(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 279 280**

(51) Int. Cl.:
***C12P 21/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **04027280 .9**
(86) Fecha de presentación : **17.11.2004**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1666602**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

(54) Título: **Procedimiento para la preparación de una proteína heteróloga bajo la utilización de células huésped de una clase de levaduras.**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**16.08.2007**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**16.08.2007**

(73) Titular/es: **Artes Biotechnology GmbH**
**Agnesstrasse 8**
**45136 Essen, DE**
**RHEIN BIOTECH GESELLSCHAFT FÜR NEUE BIOTECHNOLOGISCHE PROZESSE UND PRODUKTE mbH**

(72) Inventor/es: **Gellissen, Gerd;**
**Klabunde, Jens;**
**Hollenberg, Cornelis y**
**Degelmann, Adelheid**

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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).



Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de una proteína heteróloga bajo la utilización de células huésped de una clase de levaduras.

La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una proteína heteróloga, según el cual se preparan células huésped de una clase de levaduras, las cuales contienen respectivamente al menos una secuencia del ADN recombinante que codifica la proteína heteróloga, después se inducen las células huésped a una expresión y secreción de la proteína heteróloga y se separa la proteína heteróloga segregada.

Procedimientos del tipo mencionado al comienzo se conocen, por ejemplo, a partir de las publicaciones WO 00/68400 A1. La obtención de proteínas que se utilizan, por ejemplo, como compuestos activos en medicamentos, con ayuda de tecnologías de ADN recombinante tiene la ventaja, entre otras, de que las proteínas se pueden poner a disposición prácticamente en cantidad ilimitada en huéspedes bien caracterizados. Para la obtención de proteínas recombinantes es ventajoso que la proteína expresada en cada caso se segregue de manera que se pueda conseguir a continuación a partir del material celular sobrenadante. Esto simplifica en gran medida la preparación, puesto que la proteína se presenta ya en forma relativamente pura y se pueden evitar etapas de purificación complejas. Frecuentemente se utilizan levaduras para obtener proteínas secretoras a gran escala. Éstas tienen la ventaja de que se pueden mantener en cultivos celulares de forma relativamente fácil y conducen a un buen rendimiento.

Continuamente se intenta incrementar la secreción de la proteína heteróloga. Para conseguir esto, se propuso, por ejemplo, incrementar el número de copias de las secuencias de ADN recombinante que codifican la proteína heteróloga. Aparte de eso, para incrementar el rendimiento de las proteínas que frecuentemente se segregan en forma glicosilada, se propuso por Arima *et al*. en "Enhanced secretion of hydrophobic peptide fused lysozyme by the introduction of N-glycosilation signal and the disruption of calnexin gene in *Saccharomyces cerevisiae*", FEBS Letters 440 (1998) páginas 89-92, desconectar el gen de las células de levadura, el cual codifica el chaperón de calnexina. Sobre la base de los resultados de este trabajo cabía esperar que la calnexina disminuía la secreción de proteínas heterólogas a partir de células de levadura. Ciertamente, Conesa *et al*. describieron en "Calnexin Overexpression Increases Manganese Peroxidase Production in *Aspergillus niger*", en Applied and Environmental Microbiology, febrero 2002, páginas 846-851, que la sobreexpresión de calnexina incrementa la producción de manganeso peroxidasa; sin embargo esto afectaba por un lado a cultivos de hongos filamentosos y, por otro lado, la influencia positiva de la sobreexpresión de calnexina sobre el rendimiento se fundamentaba en una influencia de la calnexina sobre la introducción de hemo en la manganeso peroxidasa.

Es objeto de la invención poner a disposición un procedimiento con el cual se incremente la secreción de una proteína heteróloga en células huésped de levaduras.

Este problema se soluciona conforme a la invención por un procedimiento con las características de la reivindicación 1.

En el caso del procedimiento para la producción de una proteína conforme a la invención se preparan primeramente células huésped de al menos un tipo de levadura de los géneros *Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Kluyveromyces, Hansenula, Pichia, Arxula, Schwanniomyces, Candida* o *Yarrowia*, las cuales junto al menos una secuencia de ADN propia, homóloga, que codifica al menos una primera calnexina, contienen en cada caso al menos una secuencia de ADN recombinante que codifica la proteína, así como al menos una secuencia de ADN recombinante adicional que codifica una segunda calnexina, representando la proteína en la célula huésped una proteína heteróloga secretable. La célula huésped contiene, por ejemplo una secuencia de ADN homóloga que codifica una primera (propia) calnexina. Pero las células huésped podrían contener también varias secuencias de ADN homólogas propias, que codifican una calnexina o también varias calnexinas diferentes. Las células huésped que se han de preparar contienen conforme a la invención una o varias secuencias de ADN recombinantes, adicionales, las cuales codifican al menos una segunda calnexina. Los conceptos "primera" y "segunda" calnexina sirven en el marco de esta descripción de la invención para la diferenciación, por una parte, de las calnexinas codificadas por secuencias de ADN homólogas, ya existentes, de las calnexinas codificadas por secuencias de ADN heterólogas adicionales, por otra, sin que sólo por estas expresiones se tenga que implicar una diferencia estructural. Las secuencias de ADN recombinantes, adicionales, pueden abarcar varias secuencias de ADN recombinantes diferentes, que codifiquen (segundas) calnexinas iguales o diferentes. Pero, preferentemente, son varias copias de la misma secuencia de ADN recombinante las que en conjunto codifican las misma segunda calnexina. Preferentemente, la segunda calnexina (para la cual codifican las secuencias de ADN recombinantes) es estructuralmente parecida o igual a la primera calnexina (para la cual codifica la propia secuencia de ADN homóloga). ("Estructuralmente parecida" debe significar en este punto que, por una parte los codones que codifican los mismos aminoácidos pueden estar intercambiados entre sí y, además de esto, que algunos codones se pueden intercambiar por aquellos que codifican otros aminoácidos, siempre que por ello no se influencien más que de manera imperceptible las funciones de la calnexina). Por calnexina se debe entender en general un chaperón en el retículo endoplasmático (ER) de una célula cualquiera de un organismo, el cual a través de una unión a la parte Glc1Mn9-GlcNAc2 del oligosacárido participa en el plegamiento y control de calidad de nuevas glucoproteínas en formación, hasta que estas proteínas estén correctamente plegadas o - debido a un plegamiento falso - sean conducidas a una degradación. Siempre que no se indique de otro modo, la expresión "una calnexina" debe abarcar una calnexina de una célula de levadura (CNE), igualmente que calnexina (CNX) o calreticulina (CNR) abarcan una célula de mamífero o las correspondientes proteínas de otra célula.

