



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 106**

51 Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12R 1/84 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01930179 .5**

96 Fecha de presentación : **16.05.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1283265**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2003**

54 Título: **Procedimiento para producir proteína con reducción de fosfato de manosa en la cadena de azúcar y glicoproteína producida con el mismo.**

30 Prioridad: **17.05.2000 JP 2000-144643**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.11.2009

73 Titular/es: **Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation**
2-10, Dosho-machi 3-chome
Chuo-ku, Osaka-shi Osaka 541-8505, JP

72 Inventor/es: **Miura, Masami;**
Hirose, Masaaki;
Miwa, Taeko;
Irie, Hiroyuki;
Kuwae, Shinobu;
Miyano, Kenmi;
Otani, Wataru y
Ohi, Hideyuki

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Procedimiento para producir proteína con reducción de fosfato de manosa en la cadena de azúcar y glicoproteína producida con el mismo.

Campo técnico

La presente invención se refiere al control de la adición de fosfato de manosa a una cadena de azúcar en la producción de proteína heteróloga usando levadura. Más particularmente, la invención se refiere al control de una función formadora de cadena de azúcar ácida en la cadena de azúcar similar a núcleo de la glicoproteína contenida en una levadura que pertenece al género *Pichia*. La presente invención se refiere también a un gen que participa en la adición de fosfato de manosa a una cadena de azúcar, un gen mutante del mismo, un vector que lleva el gen mutante, un transformante que se ha transformado por el vector, un procedimiento para producir una proteína con reducción de una cadena de azúcar ácida usando un medio para controlar el gen y una proteína con reducción de cadena de azúcar ácida preparada por el procedimiento. Además, la invención se refiere a una proteína codificada por el gen anterior y a un anticuerpo que reconoce la proteína.

Técnica anterior

La producción usando un microorganismo genéticamente modificado es ventajosa sobre la producción usando células de mamífero con respecto a diversos puntos que incluyen el coste de producción bajo y la técnica de cultivo alta que se ha acumulado como la tecnología de fermentación. Recientemente, se ha prestado atención a una levadura metilotrófica que pertenece al género *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris*) como un huésped efectivo para producir una proteína heteróloga [Creag, J.M., y col., Bio/Technology 11, 905 (1993)]. Las levaduras que pertenecen al género *Pichia* tienen cantidades de expresión secretora mucho más grandes que *Saccharomyces cerevisiae* y las técnicas de cultivo para ellas están establecidas, de tal forma que se usan muy adecuadamente como levaduras para producir industrialmente seroalbúmina humana y así sucesivamente.

En el caso de que un microorganismo se use como un hospedador para producir una glicoproteína heteróloga, sin embargo, es imposible añadir una cadena de azúcar que tenga la misma estructura y composición que una glicoproteína humana y esto es un problema. Se conocen tres tipos para cadena de azúcar unida a asparagina de glicoproteína derivada de células de mamífero incluyendo células humanas, es decir, tipo complejo, tipo híbrido y tipo alta en manosa. Por otro lado, en procariotas tales como *Escherichia coli*, la adición *per se* de cadena de azúcar no ocurre.

Para cadenas de azúcar unidas a asparagina en *Saccharomyces cerevisiae*, sólo se conoce el tipo alto en manosa. Con respecto a cadenas de azúcar unidas a asparagina de glicoproteína en *Saccharomyces cerevisiae*, se añade en el retículo endoplásmico cadena de azúcar similar a núcleo ER (Man8GlcNAc2) común con aquella de mamíferos y en el siguiente procedimiento se forma una gran cantidad (30-150 moléculas) de manosa como una cadena exterior de azúcar [Kukuruzinska, M.A. y col., Ann. Rev. Biochem. 56, 915 (1987)]. Por lo tanto, las cadenas de azúcar de tipo altas en manosa que se han añadido a la glicoproteína derivada de *Saccharomyces cerevisiae* contienen más cantidad de manosa que aquella de una célula de mamífero, es decir, contienen principalmente cadenas de azúcar hipermanosiladas.

El enlace α -1,3 en manosa de la cadena de azúcar de *S. cerevisiae* no se encuentra en cadenas de azúcar de mamífero incluyendo ser humano. Por lo tanto se considera que esta estructura podría exhibir una propiedad antigénica para seres humanos [Ballou C.E., Methods Enzymol., 185, 440-470 (1990)]. Además, el hecho de que las cadenas de azúcar estén implicadas en diversos papeles *in vivo* tales como la depuración en sangre, el mantenimiento de estructura proteica, la contribución a la actividad y la localización [Takeuchi, Tanpakushitu Kakusan Kouso, tema especial "Glycoconjugate", 37, 1713 (1992)] sugiere que una proteína heteróloga que tiene una cadena de azúcar tipo alta en manosa producida usando *S. cerevisiae* tiene un problema grande en el aspecto de la función.

Recientemente, con respecto a *S. cerevisiae*, se clonó el gen OCH1 que codifica la α -1,6-manosiltransferasa que es la enzima clave para la elongación de manosa de la cadena exterior de azúcar [Nakayama, K. EMBO J. 11, 2511 (1992)]. Se comunicó que en mutante doble Δ och-mnm1-mutante doble que tiene mutaciones tanto en gen OCH1 como en gen MNN1 que codifica una proteína que tiene una función de añadir manosa a la cadena de azúcar similar a núcleo con el enlace α -1,3, sólo se añade cadena de azúcar similar a núcleo ER común a aquella de mamíferos [Jigami, Y., Tanpakushitsu Kakusan Kouso, 39, 657 (1994)].

Se sabe que una cadena de azúcar de tipo manosa se añade en levaduras que pertenecen al género *Pichia* en una manera similar a aquella de *S. cerevisiae*, mientras que se muestra que el número de adiciones de manosas de una levadura que pertenece al género *Pichia* es menor que aquel de *S. cerevisiae* y que aquella cadena de azúcar de levaduras que pertenecen al género *Pichia* no contiene enlace α -1,3 que se considera que es altamente antigénico para los seres humanos [Trimble, R.B. y col., J. Biol. Chem. 266, 22807 (1991)]. Además, se clonó un gen homólogo al gen OCH1 de *S. cerevisiae* y se confirmó que el control del gen en cepa de levaduras que pertenece al género *Pichia* suprime la elongación de la cadena de azúcar. Por lo tanto, esta cadena es útil como un huésped para producir una glicoproteína heteróloga que tiene una estructura de cadena de azúcar similar al tipo humano [patente japonesa abierta a inspección pública Hei 9-3097].

Aunque se ha desarrollado una técnica que suprime la elongación de la cadena de azúcar y permite expresar una glicoproteína similar a la cadena de azúcar similar a núcleo ER, queda el siguiente problema también en una levadura que pertenece al género *Pichia*: una proteína heteróloga tiene una antigenicidad causada por una cadena de azúcar ácida en el caso de que la glicoproteína heteróloga producida usando una levadura como un huésped se administre a seres humanos como una medicina.

Se sabe que una cadena de azúcar ácida añadida por manosa-6-fosfato (MAN-6-P) a una cadena de azúcar de tipo núcleo y/o a una cadena exterior de azúcar se forma(n) en *S. cerevisiae* [Hernández, L.M. y col. J. Biol. Chem. 264, 13648-13659 (1989)]. Como la figura 1 ilustra, no sólo se añade fosfato de manosa a la cadena exterior de azúcar sino que también se añade a la cadena de azúcar similar a núcleo en *S. cerevisiae* [Jigami, Y. y Ouani, Y., Biochim. Biophys. Acta, 1426, 335-345 (1999)]. Esta cadena de azúcar que contiene el grupo fosfato no se encuentra en cadenas de azúcar de tipo humano. Por lo tanto, es muy probable que esto tenga una antigenicidad y se considera que esto puede ser un problema grande en el caso de desarrollar una medicina. Con respecto a *S. cerevisiae*, se han clonado y se han analizado el gen MNN4 y el gen MNN6 como genes que participan en la transferencia de fosfato de manosa [Odani, T. y col. Glycobiology 6, 805 (1996); Wang, X.-H., y col. J. Biol. Chem., 272, 18117 (1997)]. Se confirmó *in vitro* que la transferencia de fosfato de manosa a la cadena de azúcar similar a núcleo o Man5GlcNAc2 depende de Mnn6p (proteína codificada por MNN6). Por lo tanto, se asume que el gen MNN6 codifica el cuerpo principal de fosfato de manosa transferasa.

Además, con respecto al gen MNN4, la actividad de transferencia de fosfato de manosa se suprime en mutante mnn4 y el contenido en fosfato está incrementado por la sobreexpresión. Por lo tanto, el gen MNN4 se considera que es un factor que controla positivamente la proteína Mnn6. Se puede dilucidar que la transferencia de fosfato a una cadena de azúcar está disminuida en levadura cuyo gen MNN4 está interrumpido por una técnica de ingeniería genética [patente japonesa abierta a inspección pública Hei 9-266792]. Por lo tanto, la levadura se puede usar para producir una glicoproteína que tiene una antigenicidad reducida para seres humanos. Sin embargo, incluso si se usa la cepa de gen MNN4 controlado de *S. cerevisiae*, la cadena de azúcar ácida en la cadena de azúcar similar a núcleo no se puede suprimir suficientemente, con menos del 30% de la cadena de azúcar completa siendo una cadena de azúcar ácida [Odani T. y col., Glycobiology 6, 805-810 (1996); patente japonesa abierta a inspección pública Hei 9-266792].

Por otro lado, con respecto a levaduras que pertenecen al género *Pichia*, sólo se han publicado unas pocas comunicaciones que conciernen a la cadena de azúcar fosforilada de una proteína heteróloga hasta ahora. Por ejemplo, en el dominio kringle 2 del activador de plasminógeno tisular, se ha transferido un grupo de fosfato de manosa al 20% de la cadena de azúcar de Man10-14GlcNAc2 [Miele, R.G. y col. Biotechnol. Appl. Biochem. 26, 79 (1997)]. Además, aunque el grupo fosfato de manosa se detectó en la cadena de azúcar de man9-14GlcNAc2 de proteasa aspártica, no se detectó una cadena de azúcar fosforilada en cinco proteínas heterólogas distintas investigadas al mismo tiempo [Montesino, R. y col. Protein Exp. Purif. 14, 197 (1998)]. Por lo tanto, con respecto a una levadura que pertenece al género *Pichia*, la frecuencia de la transferencia de fosfato de manosa a una cadena de azúcar podría ser baja, pero las cadenas de azúcar fosforiladas se detectan en algunas proteínas heterólogas producidas de este modo. Por lo tanto, sería deseable suprimir la adición de fosfato de manosa a la cadena de azúcar en el caso de que sea administrada a seres humanos como una medicina.

