatcgtc	tcgtttctca	ccgcctcttt	gctgggtg	540
gagagtcca	atgtgacat	ctccagatac	attctgctgg	actctccttt	gatctttttc	600
attgctggct	cagtctactc	cttgaagaag	gtccagatct	acaaccata	ctcgttcgag	660
tggatcaaat	ccctgtttgc	aacaggagtt	tgctgggac	ttgcgttctc	gtccaaatgg	720
gttggctctat	tactgtggc	ctgggtcgg	gcctgcagcg	tgatcagtct	gtggtttcag	780
attggcgatc	tgtccgtcaa	gcccaagtca	attgttacct	aggcggtcgc	caagggtgcc	840
gttttgctcg	gagtcctgc	cattttgtac	ttggttttct	tctacctcca	cctctcgttc	900
ctcaaccacg	agggagacgg	tgctgccttc	ctctcttctg	ccttcagagt	gtccttcgac	960
gacactaatg	tccctgtgtc	caccttggca	gacgttggag	ttggctcgg	cgtcactatc	1020
agacatctca	acaccaacgg	aggctacttg	cactcccaca	accatttgta	tgaaggagga	1080
tcgggacaac	agcaaatac	tctgtaccca	catctggacg	agaacaataa	atggaagatt	1140
gagctctaca	acgttactga	ggaacctacc	gaatttgagc	caattacaga	cggaacaaag	1200
atcagattga	aacacacatt	cacctccaga	agattgcatt	cccacgacgt	gagaccggca	1260
gtcagcgaga	tagactggca	aatgaggct	tcctgtctacg	ggtacgagga	ctttgaagga	1320
gatgccaacg	acgatttcgt	tgttgagatt	gtggacagtt	tgtctgtctc	tggcgactcc	1380
agaacacaag	tgaagccat	ccataccgtg	ttcagattga	ggcacgcaat	gaccggttgt	1440
tatctgttct	cccacgagac	caagttgcca	aatggggat	ttgaacaaca	ggaggtcaca	1500
tgtgccaccc	aaggtatcaa	acctctctcc	tactggtacg	tggagcaaaa	tgagaaccca	1560

ttccttgatg cggaaccgc tgaaatcgcc gcttatccgc agctcacttt ccttcaaaaa 1620
 ttactgaat tgcacaagag gatgtggaaa atcaacaaga gtctgaacgc tccacacact 1680
 tacgagtcga gaccagagtc ctggcctggt ctgtccagag gtattttctta ctggagagat 1740
 ggagacagac aggtctattt gcttggaaac ccaattgtgt ggtggctagc ctcttttatac 1800
 ttccttccgt tcggcttcta cgttatcgct cagcttttga gatggcaatt ggggtgctgac 1860
 ttgggggata actcggctgt tttcaattac agtatcacca catttgagtt ccttttggga 1920
 tgggttcattc attactatcc atccttcttc atggagagac agctcttttt gcaccactac 1980
 atcccagccc tctactttgg tattttggca ttgggacaaa cgttcgaggt gctgtactct 2040
 cacgtcctca aaggcaagaa attcctctcg atggccctct tcggcttgct cttgccagc 2100
 gcaggataca tgtttgttca gagatcctcc atcatctacg gatccgcctg ggacaaacag 2160
 agctgtgagg cttccaagct gctttcaagc tgggactatg attgcagcat ctaccagag 2220
 actttgtttg cttcttccgc atcaattgcg gagccaaagc agactcaggc gccaaagatc 2280
 aactttgacg aggcatlgaa cgtggacctg gaaccggct acgacaattc acagtttggt 2340
 gagagcattt atgaaacgtc taacgacgaa aaaaaccaag cagagaacgt tgttcaagag 2400
 acccctcgtg acaacggcgc cgactccgtt tccagcgacg attcaacagt cggtagggcc 2460
 gtccctgacg atctcaagac aaatggagag tccccgcctc tagtcaaaga cgagttgtaa 2520

<210> 76
 <211> 839
 <212> PRT
 <213> *Ogataea minuta*

<400> 76
 Met Ala Gly Lys Asn Gln Lys Ser Ser Ala Thr Thr Ala Gln Ser Leu
 1 5 10 15

Arg Gly Asp Thr Thr Thr Glu Leu Val Leu Gln Lys Gly Lys Leu Arg
20 25 30

Thr Tyr Ile Lys Thr Glu Leu Ser Glu Asp Thr Leu Ser His Arg Val
35 40 45

Leu Asn Thr Thr Ser Glu Lys Leu Leu Leu Val Leu Leu Thr Val Phe
50 55 60

Ala Ala Val Ile Arg Phe Arg Ser Leu Ser Phe Pro Asp Ser Val Val
65 70 75 80

Phe Asp Glu Val His Phe Gly Gly Phe Ala Arg Lys Tyr Ile Leu Gly
85 90 95

Asn Phe Phe Met Asp Val His Pro Pro Leu Ala Lys Leu Leu Phe Ala
100 105 110

Ala Val Gly Tyr Leu Gly Gly Phe Lys Gly Asp Phe Glu Phe Ala Ser
115 120 125

Ile Gly Asp Lys Phe Pro Thr Ser Val Pro Tyr Val Leu Met Arg Glu
130 135 140

Met Ser Ala Leu Leu Ser Val Gly Thr Val Val Leu Met Tyr Leu Thr
145 150 155 160

Leu Arg Ala Ser Gly Cys Lys Pro Ile Val Ser Phe Leu Thr Ala Ser
165 170 175

Leu Leu Val Val Glu Ser Ala Asn Val Thr Ile Ser Arg Tyr Ile Leu
180 185 190

Leu Asp Ser Pro Leu Ile Phe Phe Ile Ala Gly Ser Val Tyr Ser Leu
195 200 205

Lys Lys Val Gln Ile Tyr Lys Pro Tyr Ser Phe Glu Trp Ile Lys Ser
210 215 220

Leu Phe Ala Thr Gly Val Cys Leu Gly Leu Ala Phe Ser Ser Lys Trp
225 230 235 240

Val Gly Leu Phe Thr Val Ala Trp Val Gly Ala Cys Ser Val Ile Ser
245 250 255

Leu Trp Phe Gln Ile Gly Asp Leu Ser Val Lys Pro Lys Ser Ile Val
260 265 270

Thr Gln Ala Val Ala Lys Val Ser Val Leu Leu Gly Val Pro Ala Ile
275 280 285

Leu Tyr Leu Val Phe Phe Tyr Leu His Leu Ser Phe Leu Asn His Glu
290 295 300

Gly Asp Gly Ala Ala Phe Leu Ser Ser Ala Phe Arg Val Ser Phe Asp
305 310 315 320

Asp Thr Asn Val Pro Val Ser Thr Leu Ala Asp Val Gly Val Gly Ser
325 330 335

Val Val Thr Ile Arg His Leu Asn Thr Asn Gly Gly Tyr Leu His Ser
340 345 350

His Asn His Leu Tyr Glu Gly Gly Ser Gly Gln Gln Gln Ile Thr Leu
355 360 365

Tyr Pro His Leu Asp Glu Asn Asn Lys Trp Lys Ile Glu Leu Tyr Asn
370 375 380

Val Thr Glu Glu Pro Thr Glu Phe Glu Pro Ile Thr Asp Gly Thr Lys
385 390 395 400

Ile Arg Leu Lys His Thr Phe Thr Ser Arg Arg Leu His Ser His Asp
405 410 415

Val Arg Pro Ala Val Ser Glu Ile Asp Trp Gln Asn Glu Ala Ser Cys
420 425 430

Tyr Gly Tyr Glu Asp Phe Glu Gly Asp Ala Asn Asp Asp Phe Val Val
435 440 445

Glu Ile Val Asp Ser Leu Ser Ala Pro Gly Asp Ser Arg Thr Gln Val
450 455 460

Lys Ala Ile His Thr Val Phe Arg Leu Arg His Ala Met Thr Gly Cys
465 470 475 480

Tyr Leu Phe Ser His Glu Thr Lys Leu Pro Lys Trp Gly Phe Glu Gln
485 490 495

Gln Glu Val Thr Cys Ala Thr Gln Gly Ile Lys Pro Leu Ser Tyr Trp
500 505 510

Tyr Val Glu Gln Asn Glu Asn Pro Phe Leu Asp Ala Glu Thr Ala Glu
515 520 525

Ile Ala Ala Tyr Pro Gln Leu Thr Phe Leu Gln Lys Phe Thr Glu Leu
530 535 540

His Lys Arg Met Trp Lys Ile Asn Lys Ser Leu Asn Ala Pro His Thr
545 550 555 560

Tyr Glu Ser Arg Pro Glu Ser Trp Pro Val Leu Ser Arg Gly Ile Ser
565 570 575

Tyr Trp Arg Asp Gly Asp Arg Gln Val Tyr Leu Leu Gly Asn Pro Ile
580 585 590

Val Trp Trp Leu Ala Ser Phe Ile Phe Leu Pro Phe Gly Phe Tyr Val
595 600 605

Ile Ala Gln Leu Leu Arg Trp Gln Leu Gly Ala Asp Leu Gly Asp Asn
610 615 620

Ser Ala Val Phe Asn Tyr Ser Ile Thr Thr Phe Glu Phe Leu Leu Gly
625 630 635 640

Trp Phe Ile His Tyr Tyr Pro Ser Phe Leu Met Glu Arg Gln Leu Phe
645 650 655

Leu His His Tyr Ile Pro Ala Leu Tyr Phe Gly Ile Leu Ala Leu Gly
660 665 670

Gln Thr Phe Glu Val Leu Tyr Ser His Val Leu Lys Gly Lys Lys Phe
675 680 685

Leu Ser Met Ala Leu Phe Gly Leu Leu Phe Ala Ser Ala Gly Tyr Met
690 695 700

Phe Val Gln Arg Ser Ser Ile Ile Tyr Gly Ser Ala Trp Asp Lys Gln
705 710 715 720

Ser Cys Glu Ala Ser Lys Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Asp Cys Ser
725 730 735

Ile Tyr Pro Glu Thr Leu Phe Ala Ser Ser Ala Ser Ile Ala Glu Pro
740 745 750

Lys Gln Thr Gln Ala Pro Lys Ile Asn Phe Asp Glu Ala Leu Asn Val
755 760 765

Asp Leu Glu Pro Gly Tyr Asp Asn Ser Gln Phe Val Glu Ser Ile Tyr
770 775 780

Glu Thr Ser Asn Asp Glu Lys Asn Gln Ala Glu Asn Val Val Gln Glu
785 790 795 800

Thr Pro Arg Asp Asn Gly Ala Asp Ser Val Ser Ser Asp Asp Ser Thr
805 810 815

Val Gly Glu Ala Val Pro Asp Asp Leu Lys Thr Asn Gly Glu Ser Pro
820 825 830

Pro Leu Val Lys Asp Glu Leu
835

<210> 77
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

	<223> cebador	
	<400> 77	
5	atgggcgaac gtacgggcaa aagtgcgctc	30
	<210> 78	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 78	
15	ctaatacggaa attctccacg tgctcaagag	30
	<210> 79	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 79	
25	atggggccca aaataaagac cggcaagaaa	30
	<210> 80	
	<211> 30	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
35	<400> 80	
	ctatttagca aaatgcagtt tgatgtgag	30
	<210> 81	
40	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> cebador	
	<400> 81	
	atggacgaga aaaacatctc tggcttagaa	30
50	<210> 82	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 82	
60	ctactacta tagacggagc agtcgatcga	30
	<210> 83	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	

<223> cebador

<400> 83
 atgtccgagt cagagctgag aaaccgcaaa 30

5 <210> 84
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

15 <400> 84
 ctaagctata cgccaggtgg aaaccagtt 30

20 <210> 85
 <211> 2259
 <212> ADN
 <213> *Ogataea minuta*

<400> 85
 atgggcgaac gtacgggcaa aagtgcgctc gaaaaggaac ccttgttga aaacgatgag 60

tttacagaag atgaagtga ggcgaaacta gttgaattgg ccaccaagcc agagccggag 120

tccgaaatta cctctgttig tcagtgggtg ttccgcaccg agacctggct ggcgccaatc 180

ttgttcactc ttctttcttt ctttgtcaga atgtacaaa tcggaatcaa tcctcacgtt 240

gtttgggatg aagcccatit cggttaagtt ggatcctact attgagaca cgaatittac 300

cacgatgtcc accctcctct tggaaaaatg cttgttggtc tctcaggata ccttgctgga 360

tacaatggtt cgtgggactt cccatctggc caggaatacc cggactacat tgactttgtc 420

aaaatgagat tattcaacgc gactttcagt gctctttgtg ttccaatcgc ctacttcacc 480

atgaaagaat ttggcttcaa cagaaaaacg acatggctct tcactttgat ggtgactttg 540

gaaacttcgt acactacgt tgccagattc attctgctgg actcgatgct tcttcttttt 600

accgtggcta ccgtgttctg ttctgccaga ttccacaacc aaaacagagt tgaatcaaac 660

tccttctcga gaaaatggtg gaaatggatt ttgttgactg gtatcaacat cggatgcacc 720

tgttcgggtga aaatggttgg tcttttcgtc accaccttgg ttggtatcta cacggttgtc	780
gatctgtgga ctaagttcgg ccagctgagg aagaccatct ctgtaaagag atacattttc	840
cactgggccca ccagaatctt tgctctcatt atcattccat ttgctgtttt tttgatctct	900
ttcaaagtcc acttcgacct gcttttcgga tccgggtccag gagacgcgaa catgtcctcg	960
ttgttccagg ccaacctggg tggatccacc ctcatcttcg ggccaagaga cgtcatgact	1020
ctcaactctg tcgtgactct caaaagtcag ggattgaccg gtggtttgct ccattcccac	1080
gtgcagacct atcccgaagg ctggaaccaa cagcaagtga ccacttactc gcacaaagat	1140
gcgaacaacg actggacttt tgagctgggc agagaagacg tcagaaactc cttcaccgaa	1200
cctcactacg tcgttgacgg aatggccgtc agacttggtc acaaactctac gggaagaaac	1260
ttgcacaccc acgagatccc tgctccagtg tccagttccc aatacgaagt ctccggttac	1320
ggtaacttga ccgttggcga ccgcaaagac aactggattg tggagattgc tgaccaatac	1380
ggcgacgagg acaagatcag attgcatccg ctgacctctt cattcagact cagatcggag	1440
ttgatgggtt gttacttggc cacaaccggt gtctctctgc cacagtgggg attcagacaa	1500
ggagaggttg tctgtatgca ctcgccattc aagagggaca agagaacatg gtggaacatt	1560
gaaaaccacg agaatccaga actgccaaac ccaccagaag acttcaaatt gccaaaaaca	1620
tctttcatca aggactttgt ccagctcaac atcgccatga tggccaccaa caacgcactg	1680
gtcccagatc cggaaaaaca ggacgatttg gcttctaaat tctggcaatg gccttcgttg	1740
aacgtcggta tcagactctg tggttgggga gacgacaatg tcaagtactt cttgattggg	1800
tctccggcca ctacttgga ctcgtcgggt tccatcgtgg tgtttgttgc aatggttgcc	1860
ttctacctgg tcagatggca gagacagatc gaggatttcc catccgactc gaagacacac	1920
tacaagagcg acaaactcaa cctgttcttg atgggaggag tctatccgtt cctgggttgg	1980

ttcctgcatt acatgccgtt ctgtatcatg ggcagagtca cttacgttca ccattacctc 2040
 cctgcattgt actttgctat gattgtgatg tgctacactg ttcagtcctt cacgtccttc 2100
 gccacaaca aatacctcac cgctgtgtgc tacttgtctc tctatgcact tgtgattggg 2160
 ttctttgtgt ttttgcttcc tgtttcggtc ggtatggacg gtccgaacgc agacttcaag 2220
 tatctcagcc tcttgagcac gtggagaatt tccgattag 2259