Las células huésped, con ayuda de al menos la secuencia que codifica la proteína se inducen a una expresión de la proteína heteróloga y con ayuda de al menos una secuencia adicional que codifica una segunda calnexina se induce a una sobreexpresión de calnexinas. A continuación, las células huésped se inducen a una secreción de la proteína heteróloga. Finalmente, la proteína heteróloga segregada se separa.

A la vista del estado de la técnica anteriormente mencionado, resulta sorprendente el efecto creciente de la sobreexpresión de calnexinas sobre la secreción de proteínas heterólogas en células de levaduras. También resulta sorprendente que un ulterior de la secreción de proteína por sobreexpresión de calnexina se pudo determinar incluso cuando las células huésped mostraban ya, sin sobreexpresión de calnexina, elevados rendimientos de la proteína heteróloga segregada.

En la forma de realización preferida de la presente invención, en la etapa de preparación de las células huésped, al menos la secuencia que codifica la proteína heteróloga y al menos la secuencia de ADN adicional que codifica al menos una segunda calnexina se introduce en las células huésped con ayuda de vectores. En este caso, los vectores se pueden presentar en la célula como plásmidos libres. Sin embargo, los correspondientes vectores se integran preferentemente en el genoma de la célula.

Por una parte, las secuencias de ADN recombinantes que codifican la proteína heteróloga y, por otra parte, las secuencias de ADN recombinantes adicionales que codifican al menos una segunda calnexina podrían encontrarse sobre un vector común. Sin embargo, preferentemente, cada secuencia de ADN que codifica la proteína heteróloga y cada secuencia de ADN que codifica una segunda calnexina se introducen en cada caso en un vector separado. Esto simplifica la preparación de los vectores.

Las células huésped se pueden preparar de diferente manera. Por ejemplo, se pueden preparar primero células huésped recombinantes, de las cuales al menos una contiene la secuencia de ADN recombinante que codifica la proteína heteróloga y, a continuación, las células huésped recombinantes se supertransforman introduciendo en cada caso en las células huésped recombinantes, con ayuda de vectores, al menos una secuencia de ADN adicional que codifica al menos una segunda calnexina. De forma alternativa, las células huésped se podrían poner a disposición preparando primero células huésped recombinantes que contengan al menos una secuencia de ADN adicional que codifica al menos una segunda calnexina y, a continuación, las células huésped recombinantes se supertransforman introduciendo en cada caso en las células huésped recombinantes al menos una secuencia de ADN recombinante que codifique la proteína heteróloga. Finalmente, también cabe pensar que en la etapa de preparación de las células huésped tanto al menos la única secuencia de ADN recombinante que codifica la proteína heteróloga, como también al menos la única secuencia de ADN recombinante que codifica al menos una segunda calnexina se puedan introducir al mismo tiempo en la célula huésped. En todas las tres variantes citadas, preferentemente antes de la etapa de preparación de las células huésped, se preparan plásmidos de expresión adecuados como vectores, los cuales contienen en cada caso una secuencia de ADN que codifique al menos una segunda calnexina o, respectivamente, una secuencia de ADN que codifique la proteína heteróloga. Los plásmidos de expresión citados en último lugar se preparan aislando un gen de calnexina (por ejemplo de la clase de levaduras de las células huésped) y clonándolo en un plásmido, en cuyo caso el gen de calnexina se incorpora entre un promotor homólogo o heterólogo y un terminador homólogo o heterólogo.

En una forma de realización preferida del procedimiento conforme a la invención, en la etapa a) se preparan las células huésped de una levadura metilotrófica, especialmente una levadura de los géneros *Hansenula* y *Pichia*. Particularmente preferidas son las células huésped de la levadura *Hansenula polymorpha*.

En una forma de realización preferida se preparan células huésped de una levadura recombinante, la cual abarca en cada caso, al menos una secuencia de ADN recombinante que codifica una proteína heteróloga, siendo la proteína heteróloga una proteína que durante la expresión y/o secreción se modifica post-translacionalmente, especialmente se glicosiliza post-translacionalmente. En este caso la proteína es, por ejemplo, una proteína de un grupo que abarca $\gamma$-interferona, alginato-epimerasa y consensus-fitasa.