Montesino, R. y col. (Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins selected by the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 1998, 14(2): 197-207) comunican la caracterización de oligosacáridos unidos en N en seis glicoproteínas ajenas segregadas a partir de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Se observó que los carbohidratos en estas proteínas varían en tamaño, con las estructuras Man8GlcNAc2 y Man9GlcNAc2 siendo las especies más frecuentemente observadas. Las cantidades sustanciales de estructuras de oligomanósido más cortas estaban presentes sólo en invertasa y son comunes estructuras más largas (hasta Man18GlcNAc2) en proteasa aspártica y enteroquinasa. Se observaron oligosacáridos fosforilados en una proteína, proteasa aspártica. A diferencia de oligosacáridos en glicoproteínas seleccionadas de *S. cerevisiae*, no se observa ninguna manosilación unida en alfa 1,3 en cualquiera de las seis proteínas secretadas por *P. pastoris*. A partir de estos resultados, es evidente que la mayoría de las proteínas extrañas secretadas por *P. pastoris* no están sometidas a la manosilación extensiva (hiperglicosilación) que ocurre comúnmente en proteínas segregadas de *S. cerevisiae*.

Martinet, W. y col. (Modification of the protein glycosylation pathway in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Biotechnology Letters, 1998, 20(12): 1171-1177) describe el uso de una α -1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* para modificar la glicosilación unida en N de la levadura *Pichia pastoris* metilotrófica. Se observó la expresión de glicoproteínas del virus influenza ajenas con oligosacáridos unidos en N más extensivamente procesados cuando se segregó α -1,2-manosidasa en el medio de cultivo. Sin embargo, la eliminación intracelular de los residuos de manosa puede estimular actividad manosiltransferasa y puede conducir a hiperglicosilación. La selección suicida de [^3H]manosa o las altas concentraciones de ortovanadato, usadas comúnmente para aislar mutantes de glicosilación de *Saccharomyces cerevisiae*, no tienen efecto profundo en *Pichia pastoris*.

Aunque el sistema de expresión que usa una levadura que pertenece al género *Pichia* como un huésped es efectivo para la producción industrial debido a su alta productividad, el mecanismo de la transferencia de fosfato de manosa a la cadena de azúcar de una glicoproteína originalmente poseída o producida, como una proteína heteróloga, por una levadura que pertenece al género *Pichia* ha sido estudiada sólo insuficientemente. Por lo tanto, con respecto a una levadura que pertenece al género *Pichia*, el mecanismo de transferencia del fosfato de manosa a una cadena

de azúcar de glicoproteína es bastante desconocido y es una cuestión importante desde el punto de vista de evitar la antigenicidad en el desarrollo de una medicina para administrar a seres humanos o mamíferos para suprimir la transferencia de fosfato de manosa en un sistema de expresión de glicoproteínas en el que la levadura que pertenece al género *Pichia* se usa como un huésped.

Así, los propósitos de la presente invención son encontrar un gen que participe en la adición de fosfato de manosa a la cadena de azúcar de la glicoproteína derivada de una levadura que pertenece al género *Pichia* y proporcionar un medio para controlar la adición. Otros propósitos de la presente invención son proporcionar un procedimiento para producir una proteína cuya cadena de azúcar ácida se redujo usando una cepa de levadura que pertenece al género *Pichia* en el que el gen está controlado y producir una glicoproteína producida por el procedimiento.

Los exámenes con gran celo en el trabajo de los solicitantes para resolver estos problemas dieron como resultado el éxito de la clonación del gen que codifica una proteína que se origina a partir de una levadura que pertenece al género *Pichia* y participa en la adición de fosfato de manosa, el hallazgo de que la proteína participa en la adición de fosfato de manosa en un sistema de expresión que usa una levadura que pertenece al género *Pichia* como un huésped y la confirmación de que la cadena de azúcar ácida de la glicoproteína producida usando la cepa de gen controlado está remarcablemente reducida y consecuentemente alcanzaron la finalización de la presente invención.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para suprimir la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa en una levadura que pertenece al género *Pichia*, en el que se suprime un gen que tiene la secuencia de bases de SEC. ID N°: 2 en el listado de secuencias y que participa al menos en la adición de fosfato de manosa a una cadena de azúcar en la cadena de azúcar similar a núcleo de una glicoproteína introduciendo mutación/mutaciones dentro de dicho gen o usando un polinucleótido que tiene una secuencia de bases complementaria con la secuencia de bases de dicho gen, un polinucleótido que contiene la secuencia de bases mostrada por los nucleótidos del 150° al 2480° de la secuencia de bases de SEC. ID N°: 2 en el listado de secuencias que codifica una proteína que participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo derivada de una levadura que pertenece al género *Pichia*, un polinucleótido que tiene una función reducida induciendo mutación/mutaciones al polinucleótido, un vector recombinante que lleva el polinucleótido que tiene una función reducida, un procedimiento para producir una glicoproteína usando el procedimiento supresor anterior o el transformante anterior en la producción de una glicoproteína heteróloga por la técnica de ingeniería genética que usa una levadura que pertenece al género *Pichia* como un huésped, una glicoproteína producida por el procedimiento para producir una glicoproteína, una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 en el listado de secuencias y un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína.

La presente invención se describirá en detalle más adelante.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la estructura de una cadena de azúcar unida a asparragina de *S. cerevisiae* (símbolos: Ans, asparragina; GNAC, N-acetilglucosamina; M, manosa; P, fosfato) (parcialmente modificado a partir de la figura 1 en Jigami, Y. y Odani, T., Biochim. Biophys. Acta, 1426, 335-345 (1999)).

La figura 2 ilustra el plásmido pTM004 dentro del que se ha subclonado el gen PNO1 de una levadura que pertenece al género *Pichia*.

La figura 3 ilustra regiones homólogas entre el gen PNO1 de una levadura que pertenece al género *Pichia* y el gen MNN4 de *S. cerevisiae*.

La figura 4 ilustra el plásmido pRH101 para expresar gen de la antitrombina III (ATIII) humana en una levadura que pertenece al género *Pichia*.

La figura 5 ilustra el protocolo para construir plásmido pTM009, en el que está controlado el gen PNO1, para expresar ATIII humana en una levadura que pertenece al género *Pichia*.

La figura 6 ilustra la preparación de cepa de levadura 9G4 que pertenece al género *Pichia*, en la que está controlado el gen PNO1, para expresar ATIII humana.

La figura 7 ilustra perfiles de cultivo de cepas RH101 y 9G4 usando fermentadores de tanque.

La figura 8 ilustra resultados de los análisis de (A) productos después de reacción enzimática, (B) productos después de tratamiento ácido y (C) productos después de tratamiento con fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina, de ATIII recombinante derivada de una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia*.

La figura 9 ilustra análisis estructural de cadenas de azúcar de ATIII recombinante derivada de una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* y ATIII recombinante derivada de una cepa de gen PNO1 controlado.

Las cantidades de aplicación de (A) y (B) fueron 1/5 de aquellas de (C) y (D).

(A) Una cadena de azúcar neutral de ATIII recombinante derivada de cepa RH101.

(B) Una cadena de azúcar neutral de ATIII recombinante derivada de cepa 9G4.

(C) Una cadena de azúcar ácida de ATIII recombinante derivada de cepa RH101.

(D) Una cadena de azúcar ácida de ATIII recombinante derivada de cepa 9G4.

La figura 10 ilustra la evaluación por ELISA de la inhibición por ATIII humana derivada de plasma en la reacción de unión de ATIII humana recombinante inmovilizada derivada de una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* o de ATIII humana recombinante derivada de una cepa de gen PNO1 controlado con un antisuero contra ATIII humana recombinante derivada de una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* o antisuero contra ATIII humana recombinante (derivada de una cepa de gen PNO1 controlado).

(1) *Proteína que participa en formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa*

La proteína que participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa según la presente invención es aquella producida por una levadura que pertenece al género *Pichia* y tiene una función para adición de fosfato de manosa a una cadena de azúcar de una glicoproteína, en particular para la adición de fosfato de manosa implicada en la cadena de azúcar similar a núcleo. Una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa es una cadena de azúcar ácida. Las levaduras que pertenecen al género *Pichia* según la presente invención de las que se deriva una proteína que participa en la formación de la cadena de azúcar incluyen, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia methanolica*, *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercum*, *Pichia pijperi* y otras levaduras, pero no están limitadas a ellas. *Pichia pastoris* (llamada *P. pastoris* de ahora en adelante) se usa preferiblemente entre éstas.

Una proteína que participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa según la presente invención es una proteína que se deriva originalmente de una levadura que pertenece al género *Pichia* y tiene una función descrita anteriormente. Es preferiblemente una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 1 en el listado de secuencias en su región N-terminal, más preferiblemente una proteína que contiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 en el listado de secuencias.

Tal secuencia de aminoácidos se puede modificar en parte sustituyendo, delecionando, insertando, y/o añadiendo uno o más restos de aminoácidos o cadenas peptídicas hasta el punto en que la propiedad anterior no se cambie. Una proteína según la presente invención puede ser una proteína que tenga una homología del 70% o más con los aminoácidos de la proteína que contiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 en el listado de secuencias y tiene una actividad de formar una cadena de azúcar ácidos en la cadena de azúcar similar a núcleo de una glicoproteína producida por una levadura que pertenece al género *Pichia*.

Así, una proteína según la presente invención se selecciona del grupo constituido por:

(1) una proteína mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 en el listado de secuencias;

(2) una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 en el listado de secuencias;

(3) una proteína que tiene una homología del 70% o más con la secuencia de aminoácidos de la proteína anteriormente mencionada (2) y participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo de una glicoproteína producida por una levadura que pertenece al género *Pichia*; y

(4) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 1 en el listado de secuencias en el extremo N-terminal y que participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo de una glicoproteína producida por una levadura que pertenece al género *Pichia*.

La presente invención reivindica también un polipéptido que tiene una secuencia constituida por cinco aminoácidos o más consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 en el listado de secuencias y un anticuerpo que reconoce inmunológicamente la proteína anterior. El polipéptido es útil como un antígeno para obtener un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína anterior.

La proteína que participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa según la presente invención puede producirse cultivando una levadura que pertenece al género *Pichia* según el procedimiento convencional, preferiblemente bajo una condición adecuada para la proliferación de la levadura, seguido por extracción/purificación según el procedimiento convencional a partir de las células obtenidas. El polipéptido se puede sintetizar en base a la secuencia de aminoácidos ejemplificada en la presente invención o se puede producir por la técnica de ADN recombinante convencional en base a la secuencia básica ejemplificada en la presente invención. El anticuerpo tal como anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal se puede producir por procedimientos bien conocidos para producir anticuerpos. El polipéptido anterior así preparado y un anticuerpo que reconoce la proteína anterior, son

útiles para obtener un medio para controlar la expresión de una glicoproteína ácida en un sistema de expresión de glicoproteínas usando una levadura que pertenece al género *Pichia* como un huésped, por ejemplo, para purificar y obtener una proteína que participe en la formación de una cadena de azúcar ácida según la presente invención. Para facilitar la siguiente descripción, la proteína constituida por la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 en el listado de secuencias de la presente invención puede llamarse “proteína Pno1” y el gen que codifica la proteína se llama “gen PNO1”.