<210> 86
 <211> 752
 <212> PRT
 <213> *Ogataea minuta*

<400> 86
 Met Gly Glu Arg Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Lys Glu Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Asn Asp Glu Phe Thr Glu Asp Glu Val Lys Ala Lys Leu Val Glu
 20 25 30

Leu Ala Thr Lys Pro Glu Pro Glu Ser Glu Ile Thr Ser Val Cys Gln
 35 40 45

Trp Trp Phe Arg Thr Glu Thr Trp Leu Ala Pro Ile Leu Phe Thr Leu
 50 55 60

Leu Ser Phe Phe Val Arg Met Tyr Lys Ile Gly Ile Asn Pro His Val
 65 70 75 80

Val Trp Asp Glu Ala His Phe Gly Lys Phe Gly Ser Tyr Tyr Leu Arg
 85 90 95

His Glu Phe Tyr His Asp Val His Pro Pro Leu Gly Lys Met Leu Val
100 105 110

Gly Leu Ser Gly Tyr Leu Ala Gly Tyr Asn Gly Ser Trp Asp Phe Pro
115 120 125

Ser Gly Gln Glu Tyr Pro Asp Tyr Ile Asp Phe Val Lys Met Arg Leu
130 135 140

Phe Asn Ala Thr Phe Ser Ala Leu Cys Val Pro Ile Ala Tyr Phe Thr
145 150 155 160

Met Lys Glu Phe Gly Phe Asn Arg Lys Thr Thr Trp Leu Phe Thr Leu
165 170 175

Met Val Thr Leu Glu Thr Ser Tyr Thr Thr Leu Ala Arg Phe Ile Leu
180 185 190

Leu Asp Ser Met Leu Leu Leu Phe Thr Val Ala Thr Val Phe Cys Phe
195 200 205

Ala Arg Phe His Asn Gln Asn Arg Val Glu Ser Asn Ser Phe Ser Arg
210 215 220

Lys Trp Trp Lys Trp Ile Leu Leu Thr Gly Ile Asn Ile Gly Cys Thr
225 230 235 240

Cys Ser Val Lys Met Val Gly Leu Phe Val Thr Thr Leu Val Gly Ile
245 250 255

Tyr Thr Val Val Asp Leu Trp Thr Lys Phe Gly Gln Leu Arg Lys Thr
260 265 270

Ile Ser Val Lys Arg Tyr Ile Phe His Trp Ala Thr Arg Ile Phe Ala
 275 280 285

Leu Ile Ile Ile Pro Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Phe Lys Val His
 290 295 300

Phe Asp Leu Leu Phe Gly Ser Gly Pro Gly Asp Ala Asn Met Ser Ser
 305 310 315 320

Leu Phe Gln Ala Asn Leu Val Gly Ser Thr Leu Ile Ser Gly Pro Arg
 325 330 335

Asp Val Met Thr Leu Asn Ser Val Val Thr Leu Lys Ser Gln Gly Leu
 340 345 350

Thr Gly Gly Leu Leu His Ser His Val Gln Thr Tyr Pro Glu Gly Ser
 355 360 365

Asn Gln Gln Gln Val Thr Thr Tyr Ser His Lys Asp Ala Asn Asn Asp
 370 375 380

Trp Thr Phe Glu Leu Val Arg Glu Asp Val Arg Asn Ser Phe Thr Glu
 385 390 395 400

Pro His Tyr Val Val Asp Gly Met Ala Val Arg Leu Val His Lys Ser
 405 410 415

Thr Gly Arg Asn Leu His Thr His Glu Ile Pro Ala Pro Val Ser Ser
 420 425 430

Ser Gln Tyr Glu Val Ser Gly Tyr Gly Asn Leu Thr Val Gly Asp Arg
435 440 445

Lys Asp Asn Trp Ile Val Glu Ile Ala Asp Gln Tyr Gly Asp Glu Asp
450 455 460

Lys Ile Arg Leu His Pro Leu Thr Ser Ser Phe Arg Leu Arg Ser Glu
465 470 475 480

Leu Met Gly Cys Tyr Leu Ala Thr Thr Gly Val Ser Leu Pro Gln Trp
485 490 495

Gly Phe Arg Gln Gly Glu Val Val Cys Met His Ser Pro Phe Lys Arg
500 505 510

Asp Lys Arg Thr Trp Trp Asn Ile Glu Asn His Glu Asn Pro Glu Leu
515 520 525

Pro Asn Pro Pro Glu Asp Phe Lys Leu Pro Lys Thr Ser Phe Ile Lys
530 535 540

Asp Phe Val Gln Leu Asn Ile Ala Met Met Ala Thr Asn Asn Ala Leu
545 550 555 560

Val Pro Asp Pro Glu Lys Gln Asp Asp Leu Ala Ser Lys Phe Trp Gln
565 570 575

Trp Pro Ser Leu Asn Val Gly Ile Arg Leu Cys Gly Trp Gly Asp Asp
580 585 590

Asn Val Lys Tyr Phe Leu Ile Gly Ser Pro Ala Thr Thr Trp Thr Ser
595 600 605

Ser Val Ser Ile Val Val Phe Val Ala Met Val Ala Phe Tyr Leu Val
610 615 620

Arg Trp Gln Arg Gln Ile Glu Asp Phe Pro Ser Asp Ser Lys Thr His
625 630 635 640

Tyr Lys Ser Asp Lys Leu Asn Leu Phe Leu Met Gly Gly Val Tyr Pro
645 650 655

Phe Leu Gly Trp Phe Leu His Tyr Met Pro Phe Cys Ile Met Gly Arg
660 665 670

Val Thr Tyr Val His His Tyr Leu Pro Ala Leu Tyr Phe Ala Met Ile
675 680 685

Val Met Cys Tyr Thr Val Gln Ser Phe Thr Ser Phe Ala Asn Asn Lys
690 695 700

Tyr Leu Thr Ala Val Val Tyr Leu Ser Leu Tyr Ala Leu Val Ile Gly
705 710 715 720

Phe Phe Val Phe Leu Leu Pro Val Ser Phe Gly Met Asp Gly Pro Asn
725 730 735

Ala Asp Phe Lys Tyr Leu Ser Leu Leu Ser Thr Trp Arg Ile Ser Asp
740 745 750

<210> 87
<211> 2265
5 <212> ADN
<213> *Ogataea minuta*
<400> 87

atggggccca aaataaagac cggcaagaaa cccaatgcgg tggaatcagt ggttggtgac	60
aaaaagggga gtgtctcgtt ggagggcaag attgacaccc cagtcaagaa ctctcgatc	120
gatccctcaa tggagatcta ctacaagctg acgaatacaa tgttgacgct tctggctttg	180
gccactagat tctactacat ctggtacccc aacgaggtgg tgttcgatga agttcacttt	240
ggaaagtttg cctcgtacta cttggagaga acctatttct tcgatctcca cctccattc	300
gccaagctcc tcattgcctt cgttggtctat ctggttggtt tcagtgggaa attcaagttt	360
gacaacatcg gggacagcta tatcaccac tctattccat acatcccgtt gcgtgcgctt	420
tctgctgttc tgggatccct gaccgtgccg ctcatgttct ccacgttgca agagtgtggt	480
tactcaattc caacgtgcgc ttttggtgcc ctgctggttg tgttgacaa cgctcatgct	540
gccgagacta gattgattct gctcgacgct acgctgatct tctcggttgc agcttctgtg	600
tactgctacg tgagattcac aaagcaaaga caccagcctt ttaccgcaac ctggtacaag	660
tggttggttt tgaccggtgt ctcgttgtcc tgtgtcattt ccaccaaata cgtgggtggt	720
ttcacctttg cctgcgttgg tgtggctgtg gtttgggact tgtgggagct tttggatatt	780
aagaagggcc tcacaattag agttttggct agacattttg tccacagagc catcggcctc	840
attttgctgc cgttcattat ttacttgggc tggttttaca tccactttgc cattctgacc	900
aaatcgggac cgggagatcc tttcatgagc gcagacttcc aagaaacttt gggagactct	960
cctctcaciaa gagaagcaag agaggtcaac taccatgata tcataacggt caaacacaaa	1020
gacactgagt gtttattgca ctgcctcct ttcaactatc cactacgtta cgatgacgga	1080
agaatttctt cgcaaggcca gcaggtgact tgtatgaaag attacacaga cgtaacaac	1140
tactgggaaa ttcttcctgc taaagcttct gacgaaactg tgaacctcgg tctcgtgtc	1200

aaacaaggag acactttcag attgagacac gttgagacag gcggattttt actcactcat 1260
 gacgttgctt ctcccccttt cccgaccaac gaggagttaa ctgtcatgag cgctgaagaa 1320
 gcggatttcta caaggttcaa cgacactttg ttcagatttg atccgttcga caagaggaag 1380
 aacgacgtgc tcaagaccaa ggcatccgtg gtcaaagttt tccacgttcc taccattgtc 1440
 actatgtgga ctcacgatga tcagctactt ccagaatggg gcttcaacca acaggaggtc 1500
 aacggaaaca aaaaggttgc ggactccgat aactactgga ctattgactc tatcattggt 1560
 ttgtctggcg aaagagccaa gtacgttcca aaagaagtga aacgtttgcc attccttacc 1620
 aaatggaaag agctgcaact cactatgttt gaacaaaaca acaaattgag ttcgagccat 1680
 ccatttgcac cccaacctga gtcattggcct ttgtcgttgt ccggtgtctc gttctggact 1740
 aagaatgata cccgcgaaca aatctacttc attggaaatc ttttcggctg gtgggttagaa 1800
 gccggactgc ttctgtgtta cctaggaata ttgtctggcag accaactcac gagacgcaga 1860
 aatgtgactg ttttgagcac tagagccaga gctagggtgt acaaaaacat cggatttttc 1920
 ttctgcggat gggccaccca ctacttccca ttcttcctca tgtcaagaca aaagttcctg 1980
 catcattatt tgcctgcgca cctgctggct gcgctgtttt cggcgtcctt gttggaattc 2040
 attttcaccg ataacagaca cgaggagctc agggatccaa aagataagtc tgagccagga 2100
 aaggtcaact ggatcctata cctgtcgtgc ctgattctgc ttgtgacagt cttagttgga 2160
 ttctacgtct tccttgcctc gttgacctac ggaaacgttt cattgacccc tgaagaagtc 2220
 atcaagagac aaattctcaa catcaaactg cattttgcta aatag 2265