En otra forma de realización, la proteína heteróloga es preferentemente una proteína de un grupo que abarca $\gamma$-interferona, $\alpha$-interferona, hirudina, albúmina de suero, alginato-epimerasa y consensus fitasa.

Perfeccionamientos ventajosos y/o preferidos del procedimiento conforme a la invención se caracterizan en las reivindicaciones subordinadas.

A continuación se describe con más detalle la invención con ayuda de las formas de realización preferidas. En los esquemas se muestran:

Fig 1A y 1B: secuencias de ADN adicionales que codifican calnexina, que pueden ser introducidas en las células huésped de levaduras;

Fig. 2: un mapa de plásmidos de un plásmido de expresión de calnexina HCNE-Phleo utilizado para la supertransformación de una célula huésped recombinante;

Fig. 3: un mapa de plásmidos de un plásmido de expresión de calnexina TEFP-HCNE- Phleo utilizado para la supertransformación de una célula huésped recombinante; y

Fig. 4: un Western-Blot de un material sobrenadante del cultivo de una cepa de células de levadura que, conforme a la invención, han sido inducidas para la secreción de alginato-C5-epimerasa.

Primero se preparan células huésped de una clase de levaduras, las cuales junto a su propia secuencia de ADN homóloga que codifica calnexina contienen varias copias de una secuencia de ADN recombinante que codifica una proteína heteróloga, así como varias copias de una secuencia de ADN recombinante, adicional, que codifica calnexina. Se preparan preferentemente células huésped recombinantes de *Hansenula polymorpha*.

Para la preparación de las células huésped recombinantes se preparan primeramente plásmidos de expresión como vectores. Para ello, el gen de calnexina de la levadura *Hansenula polymorpha* (el homólogo del gen de calnexina CNE1 de *Saccharomyces cerevisiae* - véase Fig. 1B) se aísla de la cepa *Hansenula polymorpha*, con el nombre RB11, representado en la Fig. 1A, se clona y se secuencia por reacción en cadena con polimerasa.

En los experimentos se utilizaron dos plásmidos de expresión que contenían el gen de calnexina de la *Hansenula polymorpha*. En un plásmido de expresión con el nombre HCNE-Phleo ("HCNE" derivado de: *Hansenula calnexin*; "Phleo" derivado del gen de resistencia frente al antibiótico de selección Phleomycina) se flanqueó el gen de calnexina por su promotor de transcrispción original y su terminador original. Este plásmido se puede ver en la Fig. 2. En el caso del plásmido de expresión TEFP-HCNE-Phleo ("TEFP" derivado de promotor del factor de transcripción-elongación), representado en la Fig. 3, se controló el gen de calnexina por el promotor TEF1 de la levadura *Arxula adeninivorans* y el terminador MOX de *Hansenula polymorpha*. El promotor TEF utilizado en este vector para el control de la expresión de CNE se puede emplear como elemento universal para la expresión en diferentes clases de levaduras (véanse Klabunde, J., Kunze, G., Gellissen, G. y Hollenberg, C,P., "Integration of heterologons genes in several yeast species using vectors containing a *Hansenula polymorpha*-derived DNA targeting", FEMS Yeast Research 4, 185-198, 2003). Los dos plásmidos de expresión se utilizaron a continuación para la supertransformación de tres cepas recombinantes diferentes de la *Hansenula polymorpha*, las cuales segregan en cada caso una proteína heteróloga. De las tres proteínas recombinantes examinadas se sabía que éstas fueron modificadas en las células huésped de la *Hansenula polymorpha* por una glicosilación post-translacional. Para la supertransformación se eligieron las siguientes cepas recombinantes de la *Hansenula polymorpha*:

a) RB11/AlgElsyn 52-4, el cual segrega una Alginat-C5-epimerasa bacteriana;

b) RB11/Conphys 3-68, el cual segrega una "Consensus"-fitasa sintética; y

c) RB11/FMD-MFIFND 23-2, el cual segrega una variante de $\gamma$-interferona humana, la cual en la *Hansenula polymorpha* está sobreglicosilada en gran medida.

Cada una de estas cepas fue supertransformada con uno de los dos plásmidos de expresión (HCNE-Phleo o TEFP-HCNE-Phleo), arriba indicados. Los supertransformandos fueron seleccionados en lo referente a la resistencia frente al antibiótico Phleomycina. Después de una estabilización los supertransformandos se cultivaron bajo las condiciones de la expresión heteróloga de proteínas, y las proteínas heterólogas segregadas se analizaron mediante Western-Blotting o tinción con SDS-PAGE/Coomassie.

La Fig. 4 muestra, por ejemplo, un Western-Blot de sobrenadantes de cultivo de las cepas de *Hansenula polymorpha* recombinante RB11/AlgE1syn 52-4, las cuales expresan la Alginat-C5-epimerasa bacteriana y que fueron transformadas con los plásmidos de expresión HCNE-Phleo(d) (huellas 3-8) o TEFP-HCNE (huellas 9-15). La huella 1 muestra un estándar de AlgE1 (*E. coli*), la huella 2 marcadores de tamaño de la proteína. La huella 16 muestra a modo comparativo una cepa recombinante RB11/AlgE1syn 52-4 no supertransformada y la huella 17 una cepa de control que no es recombinante. Los resultados de este análisis, especialmente la Fig. 4, muestran claramente en los supertransformandos analizados una cantidad incrementada de la proteína segregada. Esto es válido para los dos plásmidos de expresión de calnexina utilizados.