(2) Gen que codifica la proteína Pno1

El gen que participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa según la presente invención se caracteriza por tener una secuencia de bases que codifica la proteína Pno1 derivada de una levadura que pertenece al género *Pichia* según la presente invención descrita anteriormente. Una secuencia de bases tal es, por ejemplo, una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 en el listado de secuencias, más preferiblemente un polinucleótido sustancialmente desde la base 150ª hasta la base 2480ª de la secuencia de bases de SEC. ID N°: 2 en el listado de secuencias, aunque se puede usar cualquier secuencia de bases que pueda codificar la proteína Pno1 según la presente invención. Una secuencia de bases tal puede ser un polinucleótido que contiene al menos 60 bases consecutivas a partir del extremo 5' de la secuencia codificante de proteínas en la secuencia de bases de SEC. ID N°: 2 en el listado de secuencias y codifica la proteína que participa en la formación de la cadena de azúcar ácida en una levadura que pertenece al género *Pichia*.

El gen se puede producir por procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, al menos una parte del ADN o el ADN entero se puede producir usando un sintetizador de ADN en base a la secuencia básica ejemplificada en la presente invención. El gen puede también producirse por la amplificación con el procedimiento de PCR usando el ADN cromosómico de una levadura que pertenece al género *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*).

El gen que participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa según la presente invención se proporciona como un gen que codifica proteína Pno1 producida por una levadura que pertenece al género *Pichia* primero por la presente invención. Por lo tanto, el gen que participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa según la presente invención es muy útil en dilucidar el mecanismo de transferencia del fosfato de manosa que se ha añadido a una cadena de azúcar de una glicoproteína en un sistema de expresión de glicoproteínas usando una levadura que pertenece al género *Pichia* como un huésped.

La proteína Pno1 según la presente invención tiene una función de transferir fosfato de manosa a una cadena de azúcar de una glicoproteína producida usando una levadura que pertenece al género *Pichia* como un huésped y es más antigénica frente a seres humanos comparada con una glicoproteína derivada de una célula de mamífero. Por lo tanto, la dilucidación del gen PNO1 según la presente invención permitiría en el futuro, proporcionar un procedimiento para reducir o eliminar en un nivel génico una actividad de transferencia de fosfato de manosa originalmente poseída por una levadura que pertenece al género *Pichia* para expresar/producir, usando una levadura que pertenece al género *Pichia* como un huésped, una glicoproteína heteróloga útil farmacéuticamente a la que no está añadido un grupo fosfato de manosa. Se puede lograr reducir o eliminar la actividad de transferencia de fosfato de manosa originalmente poseída por la proteína Pno1 según la presente invención modificando el gen PNO1 según la presente invención tal como para suprimir al menos la producción de un producto funcional codificado por el ADN.

(3) Transformante en el que está suprimida la función del gen PNO1

Al transformante según la presente invención, se aplica uno de los procedimientos que permite suprimir la expresión del gen PNO1 o hacer al transformante expresar un producto que tiene una función atenuada comparado con un producto funcional nativo para reducir o eliminar la actividad de transferencia de fosfato de manosa originalmente poseída por la proteína Pno1 según la presente invención. Los procedimientos incluyen, por ejemplo, un procedimiento en el que un polinucleótido derivado del gen PNO1 se transforma usando un vector recombinante que lleva un polinucleótido modificado tal como para suprimir al menos la producción de un producto funcional codificado por el gen y un procedimiento en el que la traducción/expresión de un producto funcional codificado por el gen se suprime usando el oligonucleótido antisentido contra el gen.

(3-1) Cepa de levadura de gen PNO1 interferida (interferidora de PNO1)

La interferidora de PNO1 según la presente invención es una levadura que pertenece al género *Pichia* que tiene una capacidad suprimida de transferir fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo de una glicoproteína comparada con una cepa de levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* en base a tener un gen PNO1 modificado.

El “gen PNO1 modificado” es un gen en el que una parte de la secuencia de bases del ADN que codifica una proteína que participa en la transferencia de fosfato de manosa a la cadena de azúcar similar a núcleo de una glicoproteína derivada de una levadura que pertenece al género *Pichia* se modifica tal como para suprimir al menos la producción de un producto funcional codificado por el ADN.

“Para al menos suprimir la producción de un producto funcional” quiere decir no sólo el caso en el que no se expresa el gen PNO1 y no se produce proteína Pno1 de tipo nativo según la presente invención, sino también el caso

en el que un producto obtenido, incluso si se expresa, no es idéntico a la proteína de Pno1 para la presente invención y la función está atenuada (es decir, el caso en el que el producto no tenga ninguna actividad de transferencia de fosfato de manosa poseída por la proteína Pno1 de tipo nativo y el caso en el que el producto tenga una actividad de transferencia de fosfato de manosa menor que aquella de la proteína Pno1 nativa).

La “levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia*” quiere decir una cepa de levadura que pertenece al género *Pichia* que tiene el gen PNO1 de tipo nativo y que mantiene la actividad de transferencia de fosfato de manosa original.

Por lo tanto, se pueden usar cualesquiera realizaciones para modificar un gen hasta que la realización haga la expresión del gen imposible o reduzca la expresión, o se puede usar un producto expresado usando gen PNO1 modificado que no tiene ninguna actividad de transferencia de fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo poseída originalmente por un producto de gen PNO1 de tipo nativo, o se puede usar un producto que tiene una actividad de transferencia de fosfato de manosa reducida comparada con la actividad de transferencia de fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo poseída originalmente por el producto del gen PNO1 de tipo nativo incluso si lo hace.

Las realizaciones incluyen, por ejemplo, una modificación en la que al menos un nucleótido se elimina de o se inserta dentro de la secuencia de bases de ADN del gen PNO1 y de la región promotora de PNO1 y una modificación en la que al menos un nucleótido está sustituido en la secuencia de bases en el gen PNO1 de tipo nativo y en la región promotora de PNO1. “Región promotora de PNO1” quiere decir un ADN que regula la expresión de gen PNO1 en el lado 5’ del gen PNO1. Las realizaciones incluyen también una modificación en la que al menos se añade un nucleótido en las secuencias de bases del gen PNO1 de tipo nativo y en la región promotora de PNO1. Tal modificación mueve la fase de lectura, de tal forma que el producto no puede expresarse o se expresa en una cantidad reducida incluso si se expresa, o la función del producto obtenido puede llegar a ser diferente de aquella de un producto derivado de un ADN de tipo nativo.

Los procedimientos de modificación adecuados incluyen un procedimiento en el que un gen marcador para una transformación se inserta en la región codificante del gen PNO1 de tipo nativo. Este procedimiento permite interrumpir ventajosamente el gen PNO1 de tipo nativo y permite rastrear fácilmente un mutante que tiene el gen PNO1 modificado usando el gen marcador introducido como un índice. También es posible insertar un gen que codifique una glicoproteína para producir además del gen marcador de transformación. Esto permite modificar el gen PNO1 y expresar la glicoproteína a producir simultáneamente en una operación.

Los genes marcadores de transformación para la presente invención incluyen gen HIS4, gen ARG4, gen URA3, gen SUC2, gen ADE 1, gen ADE 2, gen resistente G418, gen de resistencia a Zeocina y así sucesivamente, de *P. pastoris* o de *Saccharomyces cerevisiae*.

Con relación a los genes de glicoproteína, cualesquiera glicoproteínas deseadas de codificación de ADN a producir se pueden usar para la presente invención. Incluyen gen de antitrombina III (ATIII), gen de fibrinógeno, gen de cofactor de heparina II, gen de anticuerpos, gen de uroquinasa, gen de interferón α , gen de quimasa, gen inhibidor de tripsina urinaria y así sucesivamente.

Una interferidora de PNO1 según la presente invención se puede preparar por diversos procedimientos. Aquellos procedimientos incluyen la modificación del gen PNO1 de tipo nativo en una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* o la introducción de mutación aleatoria dentro de una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* seguida por la selección de un mutante que muestra la transferencia de fosfato de manosa suprimida comparada con una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia*. La modificación del gen PNO1 de tipo nativo en una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* se usa preferiblemente.

El procedimiento para preparar una cepa de levadura modificada que pertenece al género *Pichia* modificando el gen PNO1 de tipo nativo se puede llevar a cabo, concretamente, introduciendo ADN a transducirse en una posición específica del gen PNO1 de tipo nativo por el procedimiento de integración específico de sitio. Un ADN transducido se integra reemplazando el ADN de tipo nativo intrínseco de un huésped. Un procedimiento adecuado para introducir ADN a transducirse dentro de una posición objetivo de un huésped de levadura es preparar un fragmento de ADN lineal en el que se elimina el interior del fragmento de ADN del gen objetivo o se inserta un ADN de gen marcador de selección o un fragmento de ADN de expresión génica que codifica una glicoproteína. Así, se da dirección tal como para causar recombinación homóloga en un sitio específico de un ADN cuyo producto de expresión afecta la actividad de transferencia de fosfato de manosa por la transformación.

(3-2) Cepa de levadura que pertenece al género *Pichia* dentro de la que se importa oligonucleótido antisentido del gen PNO1

Con el fin de suprimir al menos la producción de un producto funcional codificado por el gen PNO1, también es posible construir un oligonucleótido antisentido contra el gen PNO1 para usar una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* dentro de la que se importa el oligonucleótido antisentido. En una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* dentro de la que se importa el oligonucleótido antisentido contra el gen PNO1, la transcripción de mRNA a partir del gen PNO1, la transferencia del mRNA transcrito del núcleo al citoplasma y la

traducción de la proteína Pno1 están inhibidas, de tal forma que la proteína Pno1 no se sintetiza. El oligonucleótido antisentido contra el gen PNO1 se puede sintetizar fácilmente por el procedimiento de sintetizar ADN bien conocido preferiblemente seleccionando una secuencia de base específica para el gen PNO1 en base a la secuencia de bases del gen PNO1 (SEC. ID N°: 2 en el listado de secuencias).