<210> 88
 <211> 754
 <212> PRT
 <213> *Ogataea minuta*
 <400> 88

Met Gly Pro Lys Ile Lys Thr Gly Lys Lys Pro Asn Ala Val Glu Ser
1 5 10 15

Val Val Val Asp Lys Lys Gly Ser Val Ser Leu Glu Gly Lys Ile Asp
20 25 30

Thr Pro Val Lys Asn Ser Ser Ile Asp Pro Ser Met Glu Ile Tyr Tyr
35 40 45

Lys Leu Thr Asn Thr Met Leu Thr Leu Leu Ala Leu Ala Thr Arg Phe
50 55 60

Tyr Tyr Ile Trp Tyr Pro Asn Glu Val Val Phe Asp Glu Val His Phe
65 70 75 80

Gly Lys Phe Ala Ser Tyr Tyr Leu Glu Arg Thr Tyr Phe Phe Asp Leu
85 90 95

His Pro Pro Phe Ala Lys Leu Leu Ile Ala Phe Val Gly Tyr Leu Val
100 105 110

Gly Phe Ser Gly Lys Phe Lys Phe Asp Asn Ile Gly Asp Ser Tyr Ile
115 120 125

Thr His Ser Ile Pro Tyr Ile Pro Leu Arg Ala Leu Ser Ala Val Leu
130 135 140

Gly Ser Leu Thr Val Pro Leu Met Phe Ser Thr Leu Gln Glu Cys Gly
145 150 155 160

Tyr Ser Ile Pro Thr Cys Ala Phe Gly Ala Leu Leu Val Val Phe Asp
165 170 175

Asn Ala His Ala Ala Glu Thr Arg Leu Ile Leu Leu Asp Ala Thr Leu
180 185 190

Ile Phe Ser Val Ala Ala Ser Val Tyr Cys Tyr Val Arg Phe Thr Lys
195 200 205

Gln Arg His Gln Pro Phe Thr Ala Thr Trp Tyr Lys Trp Leu Val Leu
210 215 220

Thr Gly Val Ser Leu Ser Cys Val Ile Ser Thr Lys Tyr Val Gly Val
225 230 235 240

Phe Thr Phe Ala Cys Val Gly Val Ala Val Val Trp Asp Leu Trp Glu
245 250 255

Leu Leu Asp Ile Lys Lys Gly Leu Thr Ile Arg Val Leu Ala Arg His
260 265 270

Phe Val His Arg Ala Ile Gly Leu Ile Leu Leu Pro Phe Ile Ile Tyr
275 280 285

Leu Gly Trp Phe Tyr Ile His Phe Ala Ile Leu Thr Lys Ser Gly Pro
290 295 300

Gly Asp Pro Phe Met Ser Ala Asp Phe Gln Glu Thr Leu Gly Asp Ser
305 310 315 320

Pro Leu Thr Arg Glu Ala Arg Glu Val Asn Tyr His Asp Ile Ile Thr
325 330 335

Val Lys His Lys Asp Thr Glu Cys Leu Leu His Ser His Pro Phe Asn
 340 345 350

Tyr Pro Leu Arg Tyr Asp Asp Gly Arg Ile Ser Ser Gln Gly Gln Gln
 355 360 365

Val Thr Cys Met Lys Asp Tyr Thr Asp Val Asn Asn Tyr Trp Glu Ile
 370 375 380

Leu Pro Ala Lys Ala Ser Asp Glu Thr Val Asn Leu Gly Leu Ala Val
 385 390 395 400

Lys Gln Gly Asp Thr Phe Arg Leu Arg His Val Glu Thr Gly Gly Phe
 405 410 415

Leu Leu Thr His Asp Val Ala Ser Pro Leu Phe Pro Thr Asn Glu Glu
 420 425 430

Phe Thr Val Met Ser Ala Glu Glu Ala Asp Ser Thr Arg Phe Asn Asp
 435 440 445

Thr Leu Phe Arg Phe Asp Pro Phe Asp Lys Arg Lys Asn Asp Val Leu
 450 455 460

Lys Thr Lys Ala Ser Val Val Lys Val Phe His Val Pro Thr Ile Val
 465 470 475 480

Thr Met Trp Thr His Asp Asp Gln Leu Leu Pro Glu Trp Gly Phe Asn
 485 490 495

Gln Gln Glu Val Asn Gly Asn Lys Lys Val Ala Asp Ser Asp Asn Tyr
500 505 510

Trp Thr Ile Asp Ser Ile Ile Gly Leu Ser Gly Glu Arg Ala Lys Tyr
515 520 525

Val Pro Lys Glu Val Lys Arg Leu Pro Phe Leu Thr Lys Trp Lys Glu
530 535 540

Leu Gln Leu Thr Met Phe Glu Gln Asn Asn Lys Leu Ser Ser Ser His
545 550 555 560

Pro Phe Ala Ser Gln Pro Glu Ser Trp Pro Leu Ser Leu Ser Gly Val
565 570 575

Ser Phe Trp Thr Lys Asn Asp Thr Arg Glu Gln Ile Tyr Phe Ile Gly
580 585 590

Asn Leu Phe Gly Trp Trp Leu Glu Ala Gly Leu Leu Leu Cys Tyr Leu
595 600 605

Gly Ile Leu Leu Ala Asp Gln Leu Thr Arg Arg Arg Asn Val Thr Val
610 615 620

Leu Ser Thr Arg Ala Arg Ala Arg Leu Tyr Lys Asn Ile Gly Phe Phe
625 630 635 640

Phe Cys Gly Trp Ala Thr His Tyr Phe Pro Phe Phe Leu Met Ser Arg
645 650 655

Gln Lys Phe Leu His His Tyr Leu Pro Ala His Leu Leu Ala Ala Leu
660 665 670

Phe Ser Ala Ser Leu Leu Glu Phe Ile Phe Thr Asp Asn Arg His Glu
675 680 685

Glu Leu Arg Asp Pro Lys Asp Lys Ser Glu Pro Gly Lys Val Asn Trp
690 695 700

Ile Leu Tyr Leu Ser Cys Leu Ile Leu Leu Val Thr Val Leu Val Gly
705 710 715 720

Phe Tyr Val Phe Leu Ala Pro Leu Thr Tyr Gly Asn Val Ser Leu Thr
725 730 735

Pro Glu Glu Val Ile Lys Arg Gln Ile Leu Asn Ile Lys Leu His Phe
740 745 750

Ala Lys

<210> 89
<211> 2199
<212> ADN
<213> *Ogataea minuta*

<400> 89
atggacgaga aaaacatctc tggcttagaa cgcctaggca ccggcccaga gttcacactc 60

gtgcagggcc cgagacgcaa ctacctcgt ctgccgaaa aggcggggct tccaagccgc 120

actagaaagg agaagctcca ggttctgtgc gtcattctgc tcgcgtcac cagagactc 180

gtctctctga accatccgtc gtcggtcgtc tacgacgagc taactaccgg aaacatcgtc 240

aacaactacc tccatggaca ctattttgtc gatgcagatc ctctttttgt caaaattcta 300

tacactgctg tcgccc aaat atcgcagtac acgggcgcgt tccaattcca ctctgctggc	360
cagtcgtatc tgaacgaaga cctcgagccg gagttcccat acgtggcact ccgggtgttc	420
agcggcctct gcagcgtggc aaccgttctc ctggcataca aaactctcag agccacggga	480
gtcagacacc tgattgctct gttcggcgcc tttctgattg cactagaagg ctcgatgatt	540
acgcaatcaa gatTTTTcat gcaaacggct cacgtcgtgt tcttcaccgg cttggccgtt	600
ggaatgtcca aaacgtcaga cctgtttgaa ccctcgagcg caaatggct caaacacacc	660
gcagcggccg gcctcggcgt ggcgtttcta atttcgtccg cgtggtcggg tcttttcacg	720
gctgtttggg tggttctcgt caccctgaga agagtctggg acctcaccgg cgacgttacg	780
acaaatccaa gaaccacgtt cctcagatac gcgcttcccc gctttgctct tattgttgcg	840
gcgccagtgg ctttctacct gtgggtgttc aaagtgcac tggacttgct tccagtggct	900
ggtcccggct acccgttcat gtccgcggag ttccagcacg ggctggtcgg caccatctc	960
aacaacatTT ctgccgaagt ctcgatggc tccacagttt ccattagaca cttgcacacg	1020
gggaagtacc tgcaactcca gaacaaaacg taccctaaaa caggacacca gcgggtcacc	1080
acattcggcg accaggactt caacaacctg ttttacgtcg agatgagggt caagtccgaa	1140
cgcggcgagc tcgcacggaa agtcaaagct gtcgagagcg gcagacaaat acgtcttttc	1200
cacaatgcca ccagaagta cctgtttatc gaccocggaca acaagcctcc tctctccgag	1260
acagactata acaaggaagt gagcacgtt ggaaacgctt cctgggtggg cgagaactac	1320
ctcaacttcg agcttctgct tgccccgggc ttctccaaga ccgaggtggg caagaaaaga	1380
gtcggggccg tcgagtctgt cttccagctg tacaacgtca agaacaagt ctatctgctg	1440
gggaccgaga acaggcttcc gagctgggca gacggggaaa acgaggtcgt ttgcatcgag	1500
aaacctatTT tcgaaagatc gttgtggtac tttgaaacca atctccacga caagttcacc	1560

cccgcacggg cccaggtcgc tttcaggcag cagacgttct gggacaagat tctcgaaatt 1620
 cacaaagtca tggcagatct gctgcacaa aacacccatg acgacgcaa cagcacgct 1680
 cctcgggatt ggttcttctt cagaaaggga atcaggtact gggcagaaag tcaggccatg 1740
 gtatatctca ctgggaacct ggttgtctac tcgttgacgg cgctaggcac tgtgggattc 1800
 ttggtgttca aactcgggtca tctatgttcg ttcaaccga ataagtcgcc agactactcc 1860
 agcgacttcc tcaagttcga ctaccacgct caggaatttc ttctcggata cctgctgaac 1920
 tggttctctc acgcgcttcc aaagacaaac acatacgtgt tcgagtacca gccggcggtg 1980
 tacttcggtg ttcttctgtc ctgtcagtcg ctagagtacc tggcctcaa gaacctgaag 2040
 ctgtgctatg tgtttgcggc cgcggttgca ctgctcacag cagctttctt ccgtttgtcg 2100
 gcaccgttga tgtacggact gaagtggcag gagttgtact gcgtcgtgt ttcaacagct 2160
 gccagacagt cgatcgactg ctccgtctat agtgagtag 2199

<210> 90
 <211> 732
 <212> PRT
 <213> *Ogataea minuta*

<400> 90
 Met Asp Glu Lys Asn Ile Ser Gly Leu Glu Arg Leu Gly Thr Gly Pro
 1 5 10 15

Glu Phe Thr Leu Val Gln Gly Pro Arg Arg Asn Tyr Leu Arg Leu Pro
 20 25 30

Glu Lys Ala Gly Leu Pro Ser Arg Thr Arg Lys Glu Lys Leu Gln Val
 35 40 45

Leu Cys Val Ile Leu Leu Ala Leu Thr Thr Arg Leu Val Ser Leu Asn
50 55 60

His Pro Ser Ser Val Val Tyr Asp Glu Leu Thr Thr Gly Asn Ile Val
65 70 75 80

Asn Asn Tyr Leu His Gly His Tyr Phe Val Asp Ala Asp Pro Pro Phe
85 90 95

Val Lys Ile Leu Tyr Thr Ala Val Ala Gln Ile Ser Gln Tyr Thr Gly
100 105 110

Ala Phe Gln Phe His Ser Ala Gly Gln Ser Tyr Leu Asn Glu Asp Leu
115 120 125

Glu Pro Glu Phe Pro Tyr Val Ala Leu Arg Val Phe Ser Gly Leu Cys
130 135 140

Ser Val Ala Thr Val Leu Leu Ala Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Thr Gly
145 150 155 160

Val Arg His Leu Ile Ala Leu Phe Gly Ala Phe Leu Ile Ala Leu Glu
165 170 175

Gly Ser Met Ile Thr Gln Ser Arg Phe Phe Met Gln Thr Ala His Val
180 185 190

Val Phe Phe Thr Gly Leu Ala Val Gly Met Ser Lys Thr Ser Asp Leu
195 200 205

Phe Glu Pro Ser Ser Ala Lys Trp Leu Lys His Thr Ala Ala Ala Gly
210 215 220

Leu Gly Val Ala Phe Leu Ile Ser Ser Ala Trp Ser Gly Leu Phe Thr
225 230 235 240

Ala Val Trp Leu Val Leu Val Thr Leu Arg Arg Val Trp Tyr Leu Thr
245 250 255

Gly Asp Val Thr Thr Asn Pro Arg Thr Thr Phe Leu Arg Tyr Ala Leu
260 265 270

Pro Arg Phe Ala Leu Ile Val Ala Ala Pro Val Ala Phe Tyr Leu Trp
275 280 285

Val Phe Lys Val His Leu Asp Leu Leu Pro Val Ala Gly Pro Gly Tyr
290 295 300

Pro Phe Met Ser Ala Glu Phe Gln His Gly Leu Val Gly Thr His Leu
305 310 315 320

Asn Asn Ile Ser Ala Glu Val Ser Tyr Gly Ser Thr Val Ser Ile Arg
325 330 335

His Leu His Thr Gly Lys Tyr Leu His Ser Glu Asn Lys Thr Tyr Pro
340 345 350

Lys Thr Gly His Gln Arg Val Thr Thr Phe Gly Asp Gln Asp Phe Asn
355 360 365

Asn Leu Phe Tyr Val Glu Met Arg Val Lys Ser Glu Arg Gly Glu Leu
370 375 380

Ala Arg Lys Val Lys Ala Val Glu Ser Gly Arg Gln Ile Arg Leu Phe
385 390 395 400

His Asn Ala Thr Gln Lys Tyr Leu Phe Ile Asp Pro Asp Asn Lys Pro
405 410 415

Pro Leu Ser Glu Thr Asp Tyr Asn Lys Glu Val Ser Thr Phe Gly Asn
420 425 430

Ala Ser Trp Val Gly Glu Asn Tyr Leu Asn Phe Glu Leu Leu Leu Ala
435 440 445

Pro Gly Phe Ser Lys Thr Glu Val Gly Lys Lys Arg Val Arg Ala Val
450 455 460

Glu Ser Val Phe Gln Leu Tyr Asn Val Lys Asn Lys Cys Tyr Leu Leu
465 470 475 480

Gly Thr Glu Asn Arg Leu Pro Ser Trp Ala Asp Gly Glu Asn Glu Val
485 490 495

Val Cys Ile Glu Lys Pro Ile Phe Glu Arg Ser Leu Trp Tyr Phe Glu
500 505 510

Thr Asn Leu His Asp Lys Phe Thr Pro Ala Arg Ala Gln Val Ala Phe
515 520 525

Arg Gln Gln Thr Phe Trp Asp Lys Ile Leu Glu Ile His Lys Val Met
530 535 540

Ala Asp Leu Leu Ala Gln Asn Thr His Asp Asp Ala Asn Ser Thr Ala
545 550 555 560

Pro Arg Asp Trp Phe Phe Phe Arg Lys Gly Ile Arg Tyr Trp Ala Glu
565 570 575

Ser Gln Ala Met Val Tyr Leu Thr Gly Asn Pro Val Val Tyr Ser Leu
580 585 590

Thr Ala Leu Gly Thr Val Gly Phe Leu Val Phe Lys Leu Gly His Leu
595 600 605

Cys Ser Phe Asn Pro Asn Lys Ser Pro Asp Tyr Ser Ser Asp Phe Leu
610 615 620

Lys Phe Asp Tyr His Ala Gln Glu Phe Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Asn
625 630 635 640

Trp Leu Pro His Ala Leu Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Val Phe Glu Tyr
645 650 655

Gln Pro Ala Leu Tyr Phe Gly Val Leu Leu Ser Cys Gln Ser Leu Glu
660 665 670

Tyr Leu Ala Ser Lys Asn Leu Lys Leu Cys Tyr Val Phe Ala Ala Ala
675 680 685

Val Ala Leu Leu Thr Ala Ala Phe Phe Arg Leu Ser Ala Pro Leu Met
690 695 700

Tyr Gly Leu Lys Trp Gln Glu Leu Tyr Cys Val Ala Val Ser Thr Ala
705 710 715 720

Ala Arg Gln Ser Ile Asp Cys Ser Val Tyr Ser Glu
725 730

<210> 91
<211> 2241

<212> ADN
<213> *Ogataea minuta*

<400> 91

atgtccgagt cagagctgag aaaccgcaaa gctactctgg gaactgcgtt tcaagatgag	60
tcgactggac cgaaagaaga gagtcaattg gatcaaaaat cgtagccag aagagggtgg	120
gtccaactga tcaccacgta tgttgaacca gtggcaggtc cccttttctt cactgtcctg	180
gctgcgtatc tgagactcta tgatctcaaa gccaacaatc gagtggctctg ggacgaggct	240
cattttggca aatttggagc ccagtacttg agacacgaat tttaccacga cgtccatccg	300
ccgctgggga aaatgctgtg cggactgagc gagtatctgg caggctacaa tggcagttct	360
gagggtttca atttcgagag cggaaaagaa tatccggatc accttgacta tgcctcgatg	420
agatcgttcg ggacttggtt cagcactctg gtcattcctg tctgctattt cacatgcaaa	480
tcgctcaatt tcaacctaca gaccacctat ctagtttoga caatgtgctg tctggagaac	540
tcgtacattg cgctgggaaa gttcactactg ctggactcca tgctgatgtt gttcacgggg	600
actacgtttt tctgtctcgt caaaaccac acgctgcggg cgcaggagtt ctccaccaga	660
tggactcttt ggatgtgtct gaccggagtt tcaactggct gtgtttgctc ggtgaaatgg	720
gtcggctctgt ttgtcacgct acttgttgga gcatacacgg tgctagagct atggctgaaa	780
ttctggtcca aggagttcaa gacagccagg tacttgaaaa gctgggtttt cagagcagtg	840
agtctgatct tcatcccagc tctcgtttat ttgatattct tcaaggatca tttctcgtc	900
ctgacccgga ccgggacggg agcgggctct ttgtcgtctc tttaccaggc cagcatggag	960