El número de copias de los vectores de expresión en las tres cepas recombinantes examinadas no se había modificado, de modo que el incremento de la cantidad de proteína no se atribuye a un efecto de la dosis del gen, sino que exclusivamente al efecto de la calnexina. El efecto positivo de la sobreexpresión de la calnexina se pudo detectar tanto en cepas con escaso número de vectores de genes extraños, integrados (2 copias por célula; RB11/AlgE1syn 52-4), como también en el caso de cepas con elevado número de vectores de genes extraños, integrados (aproximadamente 50 copias por célula; RB11/FMD-MFIFNG 23-2 y RB11/Conphys 3-68). El efecto positivo de la sobreexpresión de calnexina se pudo detectar igualmente en levaduras a lo largo de toda el intervalo de producción de proteínas extrañas (pocos miligramos IFNgamma por litro en RB11/FMD-MFIFNG 23-2; 1 - 2 gramos de epimerasa por litro en RB11/AlgE1syn 52-4; 13,5 gramos de fitasa por litro en RB11/Conphys 3-68.

La sobreexpresión de calnexina como chaperón del retículo endoplasmático en una cepa recombinante de *Hansenula polymorpha*, que expresa y segrega una proteína heteróloga glicosilada, conduce por lo tanto a una mejora significativa de la eficacia secretora y del rendimiento de esta proteína heteróloga.

**Material y métodos**

Los métodos y medios utilizados para la construcción de los vectores de expresión, así como para la transformación, cultivo y análisis de las células de levadura, así como los vectores de base y las cepas de levaduras se describen en:

G. **Gellissen** (ed), "*Hansenula polymorpha* - biology and applications", Wiley-VCH, Weinheim 2002, especialmente en los capítulos:

A. **Degelmann**, "Methods" y

M. **Suckow**, G. **Gellissen**, "The expression platform based of *Hansenula polymorpha* strain RB11 and its derivatives - history, status and perspectives".

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de una proteína, según el cual:

a) se preparan primeramente células huésped de al menos una clase de levaduras de los géneros *Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Kluyveromyces, Hansenula, Pichia, Arxula, Schwanniomyces, Candida* o *Yarrowia*, las cuales junto al menos su única secuencia de ADN propia, homóloga, que codifica al menos una primera calnexina, contienen en cada caso al menos una secuencia de ADN recombinante que codifica la proteína, así como al menos una secuencia de ADN recombinante adicional que codifica al menos una segunda calnexina, representando la proteína en la célula huésped una proteína heteróloga secretable;

b) las células huésped, con ayuda de al menos la única secuencia que codifica la proteína se induce a una expresión de la proteína heteróloga y con ayuda de al menos una secuencia adicional que codifica una segunda calnexina se induce a una sobreexpresión de calnexinas;

c) las células huésped se inducen a una secreción de la proteína heteróloga; y

d) la proteína heteróloga segregada se separa.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en la etapa a) se preparan células huésped, las cuales contienen varias secuencias de ADN recombinantes, adicionales, que codifican una segunda calnexina.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque las varias secuencias de ADN recombinantes, adicionales, son iguales entre sí.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la primera y la segunda calnexina son iguales entre sí.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque las secuencias de ADN recombinantes, adicionales, que codifican calnexina son iguales a una de las secuencias de ADN homólogas, que codifican calnexina.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 5, **caracterizado** porque todas las secuencias de ADN recombinantes que codifican la proteína heteróloga son iguales.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 6, **caracterizado** porque en la etapa de la puesta a punto de las células huésped al menos la secuencia de ADN que codifica la proteína heteróloga y al menos una secuencia de ADN adicional que codifica al menos una segunda calnexina, se introducen en las células huésped con ayuda de vectores.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque los vectores se integran en el genoma de la célula.

9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, **caracterizado** porque cada secuencia de ADN que codifica la proteína heteróloga y cada secuencia de ADN que codifica una segunda calnexina se introduce en cada caso en un vector.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 - 9, **caracterizado** porque como vectores se emplean plásmidos.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 10, **caracterizado** porque en la etapa de la puesta a disposición de las células huésped

a1) se preparan primeramente células huésped recombinantes, que en cada caso al menos una contiene la secuencia de ADN recombinante que codifica la proteína heteróloga, y

a2) a continuación, las células huésped recombinantes se supertransforman introduciendo en las células huésped recombinantes, con ayuda de vectores, en cada caso al menos la secuencia de ADN adicional que codifica una segunda calnexina.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 10, **caracterizado** porque en la etapa de la puesta a disposición de las células huésped

a1) se preparan primeramente células huésped recombinantes, que en cada caso al menos una contiene una secuencia de ADN adicional que codifica al menos una segunda calnexina, y

a2) a continuación, las células huésped recombinantes se supertransforman introduciendo en cada caso en las células huésped recombinantes al menos una secuencia de ADN recombinante que codifica la proteína heteróloga.

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 10, **caracterizado** porque en la etapa de la puesta a disposición de las células huésped tanto al menos la secuencia de ADN recombinante que codifica la proteína heteróloga, como también al menos una secuencia de ADN recombinante que codifica al menos una segunda calnexina se introducen al mismo tiempo en la célula huésped.