La transformación de una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* se puede llevar a cabo por un procedimiento usual adoptado en el campo tal como el procedimiento de esferoplastos [Creag, J. M. y col. Mol. Cell Biol. 5, 3376 (1985)], el procedimiento de cloruro de litio [Ito, H. y col. J. Bacterial. 153, 163 (1983)], el procedimiento de electroporación [Scorer, C.A. y col. J. Bio/technology 12, 181 (1994)] y así sucesivamente.

Aunque se pueden usar cualesquiera células huésped derivadas de levadura de tipo natural que pertenezcan al género *Pichia* para la transformación, se usan preferiblemente las levaduras metilotróficas que pueden usar metanol eficientemente como la única fuente de carbono y energía. Las levaduras metilotróficas adecuadas incluyen cepa GTS115 de *P. pastoris* auxotrófica (NRRL Y-15851) (his4), cepa GS190 de *P. pastoris* (NRRL Y-18014) (his4, ura3), cepa PPF1 de *P. pastoris* (NRRL Y-18017) (his4, arg4), cepa KM71H de *P. pastoris* (Invitrogen Co.) (his4, aox1::ARG4, arg4), cepa SMD1168 de *P. pastoris* (Invitrogen Co.) (his4, pep4), cepa SMD1168H de *P. pastoris* (Invitrogen Co.) (pep4), cepa PMAD11 de *P. methanolica* (Invitrogen Co.) (ade2-1), cepa PMAD16 de *P. methanolica* (Invitrogen Co.) (ade2-11, pep4D, prb1D), *P. pastoris* de tipo natural (NRRL Y-11430, NRRL Y-11431, X-33) y derivados de las mismas.

En el caso de que la célula huésped sea una cepa que carezca de al menos un gen marcador auxotrófico que se eliminara, es preferible usar un ADN que tenga el gen de marcador auxotrófico que se elimine de la célula huésped para la transducción. Un procedimiento tal tiene ventajas debido a que un transformante (cepa de levadura modificada que pertenece al género *Pichia*) cuyo gen PNO1 se modificó integrando un ADN para transducción se puede identificar y seleccionar rápida y simplemente. Con respecto también a una cepa de la que cualquier gen marcador auxotrófico no esté eliminado, se puede obtener fácilmente una cepa de levadura modificada que pertenece al género *Pichia* usando un gen de resistencia a fármaco tal como un gen de resistencia a G418 y un gen de resistencia a Zeocina como un gen marcador de selección.

Más preferiblemente, es efectivo usar una cepa de gen controlado de elongación de cadena de azúcar [patente japonesa abierta a inspección pública Hei 9-3097] como un huésped debido a que se puede producir una proteína a la que se añade la misma cadena de azúcar similar a núcleo que a la glicoproteína de mamíferos. Además, usar una cepa que tiene cadena de azúcar ácida reducida en cadena exterior de azúcar como un huésped, que se obtiene induciendo mutaciones por el tratamiento que usa un mutágeno tal como ácido etanometilsulfónico y similares o la exposición a radiación o a luz ultravioleta y así sucesivamente, seguido por usar un mutante menos teñido por Azul de Alcian [Ballow, C.E., Methods in Enzymology, 185, 440-470 (1990)], permitiría suprimir adicionalmente la transferencia de fosfato de manosa que se ha añadido a la cadena de azúcar similar a núcleo, de tal manera que ello sería muy efectivo.

(4) Procedimiento para producir proteína que tiene cantidad de fosfato de manosa en la cadena de azúcar reducida usando cepa de levadura de gen PNO1 controlado

Se puede preparar un sistema de expresión útil para producir una glicoproteína por diversos procedimientos que incluyen el procedimiento para la introducción de un ADN que codifica la glicoproteína dentro de la cepa de levadura modificada anteriormente mencionada que pertenece al género *Pichia*, el procedimiento para la transformación de una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* usando el ADN preparado insertando un ADN que codifica un gen marcador y un ADN que codifica la glicoproteína dentro de gen PNO1 de tipo nativo, el procedimiento para la mutación subsiguiente de un gen PNO1 de tipo nativo poseído por una cepa de levadura recombinante que pertenece al género *Pichia* teniendo un ADN que codifica la glicoproteína para la realización del gen PNO1 modificado según la presente invención y el procedimiento para la transformación simultánea de una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* usando el gen PNO1 anteriormente modificado y un ADN que codifica una glicoproteína.

La levadura que pertenece al género *Pichia* para expresar una proteína recombinante tiene, para la dirección de fase de lectura para transcripción, al menos 1) una región promotora, 2) un ADN que codifica una glicoproteína sustancialmente deseada y 3) una región de terminador de transcripción. Estos ADN se disponen de tal forma que un ADN que codifica una glicoproteína deseada se puede transcribir a RNA, es decir, pueden estar relacionados y funcionar cada uno respecto del otro.

Aunque para promotores para la presente invención se usan el promotor AOX1 (promotor para el primer gen de la alcohol oxidasa) de *P. pastoris*, el promotor AOX2 (promotor para el segundo gen de la alcohol oxidasa) de *P. pastoris*, el promotor DAS (promotor para el gen de la dihidroxiacetona sintasa) de *P. pastoris*, el promotor P40 (promotor para el gen P40) de *P. pastoris*, el promotor GAPDH (promotor para el gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) de *P. pastoris*, el promotor para el gen de aldehído deshidrogenasa de *P. pastoris*, el promotor para el gen de folato deshidrogenasa de *P. pastoris*, el promotor AUG1 (promotor para el gen de alcohol oxidasa) de *Pichia methanolica* y similares, preferiblemente se usa para ellos el promotor AOX1 de *P. pastoris* [por ejemplo, Ellis y col. Mol. Cell Biol., 5, 111 (1985), patente de los Estados Unidos n°: 4.855.231], más preferiblemente se usa para ello promotor AOX2 mutante modificado tal como para potenciar la eficiencia de expresión [Ohi, H., y col. Mol. Genet., 243, 489-499 (1994), patente japonesa abierta a inspección pública Hei 4-299984, patente de los Estados Unidos 5.610.036, documento EP 506.040].

Puede existir una secuencia señal de secreción codificante de ADN antes de un ADN que codifica una glicoproteína sustancialmente deseada. Un sistema de expresión de glicoproteína recombinante que tiene un ADN tal permite a una glicoproteína segregarse/producirse a partir de la célula huésped, de tal forma que una glicoproteína deseada pueda aislarse/purificarse fácilmente. Para la secuencia señal de secreción, se pueden usar cualesquiera ADN que funcionen en una levadura que pertenezca al género *Pichia* incluyendo un ADN que codifique una secuencia señal de secreción nativa relacionada con glicoproteínas, un ADN que codifique secuencia señal de SUC2 de *Saccharomyces cerevisiae*, un ADN que codifique secuencia señal de PHO1 de una levadura que pertenezca al género *Pichia*, un ADN que codifique secuencia señal de PCR1 de una levadura que pertenezca al género *Pichia*, un ADN que codifique secuencia señal de factor de apareamiento- α (α MF) de *Saccharomyces cerevisiae*, un ADN que codifique secuencia señal de lisozima C bovina y así sucesivamente.

Aunque cualesquiera ADN que codifiquen una glicoproteína que tenga estructura de cadena de azúcar en la molécula de proteína se pueden usar como un ADN que codifica una glicoproteína sustancialmente deseable, se usan preferiblemente los ADN que codifican glicoproteínas útiles farmacéuticamente incluyendo ATIII, fibrinógeno, cofactor II de heparina, anticuerpo, uroquinasa, interferón α , quimasa, inhibidor de tripsina urinaria y similares.

Para un terminador de transcripción usado para la presente invención, se puede usar cualquier terminador de transcripción que tenga un subsegmento que proporcione una señal de terminación para la transcripción a partir de un promotor. Puede ser el mismo que el del gen o diferente que el del gen de una fuente promotora, o puede obtenerse a partir de un gen que codifique una glicoproteína.

El sistema de expresión usado para la presente invención puede contener adicionalmente un marcador de selección además de la secuencia de ADN anterior. Los genes marcadores de selección usados incluyen gen HIS4, gen ARG4, gen URA3, gen SUC2, gen Ade1, GEN ADE2, gen de resistencia a G418 y gen de resistencia a Zeocina de *P. pastoris* o *S. cerevisiae* y así sucesivamente.

Una cepa de levadura que pertenezca al género *Pichia* transformada tal como para tener un fenotipo deseado puede producir una glicoproteína por cultivo usando un procedimiento usado usualmente en este campo. Cualquier condición de cultivo se puede usar tanto como sea adecuado para proliferación de la levadura que pertenece al género *Pichia* y para producción de una glicoproteína deseada.

Después del cultivo, se puede obtener una glicoproteína heteróloga deseada recogiendo células en el caso de producción intercelular o recogiendo el sobrenadante de cultivo en el caso de producción secretora, seguido por purificar usando un procedimiento bien conocido tal como el procedimiento de fraccionamiento, el procedimiento de intercambio iónico, el procedimiento de filtración a través de gel, la cromatografía de interacción hidrofoba, la cromatografía en columna de afinidad y así sucesivamente. Preferiblemente, una glicoproteína que tenga una cantidad más reducida de fosfato de manosa en la cadena de azúcar se puede purificar/obtener fraccionando una fracción de cadena añadida exterior de azúcar a partir de una fracción de cadena añadida de azúcar similar a núcleo, seguida por recoger la última.

(5) Glicoproteína producida

Las proteínas producidas usando cepa de levadura de gen PNO1 controlado según la presente invención son aquellas que tienen la estructura de cadena de azúcar en la molécula de proteína, e incluyen glicoproteínas útiles farmacéuticamente, por ejemplo, ATIII, fibrinógeno, cofactor de heparina II, anticuerpo, uroquinasa, interferón α , quimasa, inhibidor de tripsina urinaria y similares, pero no están limitados a ellos.

La glicoproteína producida por la presente invención se caracteriza porque la transferencia de fosfato de manosa de al menos la cadena de azúcar similar a núcleo está suprimida comparada con la glicoproteína derivada de una cepa de levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia*, al 10% o menos de la cadena de azúcar total, más preferiblemente al 1% o menos, por el decrecimiento en la cantidad de expresión o en la función de proteína Pno1 de una cepa de levaduras que pertenece al género *Pichia*. La glicoproteína producida por la presente invención se caracteriza porque tiene antigenicidad reducida contra los seres humanos y los mamíferos debido a que la transferencia de fosfato de manosa se suprime al menos para la cadena de azúcar similar a núcleo en la glicoproteína expresada que ha sido una duda en la glicoproteína producida en el sistema de expresión de levaduras en el caso de que se use como una medicina.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Aunque se dan más adelante ejemplos para describir la presente invención más en detalle, la presente invención no está limitada a ellos. Las enzimas, los reactivos y los kits usados en los ejemplos de la presente invención están comercialmente disponibles y se pueden usar según los procedimientos convencionales. Se conocen bien por aquellos expertos en la técnica o se pueden obtener de las bibliografías los protocolos usados en la clonación de los ADN, la determinación de las secuencias de bases, la transformación de las células huésped, el cultivo de las células transformadas, la purificación de los productos de cultivo resultantes y los análisis de cadena de azúcar.