5

gacgcggaca tcctggatta cccgagaaac gttgctattg gctcgcgcat cactctcaga 1020
 tctcaaggcc cctcgcccag tcttttgac tcgcaccagt ctgtctatcc cgcaggatcg 1080
 gaacagtacc aggtgacaac ctacgggttc aaagactcca acaacaactt tctggtgaaa 1140
 aaagcccgga cacctttcaa atatggagag ttctgtctcca acggcgacct gattcgactt 1200
 cagcacgagc taacccgagg aaacctccat tctcacgcca tcaacggaca tgtttccaag 1260
 cagttctggg aggtgagcgg gtacggaaac gaggaatcg gggacgaca ggatgattgg 1320
 gaggtgatta ttgcggagca gctcaaatct cctaactcga cctattcagc gctgcacgag 1380
 tcgtccccag aattctaccg cacggtccac cegatctcca ctagcttcaa gttgcgccac 1440
 aaggttttag gctgctacct ggccaccaca gggcactcgt atccgacatg gggctttaaa 1500
 caaggcgagg tgatctgtaa accggcgagg tcgctcttga acccgctgga caaatcgacc 1560
 tgggtggaacg tcgagcttca cgacaacagc ggtctgaaag tagaccagg ctaccaatac 1620
 ccccgctccc ggttcttttg ggactttctc tcgattcaaa tggccatgat ggcctcgaa 1680
 aacgcttttg ttccagaccc gcacaaacag gacgatatag cctccagttg gtgggagtgg 1740
 ccgacgttga aacaggggct gaggatgtgc tcttggtctc acgggggtgt gcggtactac 1800
 ctcttgggaa atccgttttc tacgtggttc agcacttttt gcattggcgc tctgtggtg 1860
 ctgatggctc gctggacgct cctctggcaa agacagatcc tcgttctcac cgaaaaccag 1920
 gcctggactt taaccatgaa agccgttgtt ccgctcatgg ggtgggcttt ccactacctt 1980
 ccattcgtcg tgatgggaag ggtgacgtat taccaccatt acatgccggc tttgtacttt 2040
 gctttcttcg tgacgggctt tgtagtcgaa cattcggtcg ctcgtttcgg aggggtttac 2100
 acgggaaagt tggctatctt agtactttgg ggctgtgtgt gctacagctt ctggctgttc 2160
 agtccgcttt gtttggggat gcacggaatg acgtcgtct atcgtcatct caactgggtt 2220
 tccacctggc gtatagctta g 2241

<210> 92
 <211> 746
 <212> PRT
 <213> *Ogataea minuta*

5

<400> 92
 Met Ser Glu Ser Glu Leu Arg Asn Arg Lys Ala Thr Leu Gly Thr Ala
 1 5 10 15

Phe Gln Asp Glu Ser Thr Gly Pro Lys Glu Glu Ser His Leu Asp Gln
 20 25 30

Lys Ser Leu Ala Arg Arg Gly Trp Val Gln Leu Ile Thr Thr Tyr Val
 35 40 45

Glu Pro Val Ala Gly Pro Leu Phe Phe Thr Val Leu Ala Ala Tyr Leu
 50 55 60

Arg Leu Tyr Asp Leu Lys Ala Asn Asn Arg Val Val Trp Asp Glu Ala
 65 70 75 80

His Phe Gly Lys Phe Gly Ala Gln Tyr Leu Arg His Glu Phe Tyr His
 85 90 95

Asp Val His Pro Pro Leu Gly Lys Met Leu Cys Gly Leu Ser Glu Tyr
 100 105 110

Leu Ala Gly Tyr Asn Gly Ser Ser Glu Gly Phe Asn Phe Glu Ser Gly
 115 120 125

Lys Glu Tyr Pro Asp His Leu Asp Tyr Ala Ser Met Arg Ser Phe Gly
130 135 140

Thr Trp Phe Ser Thr Leu Val Ile Pro Val Cys Tyr Phe Thr Cys Lys
145 150 155 160

Ser Leu Asn Phe Asn Leu Gln Thr Thr Tyr Leu Val Ser Thr Met Cys
165 170 175

Cys Leu Glu Asn Ser Tyr Ile Ala Leu Gly Lys Phe Ile Leu Leu Asp
180 185 190

Ser Met Leu Met Leu Phe Thr Gly Thr Thr Phe Phe Cys Leu Val Lys
195 200 205

Thr His Thr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Ser Thr Arg Trp Thr Leu Trp
210 215 220

Met Cys Leu Thr Gly Val Ser Thr Gly Cys Val Cys Ser Val Lys Trp
225 230 235 240

Val Gly Leu Phe Val Thr Leu Leu Val Gly Ala Tyr Thr Val Leu Glu
245 250 255

Leu Trp Leu Lys Phe Trp Ser Lys Glu Phe Lys Thr Ala Arg Tyr Leu
260 265 270

Lys Ser Trp Val Phe Arg Ala Val Ser Leu Ile Phe Ile Pro Ala Leu
275 280 285

Val Tyr Leu Ile Phe Phe Lys Val His Phe Ser Leu Leu Thr Arg Thr
290 295 300

Gly Thr Gly Ala Gly Ser Leu Ser Ser Leu Tyr Gln Ala Ser Met Glu
 305 310 315 320

Asp Ala Asp Ile Leu Asp Tyr Pro Arg Asn Val Ala Ile Gly Ser Arg
 325 330 335

Ile Thr Leu Arg Ser Gln Gly Pro Ser Pro Ser Leu Leu His Ser His
 340 345 350

Gln Ser Val Tyr Pro Ala Gly Ser Glu Gln Tyr Gln Val Thr Thr Tyr
 355 360 365

Gly Phe Lys Asp Ser Asn Asn Asn Phe Leu Val Lys Lys Ala Arg Thr
 370 375 380

Pro Phe Lys Tyr Gly Glu Phe Val Ser Asn Gly Asp Leu Ile Arg Leu
 385 390 395 400

Gln His Glu Leu Thr Arg Gly Asn Leu His Ser His Ala Ile Asn Gly
 405 410 415

His Val Ser Lys Gln Phe Trp Glu Val Ser Gly Tyr Gly Asn Glu Glu
 420 425 430

Ile Gly Asp Asp Lys Asp Asp Trp Glu Val Ile Ile Ala Glu Gln Leu
 435 440 445

Lys Ser Pro Asn Ser Thr Tyr Ser Ala Leu His Glu Ser Ser Pro Glu
 450 455 460

Phe Tyr Arg Thr Val His Pro Ile Ser Thr Ser Phe Lys Leu Arg His
465 470 475 480

Lys Val Leu Gly Cys Tyr Leu Ala Thr Thr Gly His Ser Tyr Pro Thr
485 490 495

Trp Gly Phe Lys Gln Gly Glu Val Ile Cys Lys Pro Ala Glu Ser Leu
500 505 510

Leu Asn Pro Leu Asp Lys Ser Thr Trp Trp Asn Val Glu Leu His Asp
515 520 525

Asn Ser Gly Leu Lys Val Asp Pro Gly Tyr Gln Tyr Pro Arg Pro Arg
530 535 540

Phe Phe Trp Asp Phe Leu Ser Ile Gln Met Ala Met Met Ala Ser Asn
545 550 555 560

Asn Ala Leu Val Pro Asp Pro His Lys Gln Asp Asp Ile Ala Ser Ser
565 570 575

Trp Trp Glu Trp Pro Thr Leu Lys Gln Gly Leu Arg Met Cys Ser Trp
580 585 590

Ser His Gly Val Val Arg Tyr Tyr Leu Leu Gly Asn Pro Phe Ser Thr
595 600 605

Trp Phe Ser Thr Phe Cys Ile Gly Ala Leu Leu Val Leu Met Ala Arg
610 615 620

Trp Thr Leu Leu Trp Gln Arg Gln Ile Leu Val Leu Thr Glu Asn Gln
625 630 635 640

Ala Trp Thr Leu Thr Met Lys Ala Val Val Pro Leu Met Gly Trp Ala
645 650 655

Phe His Tyr Leu Pro Phe Val Val Met Gly Arg Val Thr Tyr Tyr His
660 665 670

His Tyr Met Pro Ala Leu Tyr Phe Ala Phe Phe Val Thr Gly Phe Val
675 680 685

Val Glu His Ser Val Ala Arg Phe Gly Gly Val Tyr Thr Gly Lys Leu
690 695 700

Val Tyr Leu Val Leu Trp Gly Cys Val Cys Tyr Ser Phe Trp Leu Phe
705 710 715 720

Ser Pro Leu Cys Leu Gly Met His Gly Met Thr Ser Leu Tyr Arg His
725 730 735

Leu Asn Trp Val Ser Thr Trp Arg Ile Ala
740 745

<210> 93
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> cebador

10

<400> 93
caagcttgga cctacaacac gtccgaagaa

30

<210> 94
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

15

<220>
<223> cebador

20

<400> 94
cggtaccggt ttgatacctt ggggtggcaca

30

<210> 95
<211> 31
<212> ADN

25

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 95 gaagcttact acataattcg tgtacgtgtt c	31
	<210> 96	
10	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 96 cggtagcgtc gccgtattgg tcagcaatct c	31
20	<210> 97	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 97 gtcatgagat ccaagctgat ccctcaatgg agatctact	39
30	<210> 98	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 98 ggtgtgtggg ggatcgggat gcaaatggat ggctcgaac	39
40	<210> 99	
	<211> 39	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 99 gacggatcgc ataagcttga tgcgcggcct tccgacctt	39
	<210> 100	
	<211> 39	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
60	<400> 100 ctggggaagc tcggatccgg ctcgagggtct tcgttcaga	39
	<210> 101	
65	<211> 38	
	<212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 101 ctagttctag agcggcccag gtcgcttca ggcagcag	38
	<210> 102	
10	<211> 40 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 102 caccgcggtg gcggccaagc ttgggtaccg gctcgcgtag	40
20	<210> 103 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 103 gcagcccggg ggatccacga aaccacgtcc tact	34
30	<210> 104 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
40	<400> 104 ggggaagctc ggatcgactc atcttgaaac gca	33
	<210> 105 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 105 agttctagag cggccttacc accattacat gcc	33
	<210> 106 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador	
60	<400> 106 aattggagct ccaccgcggc cgcaacttac tcgacgctaa	40
	<210> 107 <211> 25 <212> ADN	
65		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 107 gaacggcact ggtcaacttg gccat	25
	<210> 108	
10	<211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 108 cttcgtggcc gaggagcagg actga	25
20	<210> 109 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador	
	<400> 109 gaattctagc cgagcatgag cta	23
30	<210> 110 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
	<400> 110 cgttcagact ctgttgatt ttccac	26
40	<210> 111 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 111 gctgtgccac tgcacgcctc gactc	25
	<210> 112 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador	
60	<400> 112 cttgtccctc ttgaatggcg agtg	24
	<210> 113 <211> 20 <212> ADN	
65		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 113 ggaacacgcc aaacatcatg	20
	<210> 114	
10	<211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 114 cacaagcaga atcaggcac	19
20	<210> 115 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador	
	<400> 115 cggtgacgac ttcgactagt cgag	24
30	<210> 116 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 116 cggtgctgtt ggcgtcgtca tgggtg	26
	<210> 117 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 117 ggcgcgttcc aattccactc tgctg	25
	<210> 118 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador	
60	<400> 118 cgacgagtcc tctcaccagg aggttg	26
	<210> 119 <211> 18 <212> ADN	
65		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 119 tgtgggtgcg atcctgag	18
10	<210> 120 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 120 gccgtcgttg gagcaaaact	20
25	<210> 121 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 121 gcatgtgcca ctgctaaa	18
40	<210> 122 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 122 gaccaacttt cccgtgtaa	19

REIVINDICACIONES

1. Célula huésped de levadura transformada que comprende un ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura y un gen de RBP1 de humano o perro, en la que la célula huésped transformada comprende un gen que codifica para una proteína heteromultimérica foránea, en la que la proteína heteromultimérica es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.
2. Célula huésped transformada según la reivindicación 1, que comprende dicho ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura seleccionado de (a) o (b) a continuación:
 - (a) un gen que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23;
 - (b) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la respuesta de proteínas desplegadas (UPR), en la que varios aminoácidos son 20 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, y más preferiblemente 5 o menos.
3. Célula transformada según la reivindicación 1, que comprende dicho ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura seleccionado de (i) o (j) a continuación:
 - (i) un gen que codifica para la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae* o *Trichoderma reesei*,
 - (j) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae* o *Trichoderma reesei* mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR, en la que varios aminoácidos son 20 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, y más preferiblemente 5 o menos.
4. Célula huésped transformada según la reivindicación 1, que comprende dicho ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura seleccionado de (m) o (n) a continuación:
 - (m) un gen que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70;
 - (n) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR, en la que varios aminoácidos son 20 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, y más preferiblemente 5 o menos.
5. Célula huésped transformada según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la levadura es una levadura asimiladora de metanol.
6. Célula huésped transformada según la reivindicación 5, en la que la levadura asimiladora de metanol es *Ogataea minuta*.
7. Célula huésped transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
8. Célula huésped transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el gen de PMT (proteína O-manosiltransferasa) está inactivado mediante inserción.
9. Método para producir una proteína que comprende cultivar la célula huésped transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en un medio y tomar una muestra de la proteína heteromultimérica del producto de cultivo.
10. Método según la reivindicación 9, en el que cultivo se lleva a cabo en condiciones en las que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT).
11. Método según la reivindicación 10, en el que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) con la adición de un inhibidor de la actividad PMT al medio.
12. Método según la reivindicación 10, en el que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT)

inactivando mediante inserción el gen de PMT en la célula huésped.

13. Método para producir una proteína según la reivindicación 10, en el que se inhibe la síntesis de cadena de O-azúcar inactivando mediante inserción el gen de PMT y añadiendo el inhibidor de la actividad PMT al medio.

14. Método para producir una proteína según la reivindicación 11 ó 13, en el que el inhibidor de la actividad PMT es ácido 5-[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metilén]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinacético o ácido {(5Z)-4-oxo-5-3-(1-feniletoxi)-4-(2-feniletoxi)benciliden]-2-tioxo-1,3-tiazolidin-3-il}acético.