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 - 13, **caracterizado** porque antes de la etapa a) se preparan como vectores plásmidos de expresión, los cuales contienen una secuencia de ADN que codifica al menos una segunda calnexina, respectivamente, una secuencia de ADN que codifica la proteína heteróloga.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado** porque los plásmidos de expresión se preparan aislando un gen de calnexina y clonándolo en un plásmido, de manera que el gen de calnexina se introduce entre un promotor homólogo o heterólogo y un terminador homólogo o heterólogo.

16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 15, **caracterizado** porque en la etapa a) se preparan células huésped de una levadura metilotrófica, especialmente de los géneros *Hansenula* y *Pichia*.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado** porque en la etapa a) se preparan células huésped de la levadura *Hansenula polymorpha*.

18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 17, **caracterizado** porque en la etapa a) se preparan células huésped de una levadura recombinante, las cuales en cada caso contienen al menos una secuencia de ADN recombinante que codifica una proteína heteróloga, siendo la proteína heteróloga una proteína que durante las etapas b) y/o c) se modifica postranslacionalmente.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado** porque la proteína heteróloga es una proteína que se glicosiliza postranslacionalmente.

20. Procedimiento según la reivindicación 19, **caracterizado** porque la proteína heteróloga es una proteína de un grupo que abarca $\gamma$-interferona, alginato-epimerasa y consensus fitasa y variantes de $\gamma$-interferona, de alginato-epimerasa y de consensus fitasa.

21. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 17, **caracterizado** porque la proteína heteróloga es una proteína de un grupo que abarca $\gamma$-interferona, $\alpha$-interferona, hirudina, albúmina de suero, alginato-epimerasa, consensus fitasa y variantes de $\gamma$-interferona, de $\alpha$-interferona, de hirudina, de albúmina de suero, de alginato-epimerasa y de consensus fitasa.

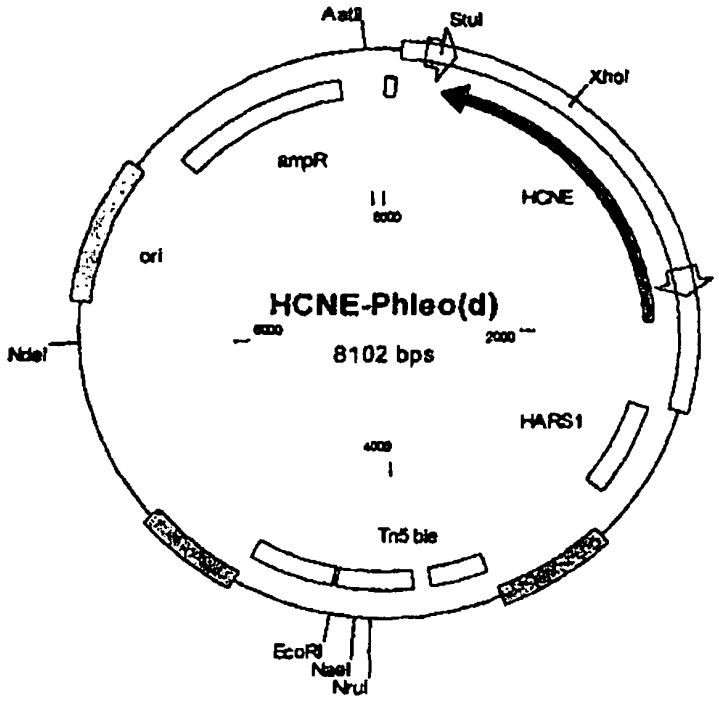
Calnexin *H. polymorpha* (CNE1)

**$NH_2$ -**
**MKVSRPIILLFLSLVSYAADVERKDFLPLSLESDAFFEQFNETWASRWKPSHSKR**
**DENFV**
**YRGEWDVEEPTVNPGLKGDKGLVAKTEAAHHAISARLPTPFDNTNNTLVLQYEV**
**KLQKGL**
**ECGGAYIKLLSQEGGVSDSVEFSNDTPYQVMFGPDKCGMSNKVHFILRRKNPKT**
**GEYEEK**
**HLKVPPMARIVKTSTLYTLIIKPNQDFEIRINGEVAKAGSLLDSRYFDLTPPKEID**
**DPND**
**EKPADWVDDELIPDPNAVKPEDWDEDAPYLIPDPNAVKPEDWDEDAEAYIPDP**
**DAVKPEY**
**WDEEEDGEWIAPKIPNPACEQHGCGPWSAPKIRNPDYKGKWTPELIENPDYKG**
**PWSPRKI**
**PNPEYYEDPTPSNLEPIGALGFELWTMTDSIMFDNIYLGHSIEEAEYIGNNTFLPK**
**VEIE**
**EQIAAANAPQAKYDAEEPEKQIEEQSLVSDLLDKSVDRVLKVYASGKAYWADLL**
**DDPTKT**
**LLNRPGEAFFFASVVVGTITTTFAISTTIVSIFATLFAPSTPQPVKRSEAKERIESVK**
**EK**
**ATASDSKVNETEAVKRG**
**- $COO^{2-}$**

Calnexin *S. cerevisiae* (CNE1)