Ejemplo 1

Obtener un gen que codifica una proteína de transferencia de fosfato de manosa derivada de una levadura que pertenece al género *Pichia*

(1) Amplificar/obtener gen MNN4 de *Saccharomyces cerevisiae* por el procedimiento de PCR

Con el fin de clonar un gen que se origina a partir de una levadura que pertenece al género *Pichia* y participa en la adición de fosfato, se planeó rastrear un gen homólogo usando, como una sonda, gen MNN4 que participa en la transferencia de fosfato de manosa en *S. cerevisiae*. El gen MNN4 de *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo primero usando el procedimiento de PCR basado en la secuencia de ADN revelada en la bibliografía [patente japonesa abierta a inspección pública Hei 4-26792]. La región usada como una sonda varía de la 25ª a la 2049ª siendo la 1ª la "A" del codón de iniciación.

Se sintetizaron los cebadores mostrados por las secuencias de bases de SEC. ID N°: 4 o de SEC. ID N°: 5 en el listado de secuencias. El cebador mostrado por las secuencias de bases de SEC. ID N°: 5 en el listado de secuencias tiene una secuencia de reconocimiento HindIII añadida en el extremo. Se extrajo el ADN cromosómico de la cepa AH22 de *Saccharomyces cerevisiae* (a, leu2 his4 can1) [Hinnen, A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)] con kit de extracción de ADN de Levaduras Nucleon MiY (Amersham Pharmacia) y se amplificó por kit de PCR Ex Taq (Takara Shuzo) usando cebadores mostrados por la secuencia de bases de SEC. ID N°: 4 o de SEC. ID N°: 5 en el listado de secuencias y se confirmó que se amplificó un fragmento de ADN de 1,6 kb. El ADN obtenido se digirió con ScaI y HindIII y el producto resultante se electroforesizó en agarosa y se aisló/purificó un fragmento de 1,4 kb usando Gene Clean II (Funakoshi) y se insertó entre los sitios de digestión ScaI y HindIII del vector plasmídico pUC19 usando un kit de ligación de ADN (Takara Shuzo).

El plásmido así obtenido se llamó "pTM002". Se confirmó que el ADN amplificado usando el procedimiento de PCR insertando dentro de pTM002 es una parte del gen MNN4 de *Saccharomyces cerevisiae* determinando una parte de la secuencia de bases de pYM002 usando un secuenciador de ADN (Pharmacia).

(2) Análisis de transferencia de Southern usando gen MNN4 de *Saccharomyces cerevisiae* como una sonda

Se usó un análisis de transferencia de Southern examinando si una región que hibrida al ADN que se clona dentro de pTM002 existe en el ADN cromosómico de una levadura que pertenece o no al género *Pichia*. El ADN cromosómico de la cepa GTS115 de *P. pastoris* se extrajo con kit de extracción de ADN de Levaduras Nucleon MiY (Amersham Pharmacia). El extracto obtenido se digirió con enzimas de restricción EcoRI, NotI, SacI, SpeI, XbaI y XhoI seguido por aplicación a electroforesis de gel de agarosa. El gel obtenido se transfirió sobre filtro de membrana de nailon Hybond-N después de desnaturalización con una base y neutralización subsiguiente, seguida por fijación por irradiación con rayos UV. La prehibridación se llevó a cabo según las instrucciones para kit DIG-ELISA (Boehringer Mannheim GmbH).

Por otro lado, se digirió pTM002 con ScaI y HindIII seguido por aplicación a electroforesis de gel de agarosa y se aisló un fragmento de 1,4 kb usando Gene Clean II (Funakoshi). Se llevó a cabo el marcado con digoxigenina según las instrucciones para kit de marcado de ADN DIG-ELISA (Boehringer Mannheim GmbH) y se llevó a cabo hibridación usando el producto obtenido como una sonda. El híbrido resultante se detectó según la instrucción para el kit de DIG-ELISA después de lavar dos veces en 0,5 x SSC, solución de SDS al 0,1% a 42°C durante 15 minutos. Como un resultado, se detectaron bandas cuando se usó cualquiera de los enzimas aunque ellas sean débiles: en particular se detectó una banda de 7,5 kb cuando se usó SpeI.

(3) Preparación de biblioteca de fagos e hibridación de placas

Se clono un fragmento objetivo en sitio SpeI usando λ ZapII (Stratagene). El vector no digerido λ ZapII (Stratagene) se digirió con SpeI y se trató con fosfatasa alcalina (Takara Shuzo). Por otro lado, se digirió el ADN cromosómico de cepa GTS115 de levadura que pertenece al género *Pichia* con SpeI seguido por aplicación de electroforesis en gel de agarosa y se escindió la región cerca de 7,5 kb.

La fracción obtenida se purificó usando Gene Clean II (Funakoshi) para ligar con el fragmento λ ZapII/SpeI, seguido por llevar a cabo empaquetamiento *in vitro* con Gigapack-GOLD3 Plus (Stratagene). La muestra resultante se absorbió en la cepa XL-1 Blue MRF de *Escherichia coli* que se hubo preparado tal como para dar una valor de DO₆₀₀ de 0,5 y se sometió a ensayo una valoración en una placa NZY que contiene IPTG y X-gal.

El fago recombinante se absorbió en la cepa XL-1 Blue MRF de *Escherichia coli* y se dispersó subsiguientemente en una placa NZY tal como para dar un número apropiado de placas. Estas placas se movieron a una membrana de nailon Hybond-N (Amersham Pharmacia) que se ha marcado de tal forma que se pueda reconocer la posición y se desnaturalizaron con una base seguida por neutralización y se fijaron subsiguientemente. La hibridación de placa se llevó a cabo según la instrucción para el kit de DIG-ELISA (Boehringer Mannheim) usando un fragmento de 1,4 kb como una sonda que se obtuvo digiriendo pTM002 con ScaI y HindIII y se marcó con digoxigenina. El lavado se llevó a cabo dos veces en SCC 0,5X, solución al 1% de SDS a 42°C durante 15 minutos y la detección se llevó a cabo según la instrucción del kit DIG-ELISA. Como un resultado, se detectaron placas que muestran reacciones positivas.

Después de que el fago se fabricó para amplificar, se añadieron cepa XL-1 Blue MRF y fago auxiliar que ayuda a Ex incubando a 37°C durante 15 minutos. Después se añadió medio LB al cultivo durante toda una noche. El cultivo resultante se incubó a 65°C durante 20 minutos y se centrifugó dando un sobrenadante, que se añadió a una suspensión de cepa SOLR de *Escherichia coli* seguido por diseminación en una placa de LB que contiene ampicilina. Un ADN de plásmido se extrajo por el procedimiento de Mini-Prep a partir de una colonia de *E. coli* que apareció. Un plásmido tal que se insertó un fragmento de 7,5 kb en pBluescript se seleccionó y se llamó “pTM004”.

El mapa de enzimas de restricción de pTM004 se preparó como se ilustra en figura 2. El ADN cromosómico de cepa GTS115 de *P. pastoris* se digirió con EcoRI, NotI, SacI, SpeI, XbaI y XhoI y la electroforesis se llevó a cabo en los fragmentos resultantes preparando dos membranas de nailon sobre las que se transfirió el gel. Después, se llevaron a cabo los análisis de prueba de bandas de Southern en los que un fragmento de 7,5 kb digerido con SpeI derivado de pTM004 que se purificó y marcó con digoxigenina se usó como una sonda para una membrana y un fragmento de 1,4 kb digerido por ScaI y HindIII derivado de pTM002 se usó como una sonda para la otra. Como un resultado, los patrones de bandas detectados en dos membranas estuvieron en buen acuerdo mostrando que se clonó la región objetivo.

(4) Determinación de la secuencia de bases

La secuencia de bases del fragmento clonado de pTM004 se determinó usando un secuenciador de ADN (Pharmacia) después de la reacción usando un kit de secuenciación de ADN de Auto Lectura (Pharmacia). Se diseñó un cebador tal como para ser capaz de leer del lado 3' al lado 5' en base a la secuencia que se obtuvo usando RV marcado con cebador FITC unido en el kit. El análisis de secuencia se llevó a cabo seriamente. Se diseñó otro cebador tal como para ser capaz de leer en dirección hacia atrás para llevar a cabo un análisis de secuencia

Se usó ADNSIS (Hitachi Soft Engineering) para la edición. La búsqueda de una fase de lectura abierta (ORF) en base a la secuencia de bases obtenida (SEC. ID N°: 2 en el listado de secuencias) reveló que codifica una proteína constituida por 777 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de bases obtenida se muestra como SEC. ID N°: 3. Esta proteína tenía un dominio transmembrana en su lado N-terminal. La región del aminoácido 450° al aminoácido 606° mostró un valor de homología del 45% a la proteína Mnn4 de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que otra región mostró sólo un valor de homología bajo (figura 3).

Esta proteína constituida por 777 aminoácidos era más corta que la proteína Mnn4 de *Saccharomyces cerevisiae* constituida por 1137 aminoácidos. Además, la secuencia repetida KKKKEEEE en el lado C terminal que juega un papel importante en la función de la proteína Mnn 4 no se encontraba en esta proteína [Jagami, Y. y Odani, T. Biochim. Biophys. Acta, 1426, 335-345 (1999)]. Aunque una parte del gen clonado es homóloga al gen MNN4 de *Saccharomyces cerevisiae*, se asume que el gen clonado tiene (una) función/funciones distinta(s) y se llamó “gen PNO1”.

Ejemplo 2

Preparación de levadura de gen PNO1 controlado que pertenece al género *Pichia*

(1) Preparación de plásmido para controlar gen PNO1

La cepa de gen PNO1 controlado se preparó examinando las propiedades de la cepa y de una proteína expresada tal como para dilucidar la función del gen PNO1 de una cepa de levadura que pertenece al género *Pichia*. Para este propósito, el gen PNO1 en el cromosoma de una levadura que pertenece al género *Pichia* se interrumpió como un medio de control. Al mismo tiempo, se planeó preparar una cepa que expresa ATIII (antitrombina III) humana como un ejemplo de glicoproteína.