15. Método para producir una célula huésped de levadura transformada que comprende las etapas de:

(A) introducir un ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura en una célula huésped de levadura; y

(B) introducir el gen de RRP1 en una célula huésped de levadura, en el que dicho ADNc que codifica para la proteína HAC1 activada de levadura es cualquiera de los siguientes genes (1), (2) o (3):

(1) el gen seleccionado de (a) o (b) a continuación:

(a) un gen que codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23;

(b) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR, en el que varios aminoácidos son 20 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, y más preferiblemente 5 o menos;

(2) un gen que codifica para la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae* o *Trichoderma reesei*;

(3) un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína HAC1 activada de *Saccharomyces cerevisiae* o *Trichoderma reesei* mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y tiene la función de activar la UPR, en el que varios aminoácidos son 20 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7 o menos, y más preferiblemente 5 o menos;

y en el que el gen de RRP1 es un gen que codifica para la RRP1 de humano o perro, y

en el que la célula huésped transformada comprende un gen que codifica para una proteína heteromultimérica foránea introducido en la misma, en el que la proteína heteromultimérica es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

16. Método según la reivindicación 15, en el que la levadura es una levadura asimiladora de metanol.

17. Método según la reivindicación 16, en el que la levadura asimiladora de metanol es *Ogataea minuta*.

18. Método según la reivindicación 15, en el que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

Fig. 1

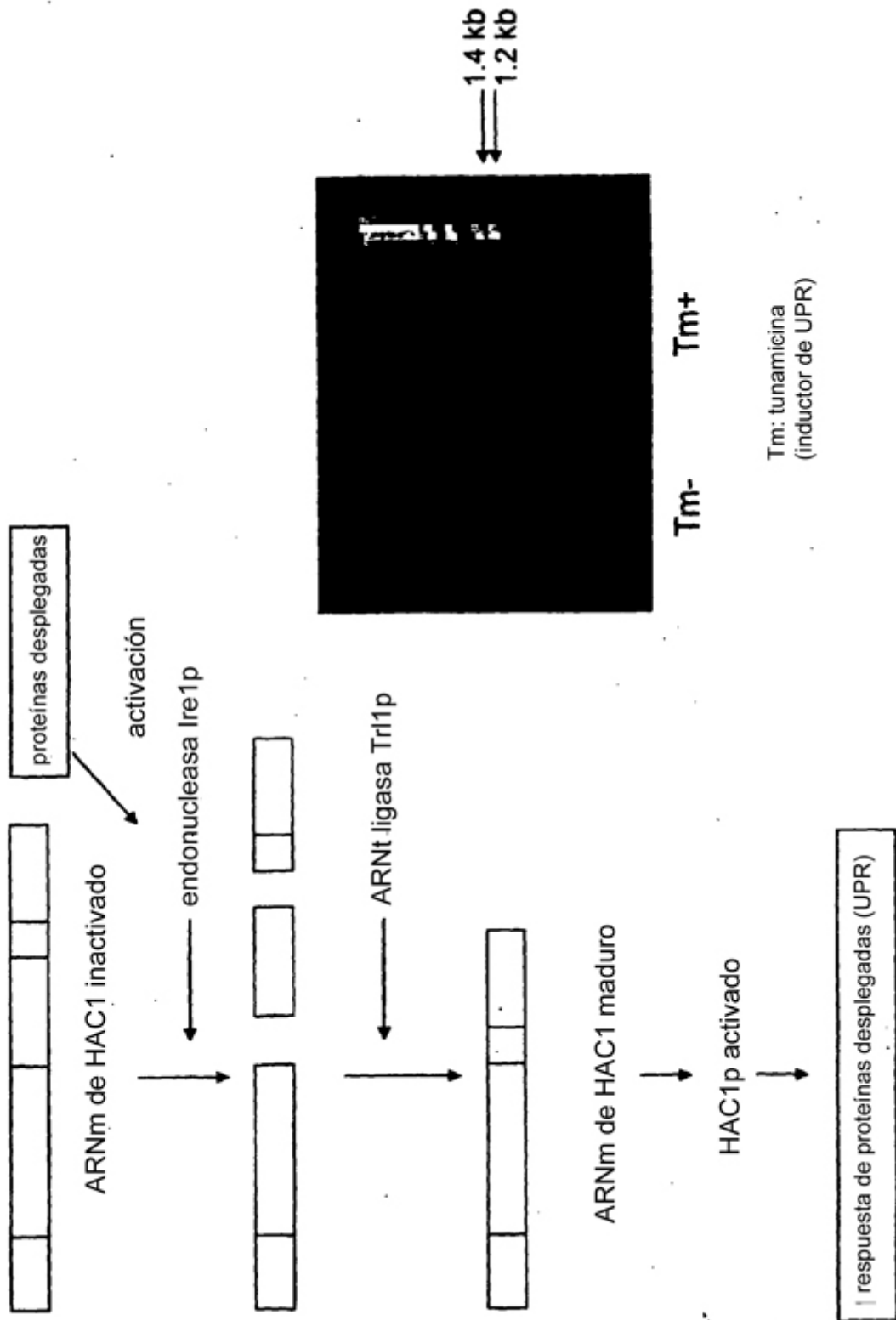


Fig. 2

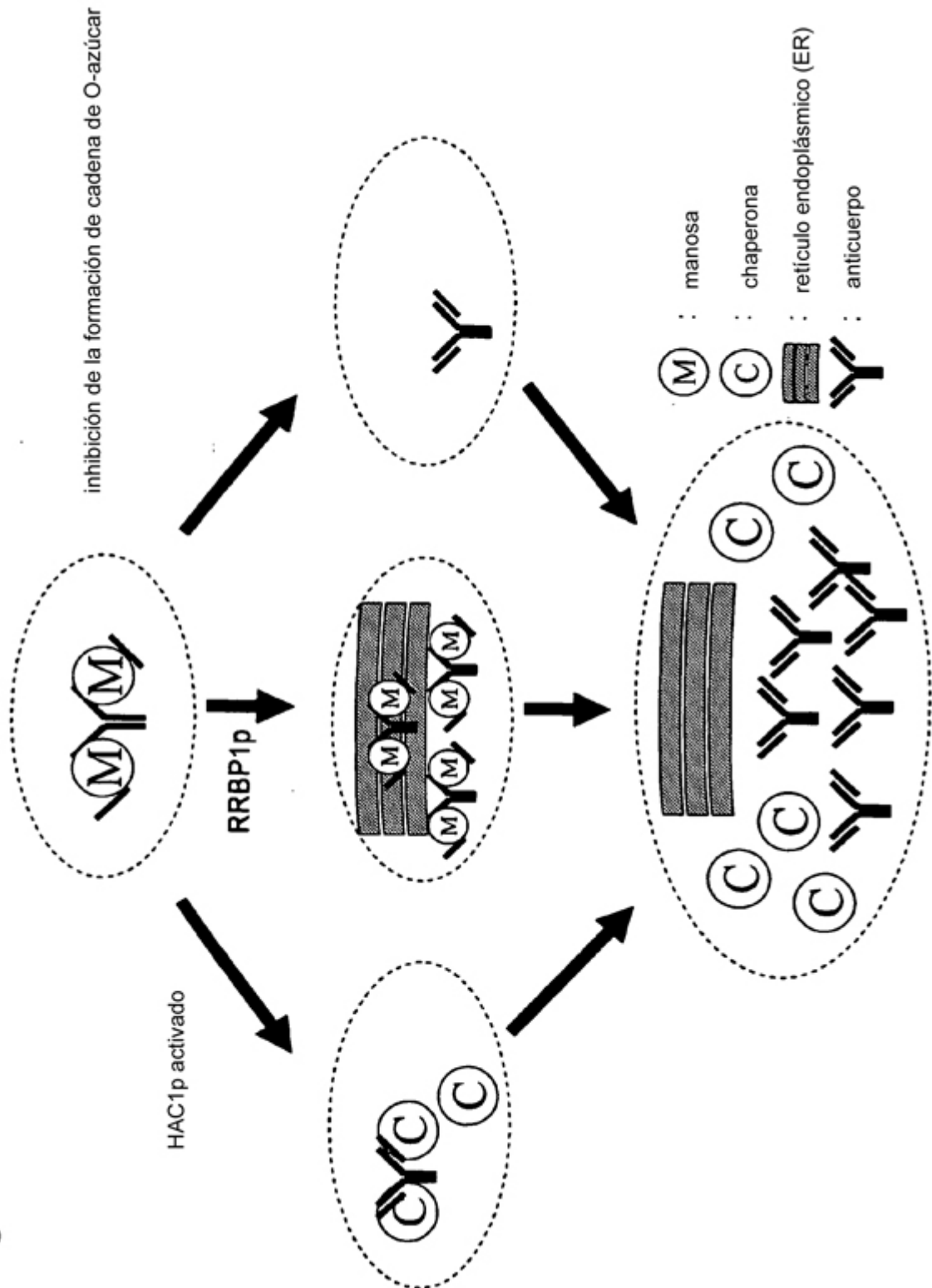


Fig. 3

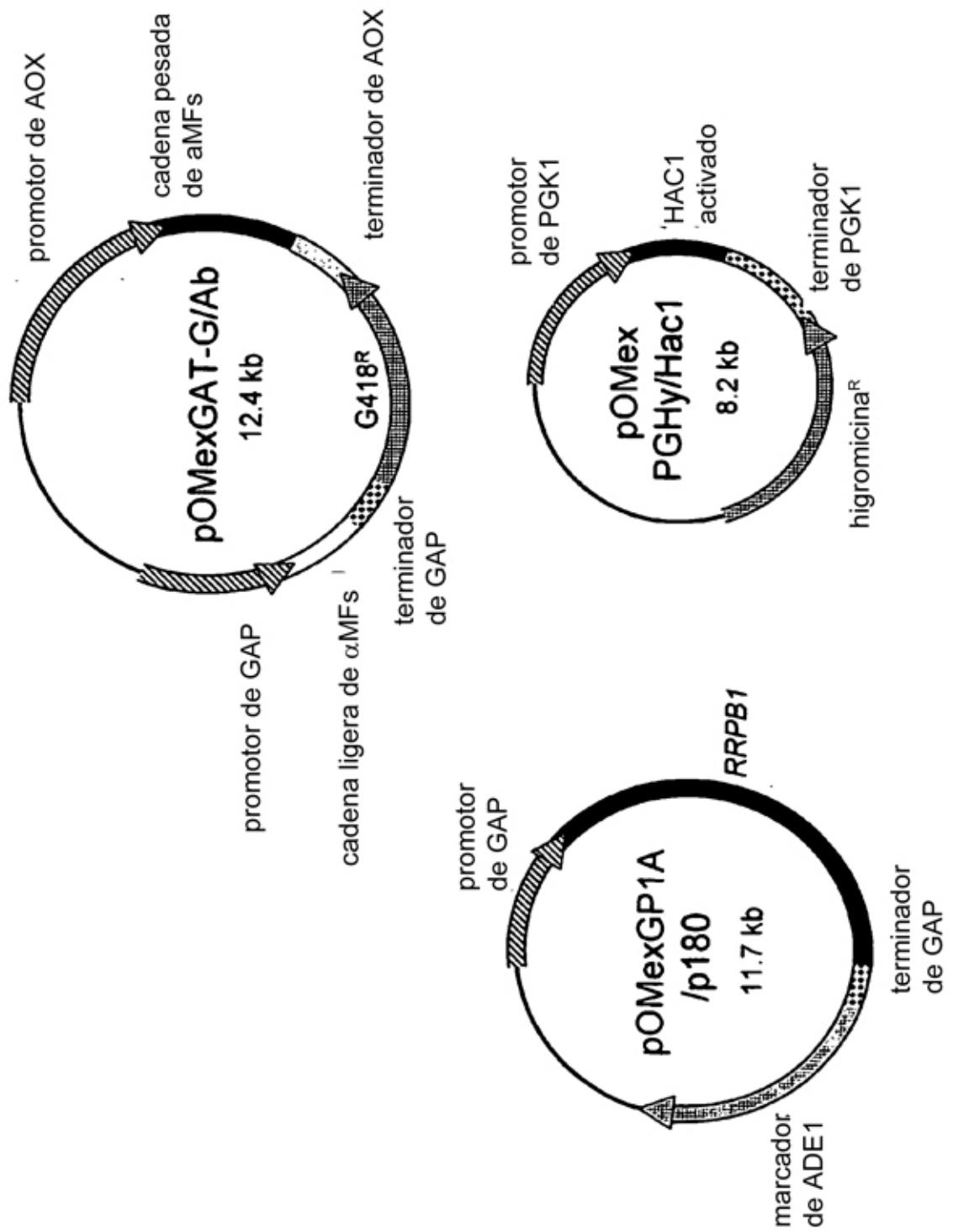


Fig. 4

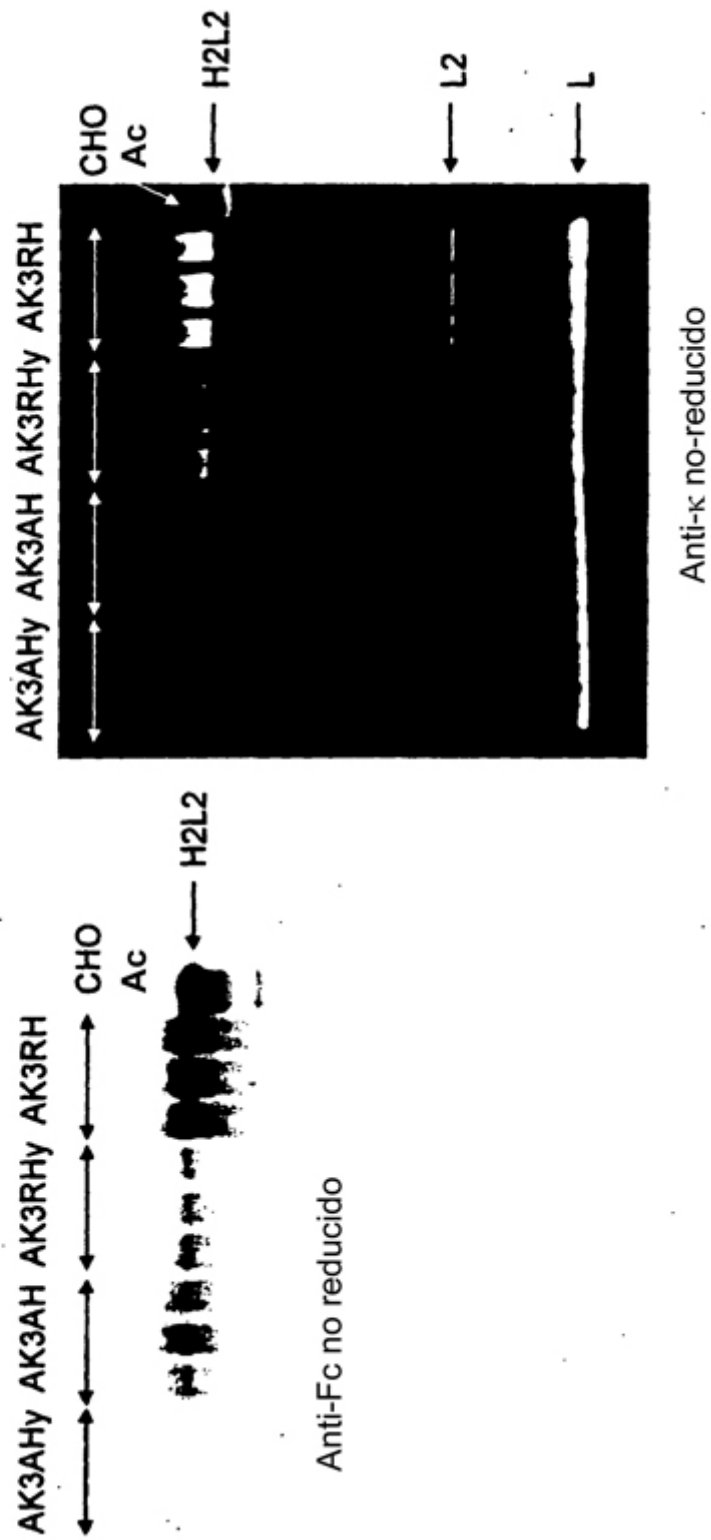


Fig. 5

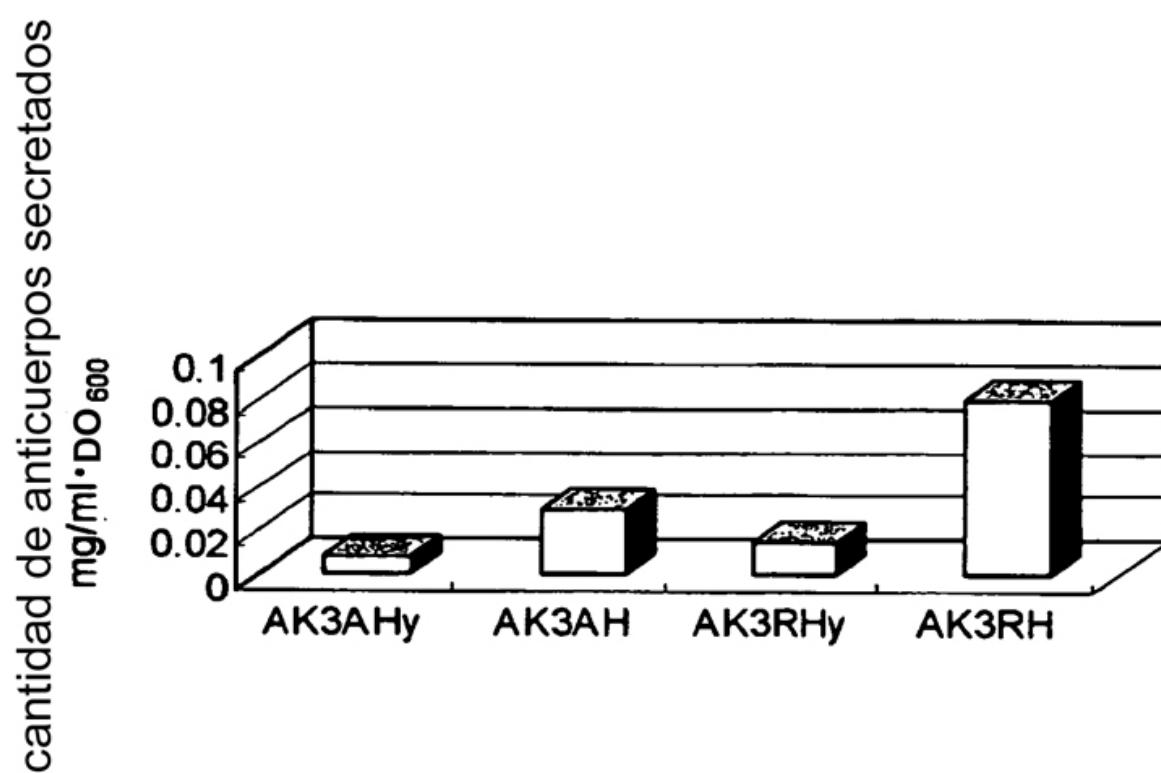


Fig. 7

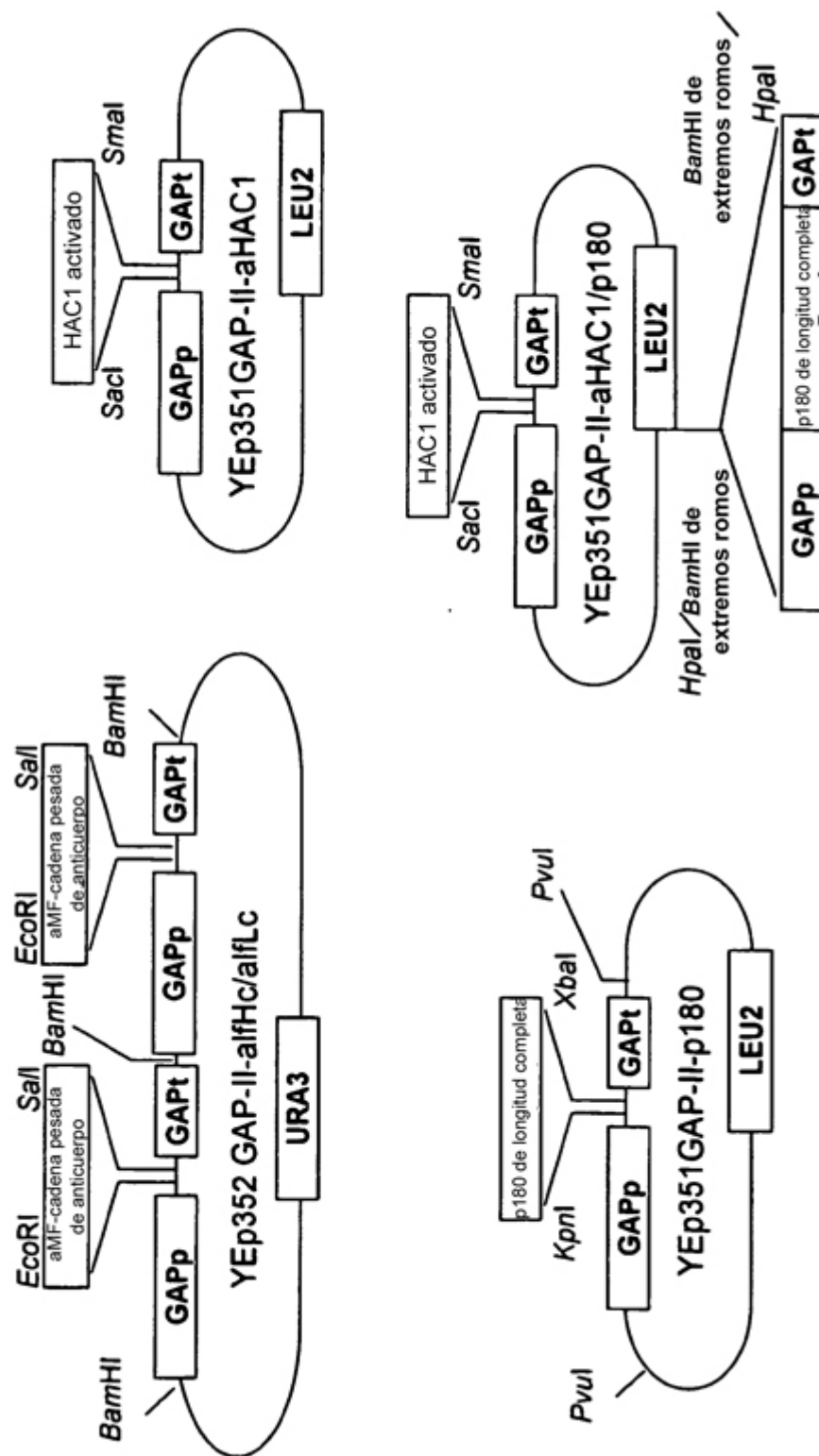
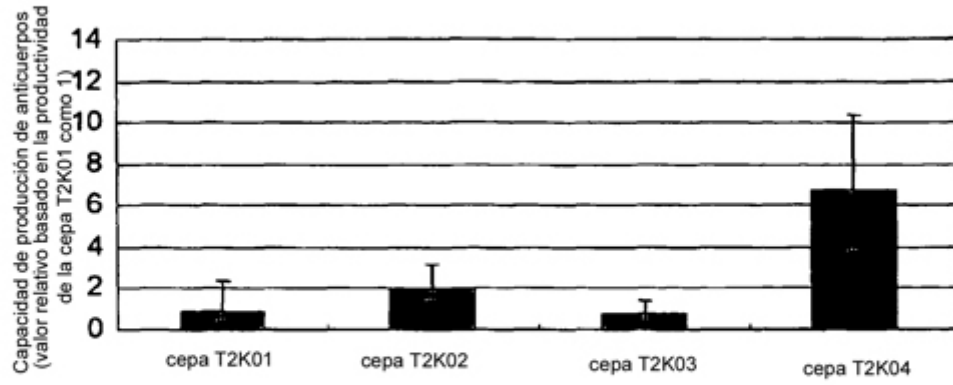
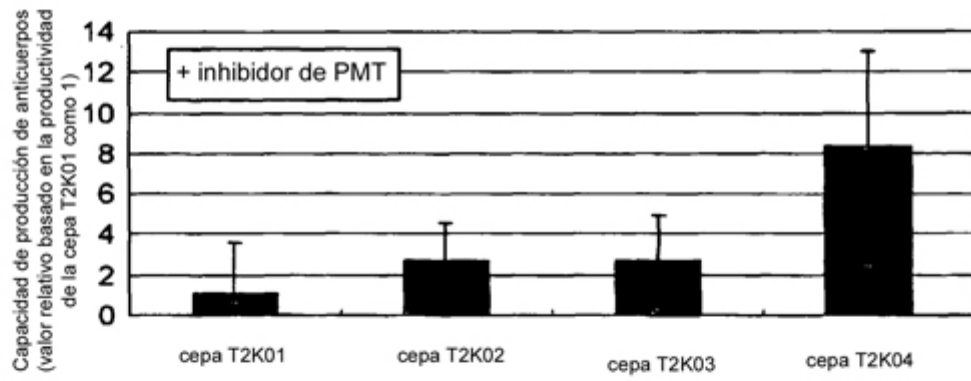