**$NH_2$ -**
**MKFSAYLWWLFLNLALVKGTSLLSNVTLAEDSFWEHFQAYTNTKHLNQEWITSE**
**AVNNEG**
**SKIYGAQWRLSQGRLQGSAWDKGIAVRTGNAAAMIGHLLETPINVSETDTLVVQ**
**YEIKLD**
**NSLTCGGAFIKLMSGFMNVEALKHYAPDTEGVELVFGPDYCAPEINGVQFAINKV**
**DKITH**
**ESKLRYLQEMPLSKLTDTSQSHLYTLIIDESAQSFQILIDGKTVMVREHIEDKKKV**
**NFEP**
**PITPPLMIPDVSVAKPHDWDDRIRIPDPEAVKLSDRDERDPLMIPHPDGTEPPE**
**WNSSIP**
**EYILDPNAQKPSWWKELEHGEWIPPMIKNPLCTAERGCGQQIPGLINNAKYKGP**
**GELNEI**
**INPNYMGEWHPPEIENPLYYEEQHPLRIENVISGVILEFWSGSPNMLISNIYVGK**
**NVTEA**
**QIIGNKTWLMRDRAFRGSDGPTERKFMNSRLGNLQTTFHNERESPNPFDRIIDR**
**ILEQPL**
**KFVLTAAVVLLTTSVLCCVVFT**
**- $COO^{2-}$**

**FIGURA 1**

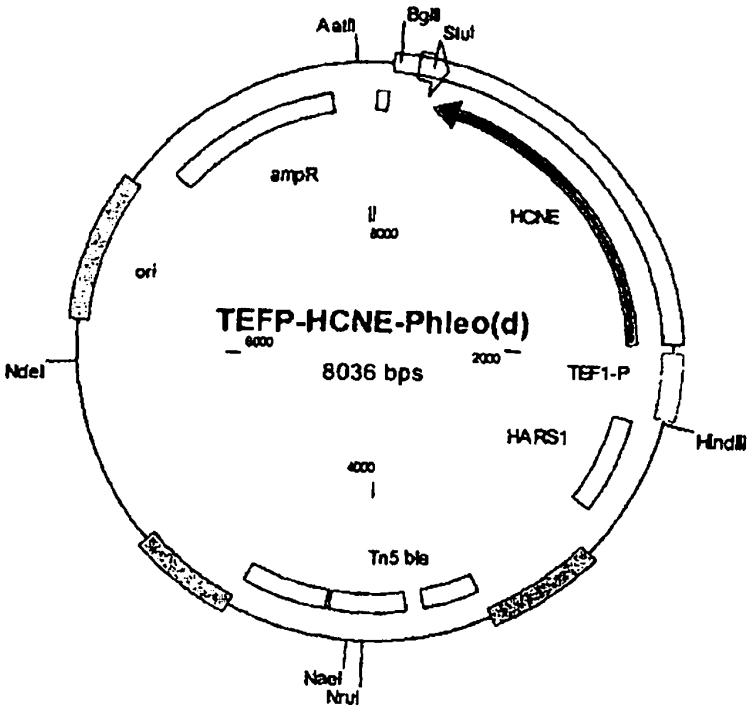



11 nov 2004 Información molecular

Molécula: HCNE-PHleo(d), 8102 bps ADN circular
Nombre de archivo: HCNE-Phleo(d), cm5, fechado 11 nov 2004

| Características moleculares: | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Tipo | Inicio | Final | Nombre | Descripción |
| GEN | 69 | 13 C | | MOX-T |
| MARCADOR | 258 | | | T -> C (creates StuI site) |
| MARCADOR | 1799 | | | A -> G; intercambio de bases (Glu->Glu) sosegado |
| GEN | 1969 | 296 C | HCNE | |
| REGIÓN | 2390 | 84 C | | |
| GEN | 2882 | 2413 C | HARS1 | HARS1 |
| REGIÓN | 3539 | 3039 C | | URA3 gen de S. cerevisiae + D4 |
| GEN | 3824 | 3548 C | | CyC1-T (S. cerevisiae) |
| GEN | 4290 | 3910 C | Tn5 ble | Tn5 ble |
| GEN | 4722 | 4305 C | | TEF1-P (S. cerevisiae) |
| REGIÓN | 5185 | 4732 C | | URA3 gen de S. cerevisiae + D4 |
| REGIÓN | 6219 | 6886 | ori | |
| GEN | 7891 | 7031 C | ampR | β-lactamasa |

**Figura 2**




| | | |
|---|---|---|
| 11 nov 2004 | | Información molecular |
| Molécula: | TEFP-HCNE-PHleo(d), | 8036 bps ADN circular |
| Nombre de archivo: | TEFP-HCNE-Phleo(d), cm5, | fechado 11 nov 2004 |

| Caracteristicas moleculares: | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Tipo | Inicio | Final | Nombre | Descripción |
| GEN | 69 | 13 C | | MOX-T |
| MARCADOR | 258 | | | T -> C (creates StuI site) |
| REGIÓN | 1969 | 84 C | | |
| GEN | 1969 | 296 C | HCNE | |
| REGIÓN | 2303 | 2007 C | TEF1-P | TEF1-Promotor de A.adeninivorans |
| GEN | 2816 | 2347 C | HARS1 | HARS1 |
| REGIÓN | 3473 | 2973 C | | URA3 gen de S. cerevisiae + D4 |
| GEN | 3758 | 3482 C | | CyC1-T (S. cerevisiae) |
| GEN | 4224 | 3844 C | Tn5 ble | Tn5 ble |
| GEN | 4656 | 4239 C | | TEF1-P (S. cerevisiae) |
| REGIÓN | 5119 | 4666 C | | URA3 gen de S. cerevisiae + D4 |
| REGIÓN | 6153 | 6820 | ori | |
| GEN | 7825 | 6965 C | ampR | β-lactamasa |