ATIII es una proteína de cadena simple constituida por 432 aminoácidos con un peso molecular alrededor de 58 kDa que existe en plasma humano normal a aproximadamente 150 mg/l que tiene cuatro sitios de adición de cadena de azúcar unida a asparragina. Tiene una actividad de inhibir un amplio intervalo de serina proteasas tipo tripsina incluyendo trombina y factor Xa y es un inhibidor de proteasa sérica que juega un papel importante en el mecanismo de controlar la coagulación de la sangre. Se usó como un material vector pRH101 (figura 4) expresando gen ATIII humano en una levadura que pertenece al género *Pichia*. El gen ATIII humano se deriva de pTY007 descrito en la bibliografía [Yamauchi, T. y col., Biosci. Biotech. Biochem., 56, 600 (1992)]. El plásmido para controlar gen PNO1 se preparó como se describe a continuación.

Primero, se ligaron pTM004 digerido con PstI y SmaI y pUC19 digerido con PstI y SmaI usando un kit de ligación de ADN (Takara Shuzo). Se transformó célula competente de *Escherichia coli* (DH5 Competent High, Toyobo). Se extrajeron plásmidos por el procedimiento de Mini-Prep a partir de las colonias que aparecieron y se seleccionó el plásmido objetivo y se llamó pTM006. pTM006 se digirió con SacI y BamHI seguido por hacer romos sus extremos usando un kit de hacer romos los extremos de ADN (Takara Shuzo) y por llevar a cabo una autoligación preparando pMM125.

Por otro lado, se digirió pRH101 con DraI y NaeI aislando un fragmento que contiene gen HIS4 y unidad de expresión ATIII que está compuesta de promotor mAOX2, secuencia líder de secreción de SUC2, gen de ATIII humano y terminador AOX1. Además, se digirió pMM125 con HpaI y EcoRV seguido por ligación con el fragmento

anterior conteniendo unidad de expresión de ATIII humana y gen HIS4 y después se llevó a cabo transformación de *Escherichia coli* usando célula competente de *E. coli* (DH5 Competent High, Toyobo). Se extrajeron plásmidos por el procedimiento de Mini-Prep a partir de las colonias que aparecieron y se seleccionó el plásmido objetivo y se llamó pTM009 (fig. 5).

(2) Preparación de cepa de levadura de gen PNO1 controlado que pertenece al género *Pichia*

Se llevó a cabo digestión de pTM009 con PstI y SpeI seguida por transformación de cepa de levadura GTS115 que pertenece al género *Pichia* usando un Kit de Transformación Yeast Maker (Clontech) por el procedimiento del cloruro de litio. Se dispersaron las células en una placa de selección y se incubaron a 25°C. Se aisló un clon que aparece a una colonia individual. El ADN cromosómico del mismo se extrajo usando un kit de extracción de ADN de Levaduras Nucleon MiY (Amersham Pharmacia) y se digirió con enzima SpeI o con ambas enzimas SpeI y PstI para llevar a cabo electroforesis y transferir a una membrana de nailon. El análisis de prueba de bandas de Southern se llevó a cabo usando un fragmento unido a digoxigenina de 0,6 kb obtenido digiriendo pRH101 con SacII y SacI como una sonda de gen ATIII y un fragmento marcado con digoxigenina de 1,5 kb obtenido digiriendo pTM004 con EcoRI como una sonda del gen PNO1.

Se seleccionó una cepa, que dio una banda de 13 kb en la membrana usando SpeI en el caso de una sonda de gen de ATIII y dio una banda de 8,2 kb en una membrana usando tanto SpeI como PstI en el caso de una sonda del gen PNO1 y se llamó “cepa 9G4”. La cepa 9G4 carece de 432 pares de bases de sitio HpaI a sitio EcoRV del gen PNO1 cromosómico, donde la unidad de expresión de ATIII y la unidad de expresión de HIS4 se insertan en vez de ellas (figura 6).

Ejemplo 3

*Análisis de propiedades de cepa de levadura de gen PNO1 controlado perteneciente al género *Pichia* y de glicoproteína producida*

(1) Tinción con Azul de Alcian de cepa de levadura de gen PNO1 controlado perteneciente al género *Pichia*

Azul de Alcian es un tinte basado en ftalocianina básica. La tinción con Azul de Alcian se usa como un procedimiento simple evaluando un grado de grupo fosfato que da una carga negativa principal en la pared celular [Ballou, C.E., Methods in Enzymology, 185, 440-470 (1990)]. Aunque Azul de Alcian tiñe células de tipo natural de *Saccharomyces cerevisiae*, no tiñe células de mutante en el gen MNN4 de *S. cerevisiae*. Estos resultados muestran que la fosforilación de la cadena exterior de azúcar se suprimió en el último caso. Por lo tanto, las propiedades de tinción de cepa de levadura controlada por gen PNO1 que pertenece al género *Pichia* se compararon con aquellas de una cepa de levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* o con aquellas de mutante en gen MNN4 de *S. cerevisiae*.

Se cultivaron cada una de cepa 9G4 de gen PNO1 controlado, cepa GTS115 de levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* y cepa LB6-5D mutante en gen MNN4 de *Saccharomyces cerevisiae* (MAT α , mnn4-1, suc2, ma1, CUP1) (ATCC 52524) en 3 ml de medio YPD durante 72 horas. Las células se cosecharon y se tiñeron con solución de Azul de Alcian al 0,1% en ácido clorhídrico 0,02 N a temperatura ambiente durante 20 minutos, dando como resultado que la cepa LB6-5 permaneció blanca, mientras que las cepas GTS15 y 9G4 se tiñeron de azul en grados similares. Este resultado indicó que la cepa de gen PNO1 controlado y la cepa LB6-5 tienen diferentes cadenas de azúcar de superficie celular, es decir, la proteína Pno1 es diferente de la proteína Mnn4 y no participa así en la fosforilación de cadena exterior de azúcar.

(2) Preparación de cepa de levadura de tipo natural que produce ATIII humana recombinante que pertenece al género *Pichia*

Se preparó una cepa de levadura de tipo natural que produce ATIII humana recombinante que pertenece al género *Pichia* con el fin de tener un control para la comparación con la ATIII humana recombinante producida por la cepa de levadura de gen PNO1 controlado que pertenece al género *Pichia*. Un plásmido pRH101 de expresión de ATIII humana (fig. 4) se digirió con SalI y se transformó en cepa GTS115 de *P. pastoris* usando el procedimiento del cloruro de litio. Una cepa en la que estaba integrada una copia de pRH101 dentro de locus del gen his4 cromosómico se seleccionó por el análisis de prueba de bandas de Southern y se llamó “cepa RH101”.

(3) Cultivo de fermentador de recipiente y purificación de ATIII humana recombinante

Cada una cepa de RH101 de levadura de tipo natural que produce ATIII que pertenece al género *Pichia* y cepa 9G4 de gen PNO1 controlado que produce ATIII humana se cultivó usando un fermentador de recipiente 3-L (BDM-3, ABLE corp.). Las células se dejaron proliferar en un medio que contenía glicerol, seguido por suministrar un medio que contenía metanol como una fuente de carbono. El grado de proliferación como se mide por DO₄₅₀ y la cantidad de ATIII producida como se mide por el procedimiento de ELISA (procedimiento de ensayo inmunoabsorbente unido a enzima), se ilustran en la figura 7. Las cepas RH101 y 9G4 mostraron perfiles similares con respecto al grado de proliferación y a la cantidad de ATIII producida y no se observó diferencia remarcable por controlar gen PNO1.

Cada una de las cepas 9G4 y RH101 se hizo proliferar en el fermentador de tanque hasta que un valor de DO_{540} alcanzó 700 y se recogió el sobrenadante de cultivo. Analizar el sobrenadante de cultivo por SDS-PAGE y prueba de transferencia Western permitió detectar una fracción principal de ATIII recombinante producido en la misma posición que aquella de ATIII derivado de plasma así como una fracción menor de polímero altamente glicosilado con respecto a ambas cepas. La fracción principal se purificó por la cromatografía en columna de heparina, la cromatografía de intercambio catiónico, la filtración de gel y la ultrafiltración secuencialmente en este orden dando un producto purificado de ATIII recombinante.

(4) *Confirmación de adición de fosfato a cadena de azúcar de ATIII humana recombinante producida por levadura de tipo natural*

Usando el producto purificado de ATIII recombinante producido por la cepa RH101, la cadena de azúcar se escindió usando Glicopeptidasa F (Takara Shuzo) [Plummer, T.H. y col., J. Biol. Chem., 259, 10700-10704 (1984)]. La cadena de azúcar se purificó usando un kit de preparación de glicano de cartucho de celulosa (Takara Shuzo) y el extremo reductor se marcó con 2-aminopiridina ("piridilaminado") [Hase, S., y col., J. Biochem., 85, 217-220 (1979)]. El análisis usando una columna de intercambio aniónico (DEAE-5PW, Toso) [Nakagawa, H., y col., Anal. Biochem., 226, 130-138 (1995)] reveló que la cadena de azúcar no contenía sólo una cadena de azúcar neutral sino también dos clases o más de cadena de azúcar ácida (fig. 8A).

Se purificó la fracción que se considera que tiene una carga eléctrica de 1 y se hidrolizó de forma ácida con ácido clorhídrico 0,1 N a 100°C durante 30 minutos. Se sabe que esta reacción escinde el enlace entre manosa (Man) y fosfato en un extremo no reductor [Tieme, T.R. y col., Biochemistry, 10, 4121-4129 (1971)]. Después de la reacción, la cadena de azúcar se convirtió en una cadena de azúcar ácida que tiene un grupo fosfato en el extremo no reductor. En este momento, la carga eléctrica llegó a ser 2 (fig. 8B). Después, se afectaron 0,6 unidades de una fosfatasa alcalina (Takara Shuzo) que es una enzima que hidroliza el grupo fosfato terminal en una solución de Tris-HCl 50 mM, pH 9, solución de $MgCl_2$ 1 mM a 65°C durante 3 horas. Esta reacción eliminó el grupo fosfato dando una cadena de azúcar neutral. Así, se reveló que la cadena de azúcar ácida que se añadió a la ATIII recombinante estaba fosforilada (figura 8C).

(5) *Comparación de fosforilación en cadena de azúcar entre ATIII recombinante humana derivada de levadura de tipo natural y ATIII recombinante humana derivada de cepa de gen PNO1 controlado*

Un producto purificado de ATIII recombinante producida por cepa RH101 o cepa 9G4 se piridilaminó en una manera similar a la descrita anteriormente. Una cadena de azúcar neutral y una cadena de azúcar ácida se separaron una de otra por la cromatografía en columna aniónica (DEAE-5PW, Toso). Finalmente, los especímenes se analizaron usando una columna de amida (Amida-80, Toso) que permite eluir cadenas de azúcar por orden de tamaño [Tomiya, N. y col., Anal. Biochem. 171, 73-90 (1988)] para comparar áreas de cadenas de azúcar en ambas cepas.