Fig. 8

A



B



C

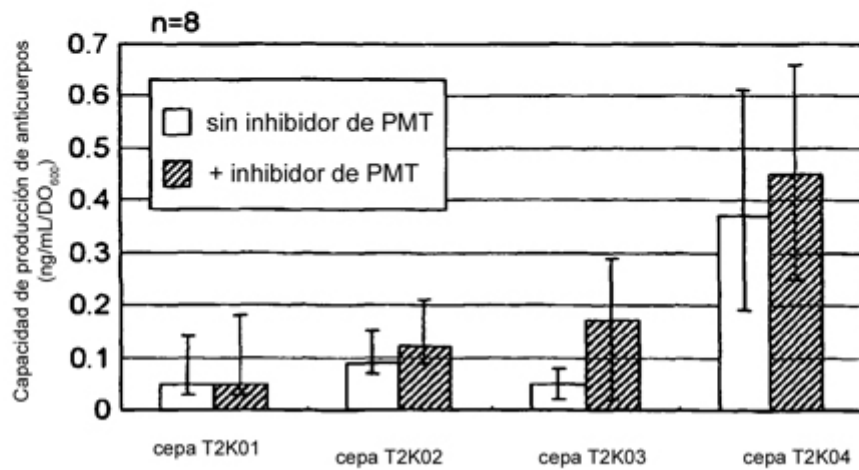


Fig. 9

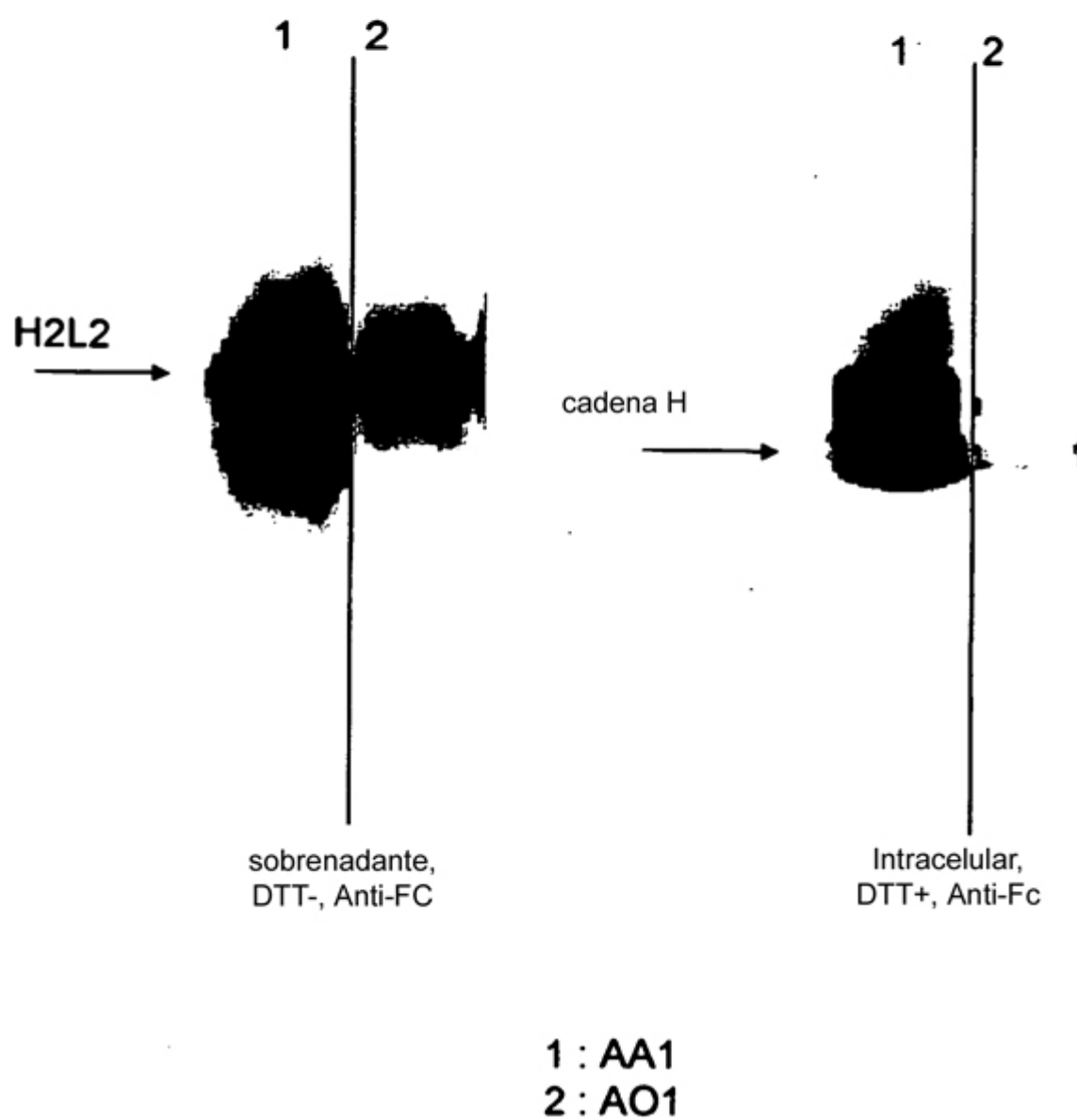


Fig. 10

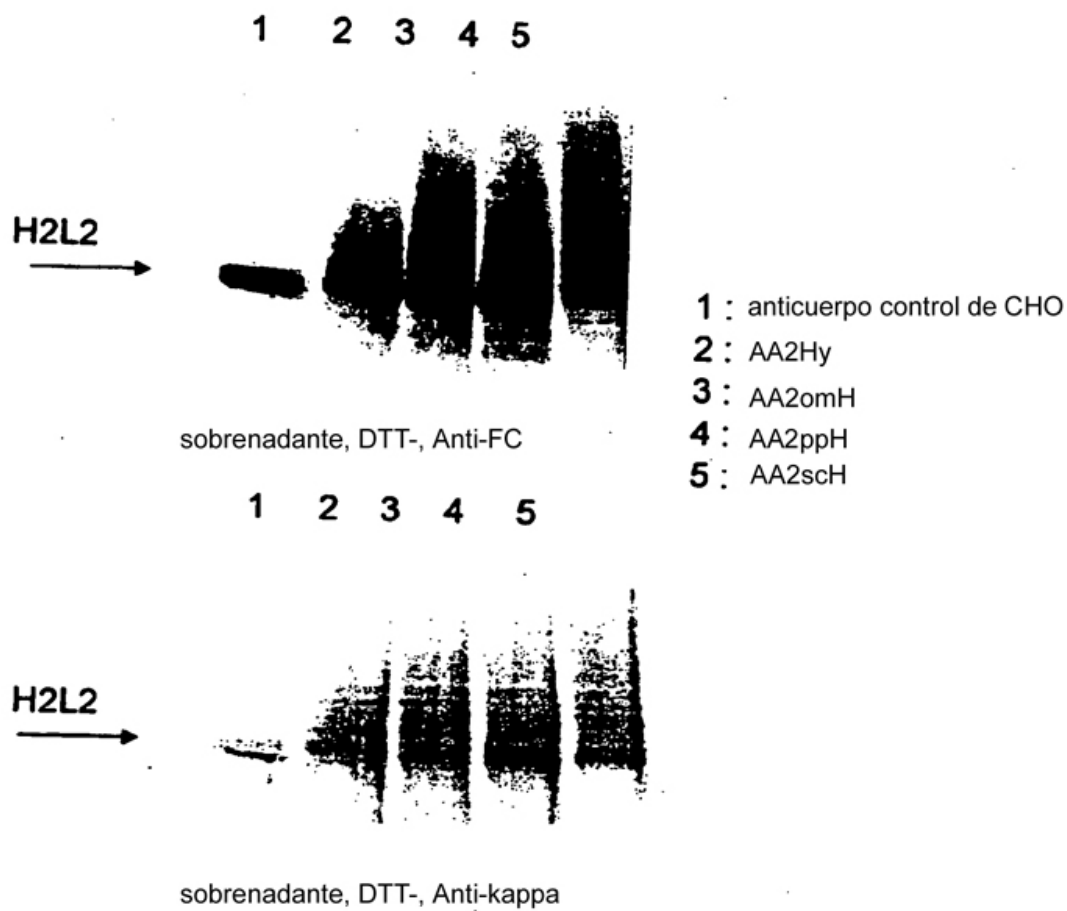


Fig. 11

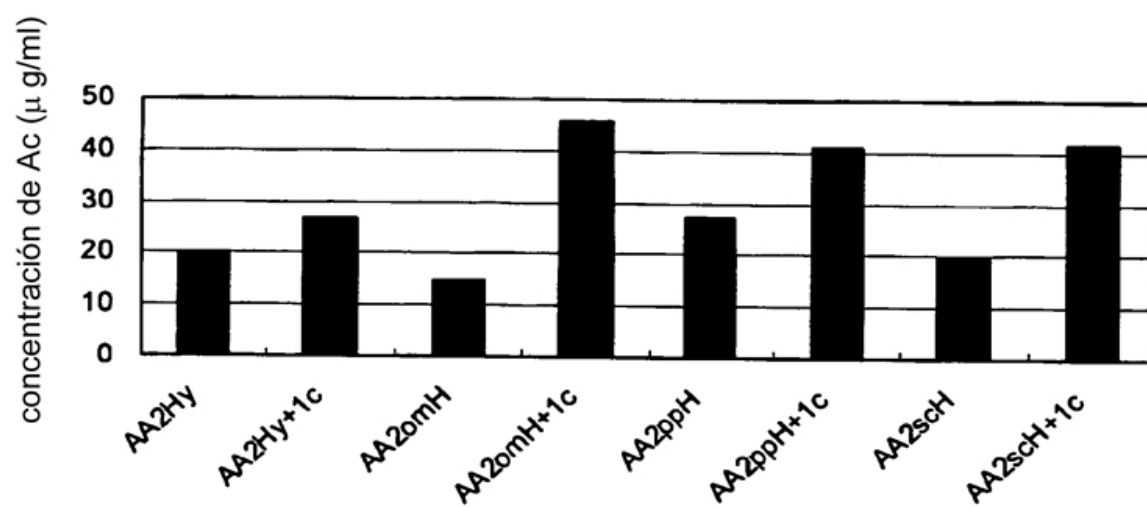


Fig. 12

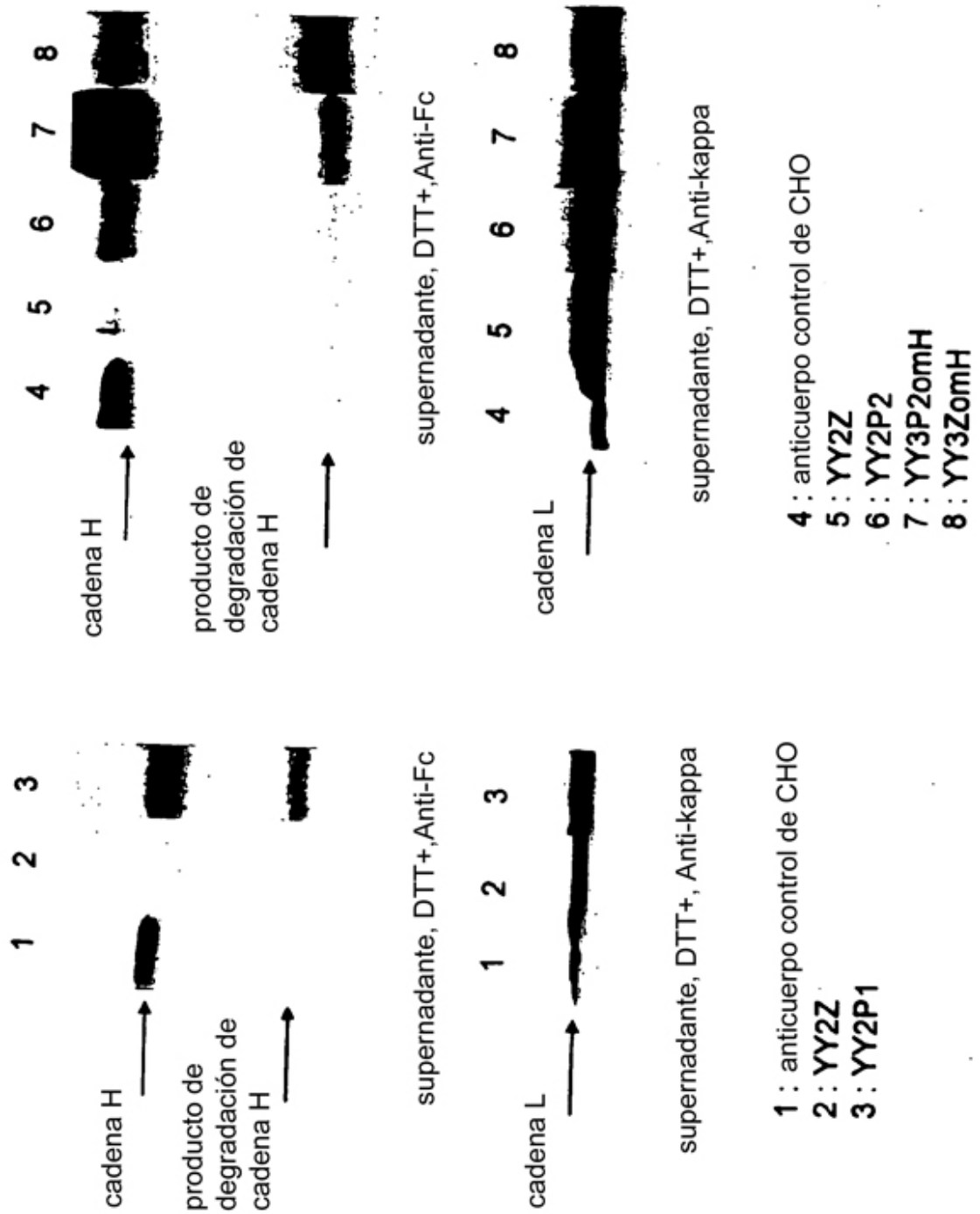


Fig. 13

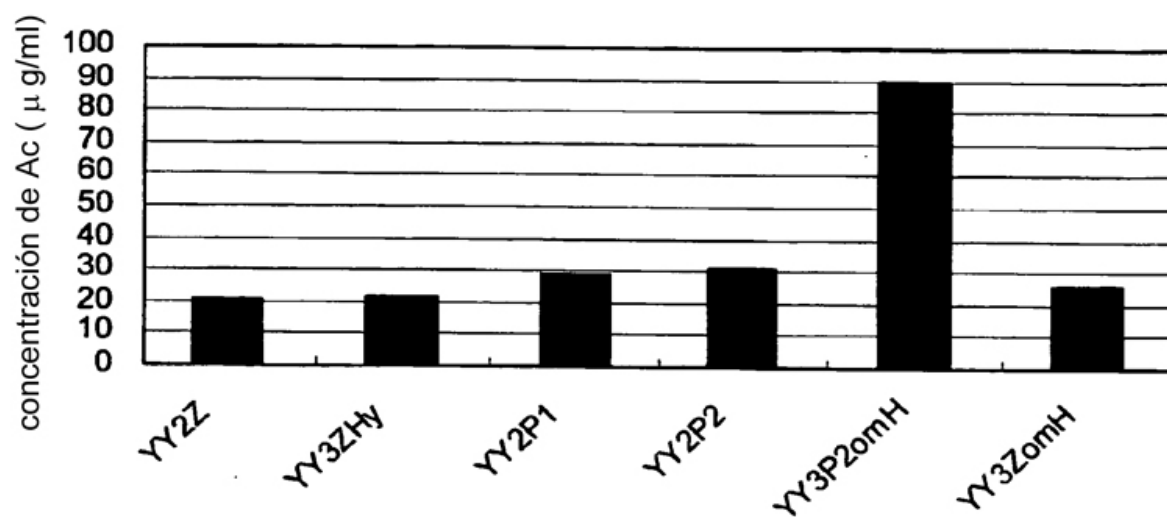