**Figura 3**

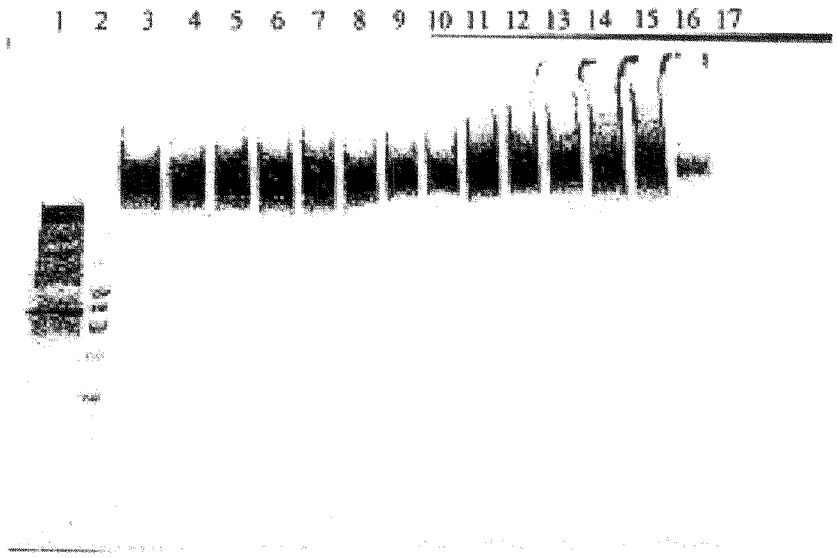



FIGURA 4

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Artes Biotechnology GmbH

<120> Procedimiento para la preparación de una proteína heteróloga utilizando células huésped de una clase de levaduras

<130> A549EP

<140> 04 027 280.9

<141> 2004-11-17

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 557

<212> PRT

<213> *Hansenula polymorpha*

<400> 1

```
Met Lys Val Ser Arg Pro Ile Ile Leu Leu Phe Leu Ser Leu Val Ser
1               5                  10                  15

Tyr Ala Ala Asp Val Glu Arg Lys Asp Phe Leu Pro Leu Ser Leu Glu
            20                  25                  30

Ser Asp Ala Phe Phe Glu Gln Phe Asn Glu Thr Trp Ala Ser Arg Trp
        35                  40                  45

Lys Pro Ser His Ser Lys Arg Asp Glu Asn Phe Val Tyr Arg Gly Glu
    50                  55                  60

Trp Asp Val Glu Glu Pro Thr Val Asn Pro Gly Leu Lys Gly Asp Lys
65                  70                  75                  80

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

Leu Pro Thr Pro Phe Asp Asn Thr Asn Asn Thr Leu Val Leu Gln Tyr
            100                 105                 110

Glu Val Lys Leu Gln Lys Gly Leu Glu Cys Gly Gly Ala Tyr Ile Lys
        115                 120                 125

Leu Leu Ser Gln Glu Gly Gly Val Ser Asp Ser Val Glu Phe Ser Asn
    130                 135                 140

Asp Thr Pro Tyr Gln Val Met Phe Gly Pro Asp Lys Cys Gly Met Ser
145                 150                 155                 160

Asn Lys Val His Phe Ile Leu Arg Arg Lys Asn Pro Lys Thr Gly Glu
                165                 170                 175
```

Tyr Glu Glu Lys His Leu Lys Val Pro Pro Met Ala Arg Ile Val Lys
180 185 190

Thr Ser Thr Leu Tyr Thr Leu Ile Ile Lys Pro Asn Gln Asp Phe Glu
195 200 205

Ile Arg Ile Asn Gly Glu Val Ala Lys Ala Gly Ser Leu Leu Asp Ser
210 215 220

Arg Tyr Phe Asp Leu Thr Pro Pro Lys Glu Ile Asp Asp Pro Asn Asp
225 230 235 240

Glu Lys Pro Ala Asp Trp Val Asp Asp Glu Leu Ile Pro Asp Pro Asn
245 250 255

Ala Val Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Asp Ala Pro Tyr Leu Ile Pro
260 265 270

Asp Pro Asn Ala Val Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Asp Ala Glu Ala
275 280 285

Tyr Ile Pro Asp Pro Asp Ala Val Lys Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu
290 295 300