Se estimó que las fracciones de cadenas de azúcar neutral eran cadenas de azúcar altas en manosa que constaban principalmente de 9 a 12 moléculas de manosa (figuras 9A y B). Se calcularon los contenidos de cadena de azúcar ácida que se habían añadido a ATIII recombinante derivada de cepas RH101 y 9G4 usando la ecuación (área total de cadena de azúcar ácida)/(área total de cadena de azúcar neutral + área total de cadena de azúcar ácida), siendo el 26% con cepa RH101 y siendo el 1% con cepa 9G4, es decir, el contenido de cadena de azúcar ácida estaba bastante reducido en la última (figura 9).

Los resultados anteriores muestran que el número de grupos fosfato añadidos a la cadena de azúcar de tipo núcleo de la glicoproteína producida por la cepa de gen PNO1 controlado está remarcablemente reducido comparado con aquel de la levadura de tipo natural. El porcentaje de cadena de azúcar ácida añadida a la cadena de azúcar similar a núcleo por cadena de azúcar total fue menor de 30 con respecto a cepa de gen MNN4 controlado de *Saccharomyces cerevisiae* [patente japonesa abierta a inspección pública Hei 9-266792], mientras que el de cepa de levadura de gen PNO1 controlado que pertenece al género *Pichia* fue 1, es decir, el procedimiento según la presente invención fue más excelente que el procedimiento convencional reduciendo la cadena ácida de azúcar.

El grado de reducción de la cadena de azúcar ácida añadida a la cadena de azúcar similar a núcleo con respecto a la cepa de gen MNN4 controlado de *Saccharomyces cerevisiae* fue menor que con la cepa de tipo natural [patente japonesa abierta a inspección pública Hei 9-266792], mientras que el de cepa de levadura de gen PNO1 controlado que pertenece al género *Pichia* fue 1/26 de aquel de la cepa de tipo natural, es decir, la cadena de azúcar ácida estaba considerablemente reducida. La homología entre gen MNN4 de *S. cerevisiae* y gen PNO1 de una levadura que pertenece al género *Pichia* es baja exceptuando algunas partes y los grados de tinción de Azul de Alcina son diferentes entre la cepa de gen MNN4 controlado de *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa de levadura de gen PNO1 controlado que pertenece al género *Pichia*. Por lo tanto, se sugiere que el gen PNO1 es un gen novedoso que tiene una función diferente de aquella del gen MNN4.

(6) *Comparación de antigenicidad entre ATIII humana recombinante derivada de levadura de tipo natural y ATIII humana recombinante derivada de cepa de gen PNO1 controlado*

Se obtuvieron los antisueros contra cada ATIII humana recombinante inmunizando con ATII humana recombinante derivada de una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* y con ATIII humana recombinante derivada

de una cepa de gen PNO1 controlado a conejos macho blancos japoneses de 12 semanas de edad (Kitayama Rabes) conjuntamente con coadyuvante de gel de hidróxido de aluminio (SERAVA).

La inhibición de la reacción de cada antisuero con un antígeno por ATIII humana derivada de plasma, es decir, la inhibición de la reacción de unión de ATIII humana recombinante inmovilizada derivada de una cepa de gen PNO1 controlado con un antisuero por ATIII humana derivado de plasma, se evaluó por ELISA. Como un resultado, se reveló que la inhibición tiene lugar a una concentración menor de ATIII humana derivada de plasma en la reacción con anticuerpo anti-ATIII humana recombinante derivada de cepa de gen PNO1 controlado que en la reacción con anticuerpo anti-ATIII humana recombinante derivada de levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia* (figura 10). Por lo tanto, se consideró que un epítipo específico para ATIII humana recombinante derivada de una levadura está disminuido en ATIII humana recombinante derivada de una levadura comparado con ATIII humana recombinante derivada de una levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia*.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona una proteína que participa en la adición de fosfato de manosa a la cadena de azúcar de una glicoproteína derivada de una levadura que pertenece al género *Pichia* y de un gen que codifica la proteína por primera vez. Proporcionar la proteína que participa en la adición de fosfato de manosa a la cadena de azúcar de la glicoproteína y el gen que codifica la proteína es útil porque puede ser una base para dilucidar el mecanismo de la adición de fosfato de manosa a la cadena de azúcar de la glicoproteína en levaduras. La presente invención permite proporcionar una levadura que pertenece al género *Pichia* que produce una glicoproteína útil farmacéuticamente que reduce remarcablemente la adición de fosfato a la cadena de azúcar. Usar una cepa de levadura que pertenece al género *Pichia* según la presente invención permite producción de glicoproteína útil farmacéuticamente con reducción remarcable de la adición de fosfato a la cadena de azúcar. Una glicoproteína producida usando un medio según la presente invención tiene cadena de azúcar en la que la adición de fosfato está remarcablemente reducida, de tal forma que se considera que la glicoproteína es menos antigénica para seres humanos y mamíferos y es útil farmacéuticamente.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para suprimir la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa en una levadura que pertenece al género *Pichia*, en el que se suprime un gen que tiene la secuencia de bases de SEC. ID N°: 2 en el listado de secuencias y que participa al menos en la adición de fosfato de manosa a una cadena de azúcar en la cadena de azúcar similar a núcleo de una glicoproteína introduciendo mutación/mutaciones dentro de dicho gen o usando un polinucleótido que tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de dicho gen.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que suprimir el gen anterior es suprimir el gen que contiene la secuencia de bases mostrada por al menos 60 bases consecutivas del extremo 5' de la secuencia de bases que codifica una proteína en la secuencia de bases de SEC. ID N°: 2 en el listado de secuencias y participa en la formación de la cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa en una levadura que pertenece al género *Pichia*.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la(s) mutación/mutaciones están seleccionadas de una delección, sustitución, inserción, y/o adición dentro del gen.
4. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que controlar el gen anterior es suprimir la expresión del gen usando un polinucleótido que tiene una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases del gen.
5. Un polinucleótido que contiene la secuencia de bases mostrada por los nucleótidos del 150° al 2480° de la secuencia de bases de SEC. ID N°: 2 en el listado de secuencias que codifica la proteína que participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo derivado de una levadura que pertenece al género *Pichia*.
6. Un polinucleótido modificado tal como para ser capaz de reducir la relación de la cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo de una glicoproteína respecto a la cadena de azúcar total al 10% o menos introduciendo mutación/mutaciones tales como sustitución, delección, inserción, y/o adición dentro de un polinucleótido que contiene la secuencia de bases mostrada por los nucleótidos del 150° al 2480° de la secuencia de bases de SEC ID N°: 2, en donde la proteína según se codifica tiene una homología del 70% o más con los aminoácidos de la proteína que contiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en el listado de secuencias.
7. Un vector recombinante que tiene el polinucleótido según la reivindicación 6.
8. Un transformante transformado por el vector recombinante según la reivindicación 7.
9. Un transformante según la reivindicación 8, en el que el huésped transformado por el vector recombinante es una levadura que pertenece al género *Pichia*.
10. Un procedimiento para producir una glicoproteína, en el que el procedimiento utiliza el procedimiento según la reivindicación 1, 2, 3 ó 4 o utiliza el transformante según la reivindicación 9 para producir una glicoproteína heteróloga por la técnica de ingeniería genética que usa una levadura que pertenece al género *Pichia* como un huésped.
11. Una proteína seleccionada del grupo constituido por:
 - (1) una proteína mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 en el listado de secuencias;
 - (2) una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 en el listado de secuencias;
 - (3) una proteína que tiene una homología del 70% o más con la secuencia de aminoácidos de la proteína (2) anteriormente mencionada y que participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo de una glicoproteína producida por una levadura que pertenece al género *Pichia*; y
 - (4) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N: 1 en el listado de secuencias en el extremo N-terminal y que participa en la formación de una cadena de azúcar que tiene fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo de una glicoproteína producida por una levadura que pertenece al género *Pichia*.
12. Un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína según la SEC. ID N°: 3 en el listado de secuencias.
13. Una glicoproteína que contiene fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo de dicha glicoproteína producida según un procedimiento según la reivindicación 1, 2, 3 ó 4, **caracterizada** porque la glicoproteína tiene una cantidad de fosfato de manosa en la cadena de azúcar similar a núcleo de dicha glicoproteína que se reduce en al menos el 90% comparada con la glicoproteína derivada de una cepa de levadura de tipo natural que pertenece al género *Pichia*.
14. Glicoproteína según la reivindicación 13, seleccionada del grupo constituido por ATIII, fibrinógeno, cofactor II de heparina, un anticuerpo, uroquinasa, interferón α , quimasa, e inhibidor de tripsina urinaria.