Fig. 14

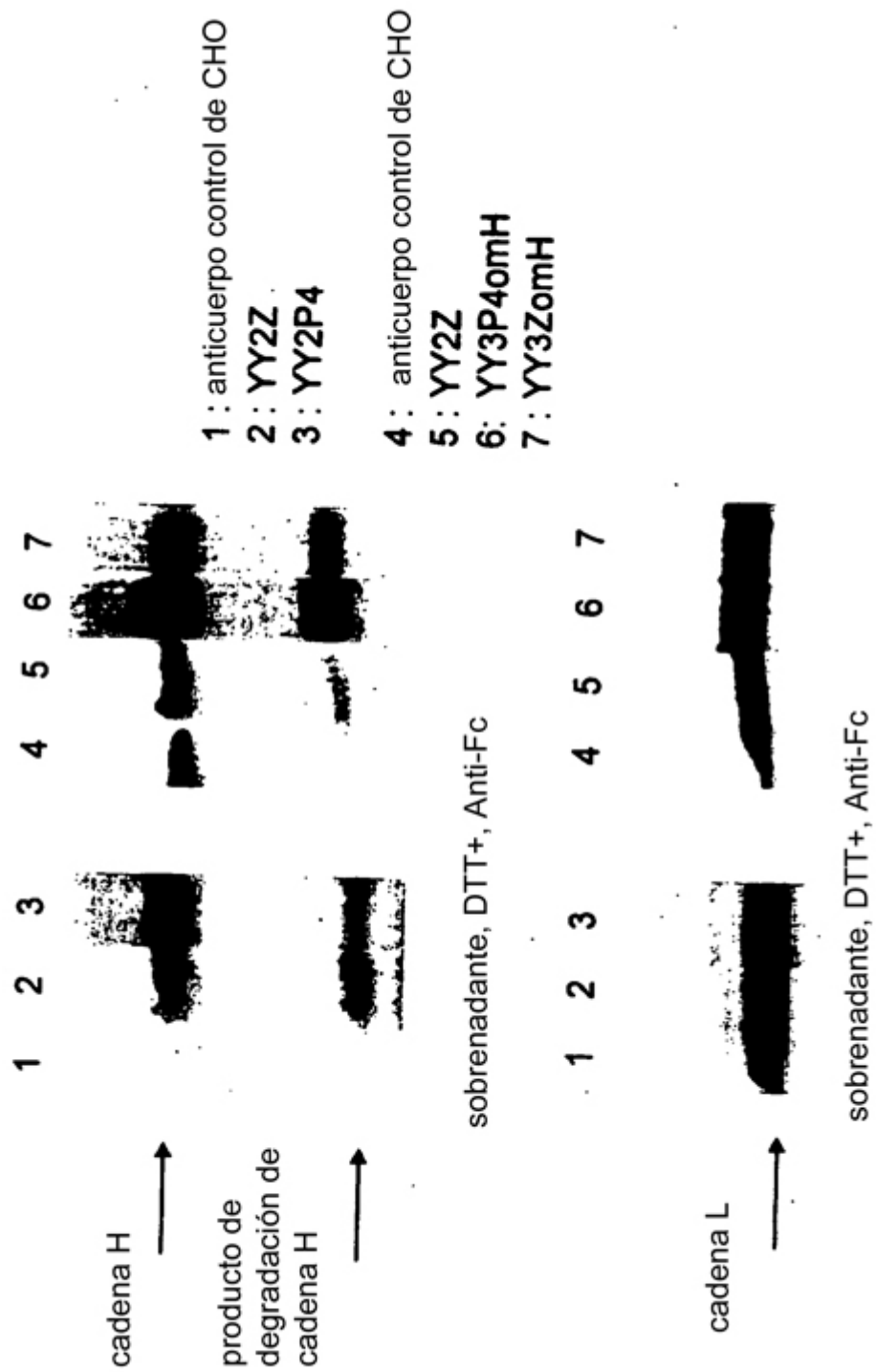


Fig. 15

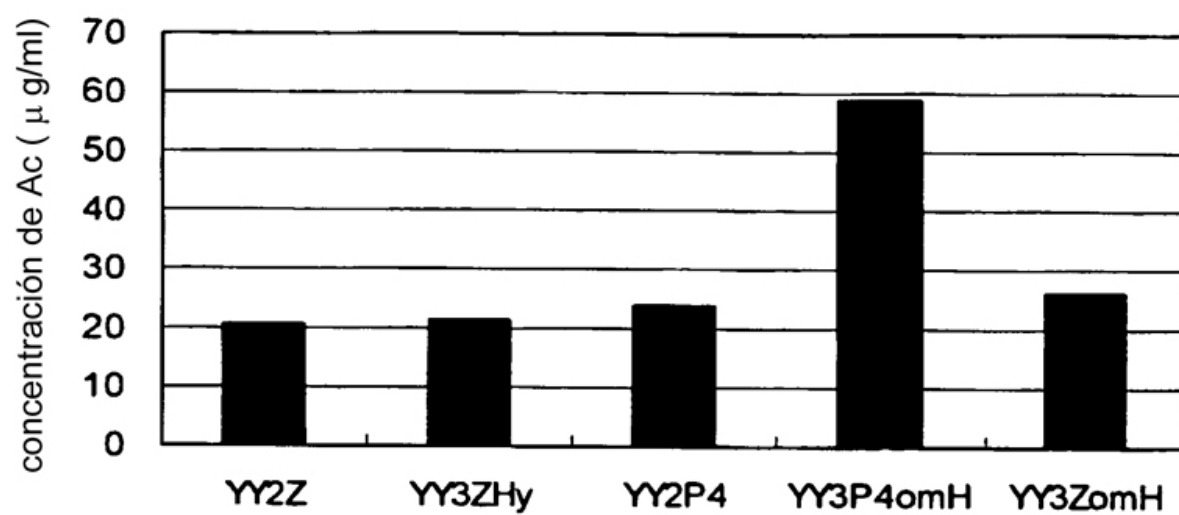


Fig. 16

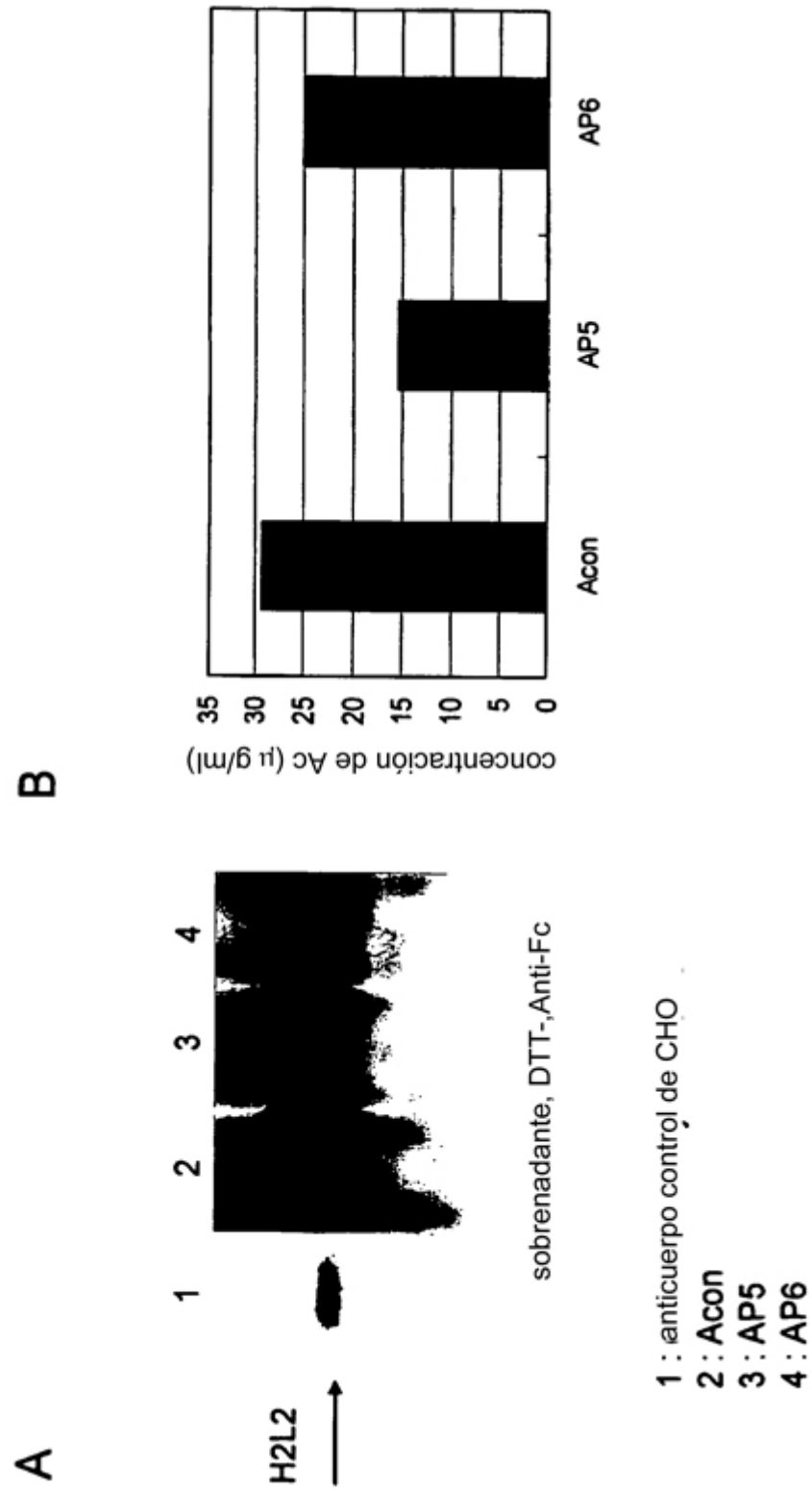


Fig. 17

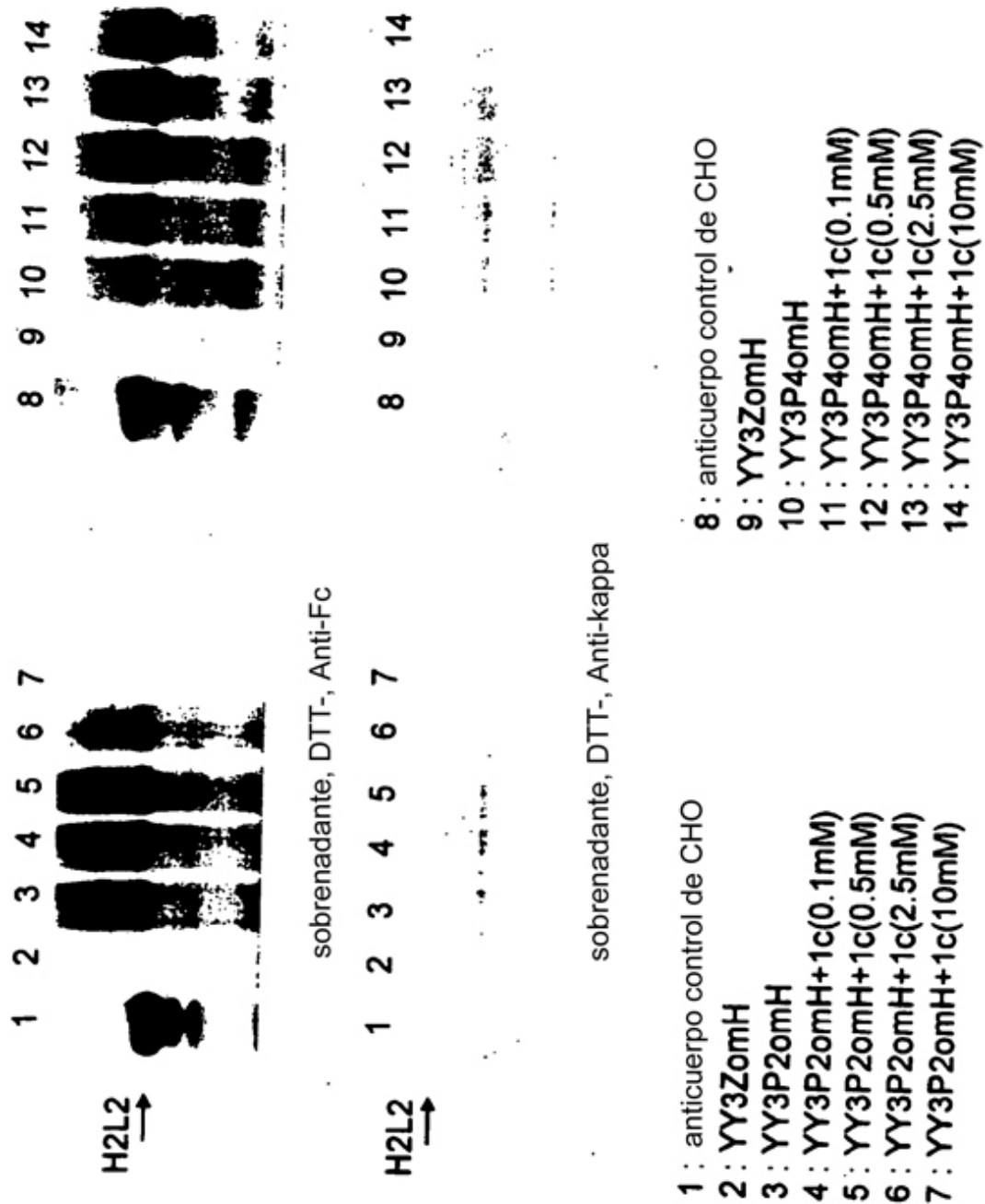


Fig. 18

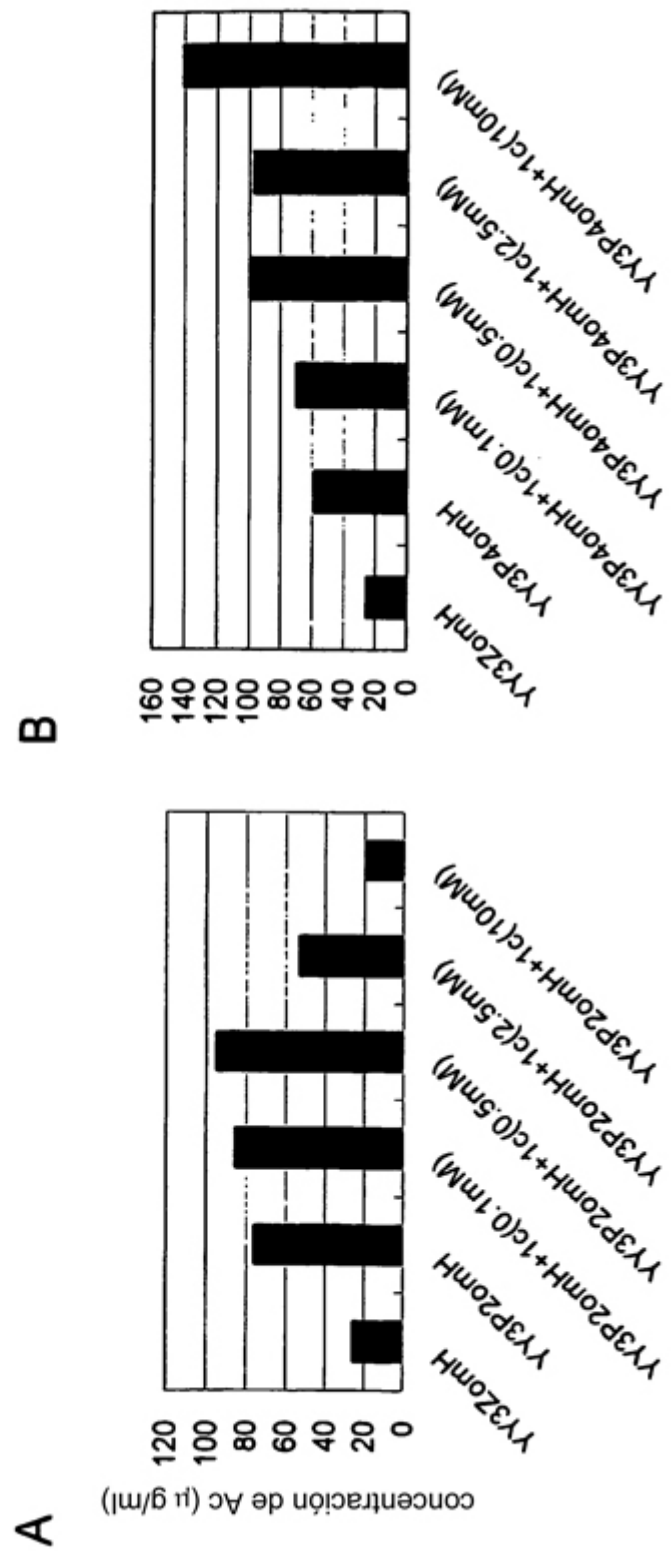


Fig. 19

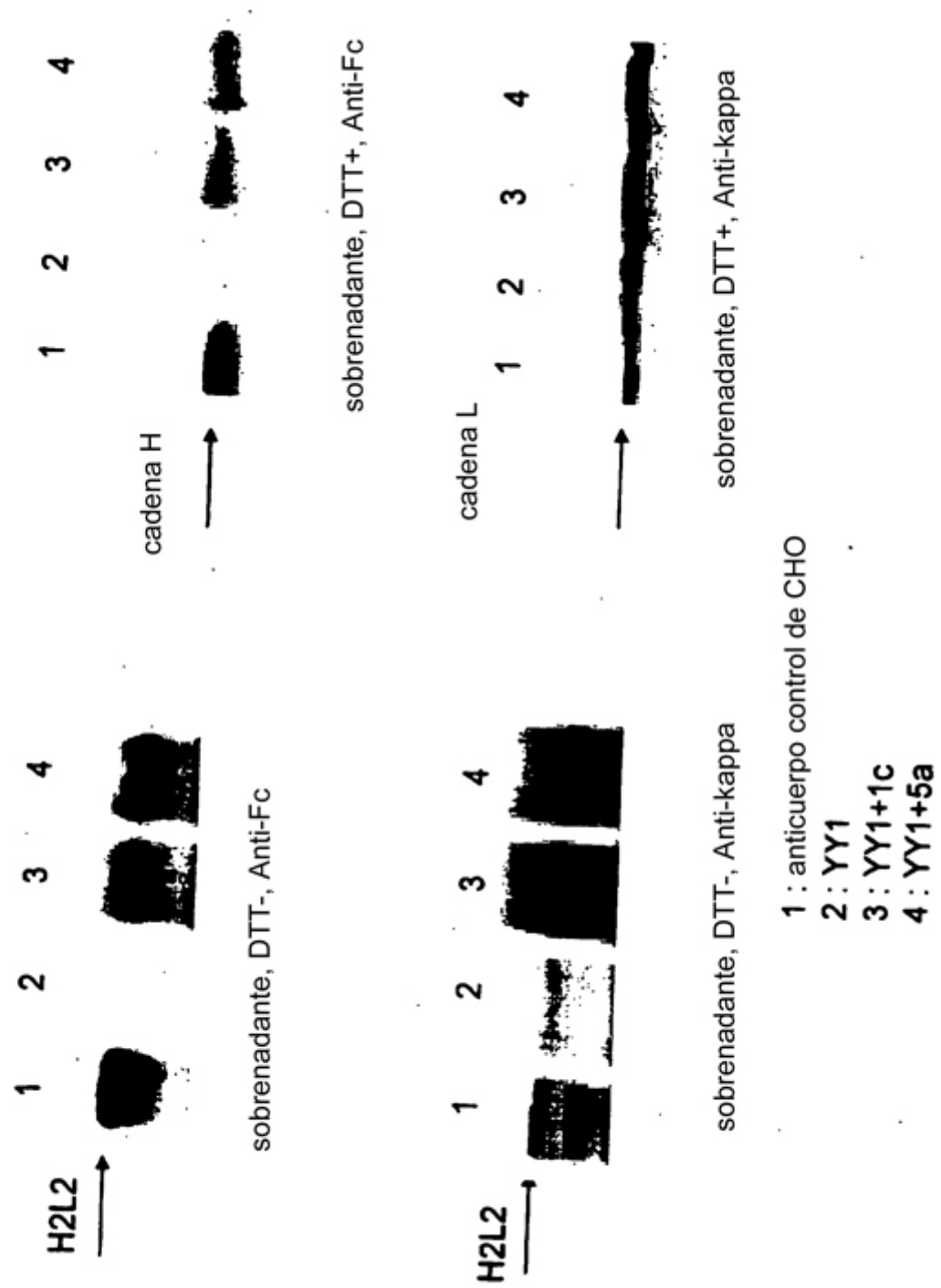


Fig. 20