Glu Asp Gly Glu Trp Ile Ala Pro Lys Ile Pro Asn Pro Ala Cys Glu
305 310 315 320

Gln His Gly Cys Gly Pro Trp Ser Ala Pro Lys Ile Arg Asn Pro Asp
325 330 335

Tyr Lys Gly Lys Trp Thr Pro Glu Leu Ile Glu Asn Pro Asp Tyr Lys
340 345 350

Gly Pro Trp Ser Pro Arg Lys Ile Pro Asn Pro Glu Tyr Tyr Glu Asp
355 360 365

Pro Thr Pro Ser Asn Leu Glu Pro Ile Gly Ala Leu Gly Phe Glu Leu
370 375 380

Trp Thr Met Thr Asp Ser Ile Met Phe Asp Asn Ile Tyr Leu Gly His
385 390 395 400

Ser Ile Glu Glu Ala Glu Tyr Ile Gly Asn Asn Thr Phe Leu Pro Lys
405 410 415

Val Glu Ile Glu Glu Gln Ile Ala Ala Ala Asn Ala Pro Gln Ala Lys
420 425 430

Tyr Asp Ala Glu Glu Pro Glu Lys Gln Ile Glu Glu Gln Ser Leu Val
435 440 445

Ser Asp Leu Leu Asp Lys Ser Val Asp Arg Val Leu Lys Val Tyr Ala
450 455 460

Ser Gly Lys Ala Tyr Trp Ala Asp Leu Leu Asp Asp Pro Thr Lys Thr
465 470 475 480

Leu Leu Asn Arg Pro Gly Glu Ala Phe Phe Phe Ala Ser Val Val Val
485 490 495

Gly Thr Ile Thr Thr Thr Phe Ala Ile Ser Thr Thr Ile Val Ser Ile
500 505 510

Phe Ala Thr Leu Phe Ala Pro Ser Thr Pro Gln Pro Val Lys Arg Ser
515 520 525

Glu Ala Lys Glu Arg Ile Glu Ser Val Lys Glu Lys Ala Thr Ala Ser
530 535 540

Asp Ser Lys Val Asn Glu Thr Glu Ala Val Lys Arg Gly
545 550 555

<210> 2

<211> 502

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisae*

<400> 2

```
Met Lys Phe Ser Ala Tyr Leu Trp Trp Leu Phe Leu Asn Leu Ala Leu
1               5                  10                  15

Val Lys Gly Thr Ser Leu Leu Ser Asn Val Thr Leu Ala Glu Asp Ser
            20                  25                  30

Phe Trp Glu His Phe Gln Ala Tyr Thr Asn Thr Lys His Leu Asn Gln
        35                  40                  45

Glu Trp Ile Thr Ser Glu Ala Val Asn Asn Glu Gly Ser Lys Ile Tyr
    50                  55                  60

Gly Ala Gln Trp Arg Leu Ser Gln Gly Arg Leu Gln Gly Ser Ala Trp
65                  70                  75                  80

Asp Lys Gly Ile Ala Val Arg Thr Gly Asn Ala Ala Ala Met Ile Gly
                85                  90                  95

His Leu Leu Glu Thr Pro Ile Asn Val Ser Glu Thr Asp Thr Leu Val
            100                 105                 110

Val Gln Tyr Glu Ile Lys Leu Asp Asn Ser Leu Thr Cys Gly Gly Ala
        115                 120                 125

Phe Ile Lys Leu Met Ser Gly Phe Met Asn Val Glu Ala Leu Lys His
    130                 135                 140

Tyr Ala Pro Asp Thr Glu Gly Val Glu Leu Val Phe Gly Pro Asp Tyr
145                 150                 155                 160

Cys Ala Pro Glu Ile Asn Gly Val Gln Phe Ala Ile Asn Lys Val Asp
                165                 170                 175

Lys Ile Thr His Glu Ser Lys Leu Arg Tyr Leu Gln Glu Met Pro Leu
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Asp Thr Ser Gln Ser His Leu Tyr Thr Leu Ile Ile
        195                 200                 205

Asp Glu Ser Ala Gln Ser Phe Gln Ile Leu Ile Asp Gly Lys Thr Val
    210                 215                 220

Met Val Arg Glu His Ile Glu Asp Lys Lys Lys Val Asn Phe Glu Pro
225                 230                 235                 240

Pro Ile Thr Pro Pro Leu Met Ile Pro Asp Val Ser Val Ala Lys Pro
                245                 250                 255
```

His Asp Trp Asp Asp Arg Ile Arg Ile Pro Asp Pro Glu Ala Val Lys
260 265 270

Leu Ser Asp Arg Asp Glu Arg Asp Pro Leu Met Ile Pro His Pro Asp
275 280 285

Gly Thr Glu Pro Pro Glu Trp Asn Ser Ser Ile Pro Glu Tyr Ile Leu
290 295 300

Asp Pro Asn Ala Gln Lys Pro Ser Trp Trp Lys Glu Leu Glu His Gly
305 310 315 320

Glu Trp Ile Pro Pro Met Ile Lys Asn Pro Leu Cys Thr Ala Glu Arg
325 330 335

Gly Cys Gly Gln Gln Ile Pro Gly Leu Ile Asn Asn Ala Lys Tyr Lys
340 345 350

Gly Pro Gly Glu Leu Asn Glu Ile Ile Asn Pro Asn Tyr Met Gly Glu
355 360 365

Trp His Pro Pro Glu Ile Glu Asn Pro Leu Tyr Tyr Glu Glu Gln His
370 375 380

Pro Leu Arg Ile Glu Asn Val Ile Ser Gly Val Ile Leu Glu Phe Trp
385 390 395 400

Ser Gly Ser Pro Asn Met Leu Ile Ser Asn Ile Tyr Val Gly Lys Asn
405 410 415

Val Thr Glu Ala Gln Ile Ile Gly Asn Lys Thr Trp Leu Met Arg Asp
420 425 430

Arg Ala Phe Arg Gly Ser Asp Gly Pro Thr Glu Arg Lys Phe Met Asn
435 440 445

Ser Arg Leu Gly Asn Leu Gln Thr Thr Phe His Asn Glu Arg Glu Ser
450 455 460

Pro Asn Pro Phe Asp Arg Ile Ile Asp Arg Ile Leu Glu Gln Pro Leu
465 470 475 480

Lys Phe Val Leu Thr Ala Ala Val Val Leu Leu Thr Thr Ser Val Leu
485 490 495

Cys Cys Val Val Phe Thr
500