Fig.1

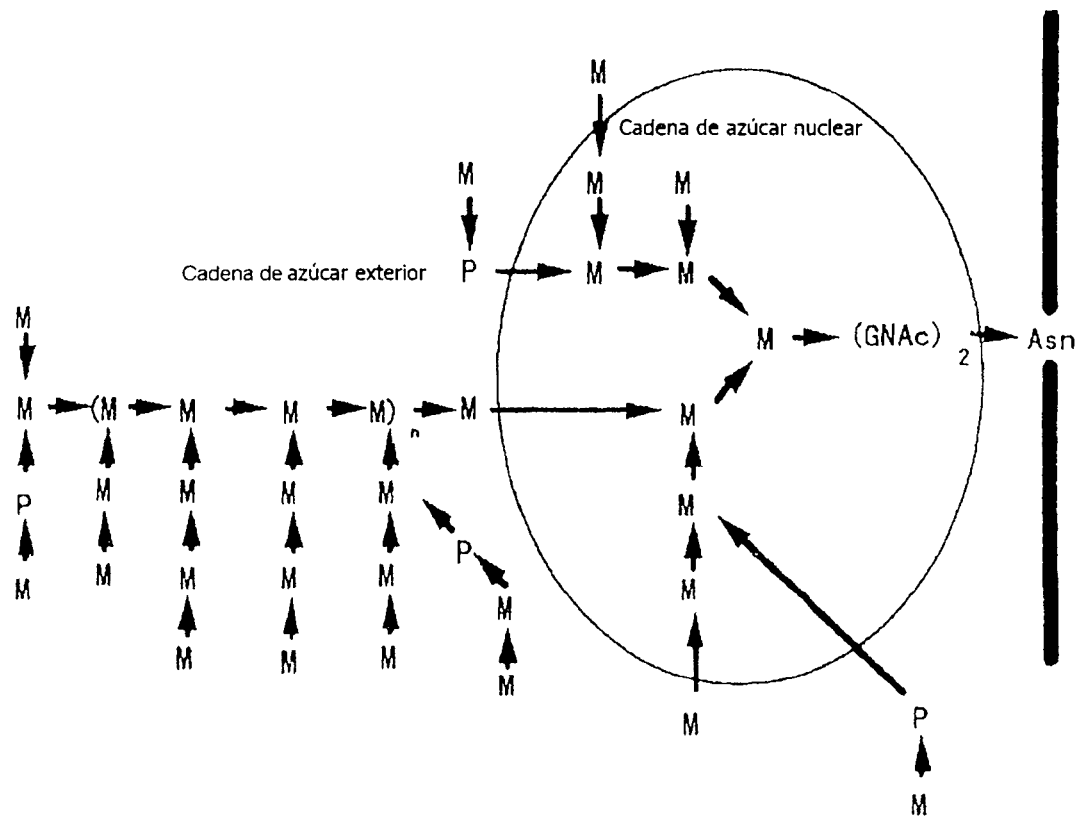


Fig.2

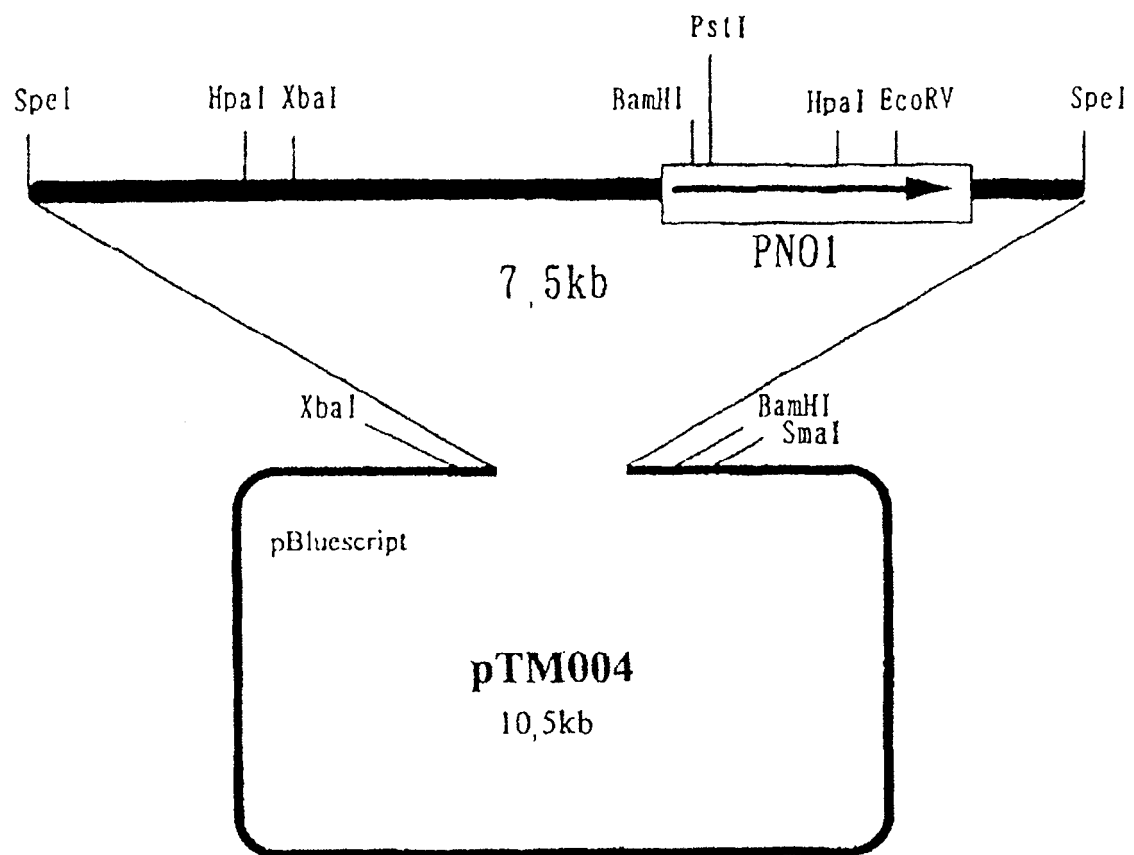


Fig.3

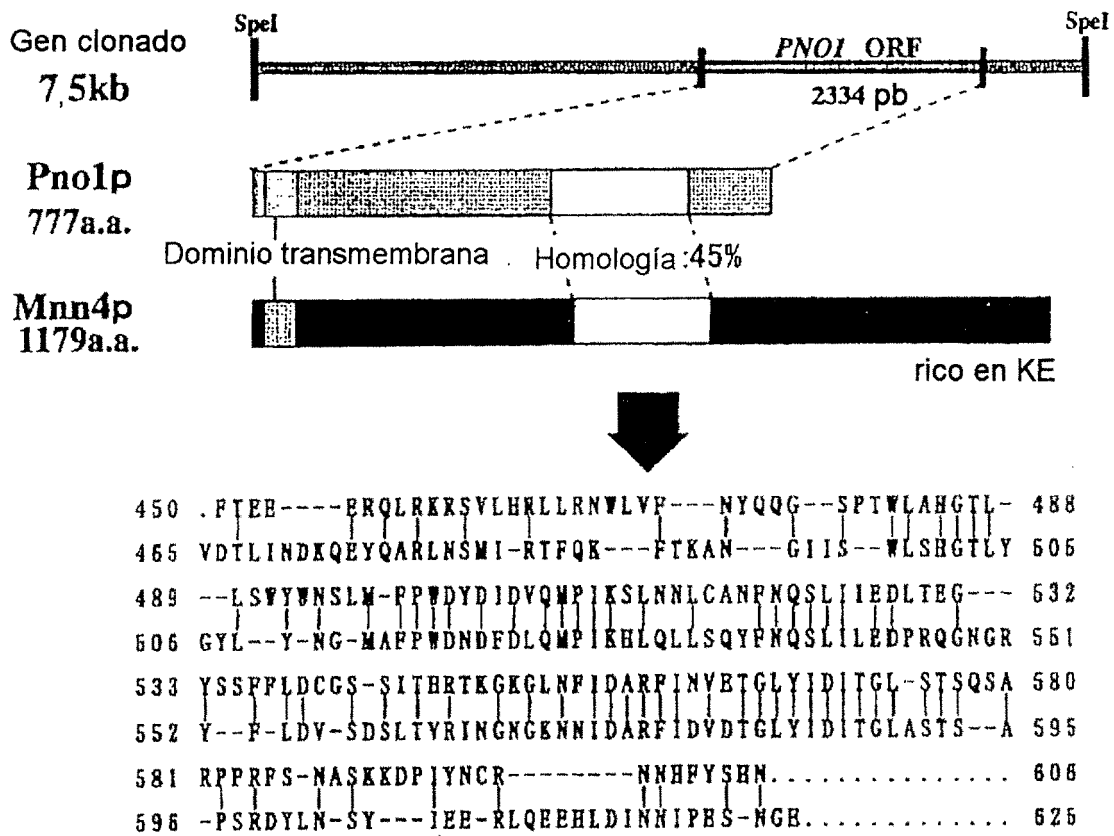


Fig.4

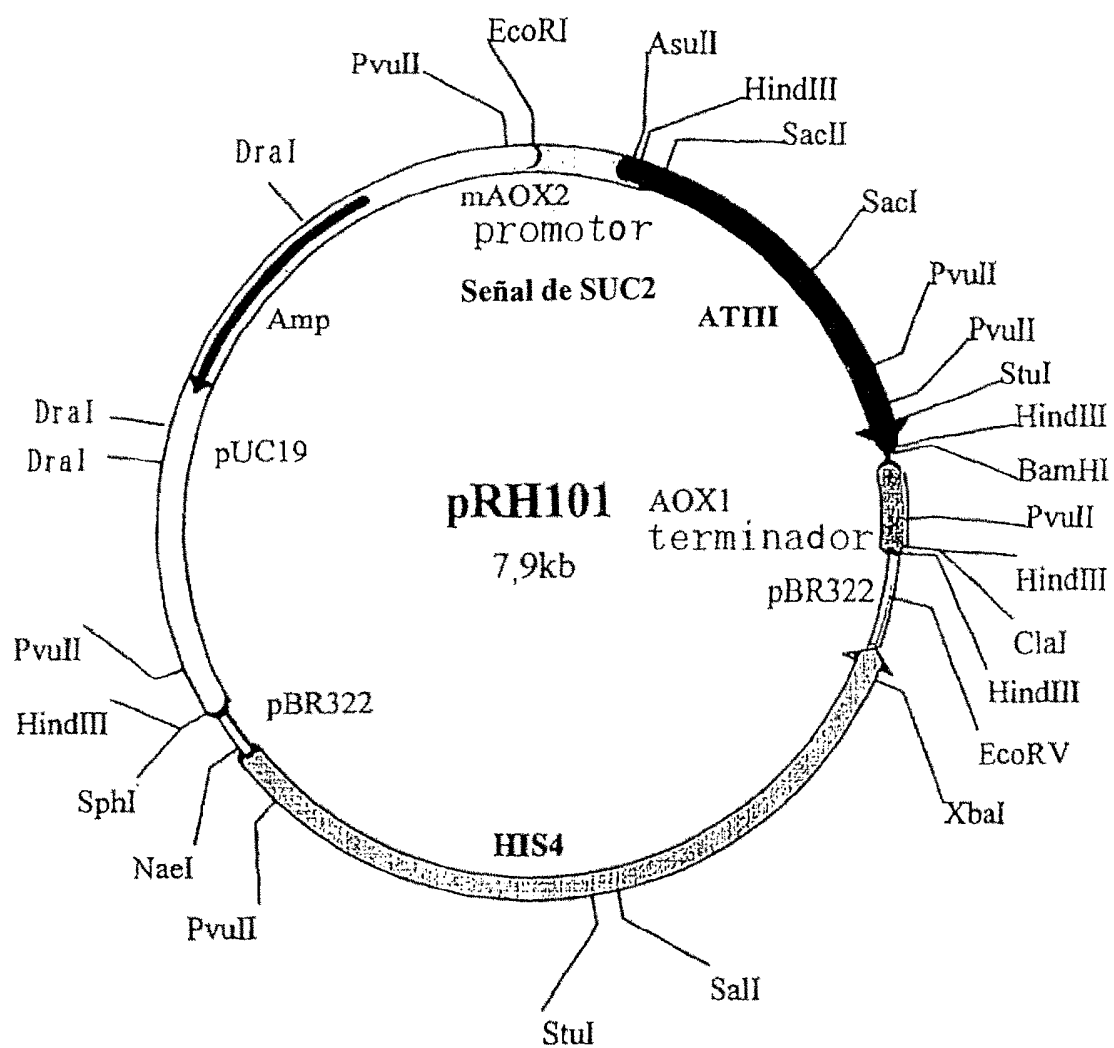


Fig.5

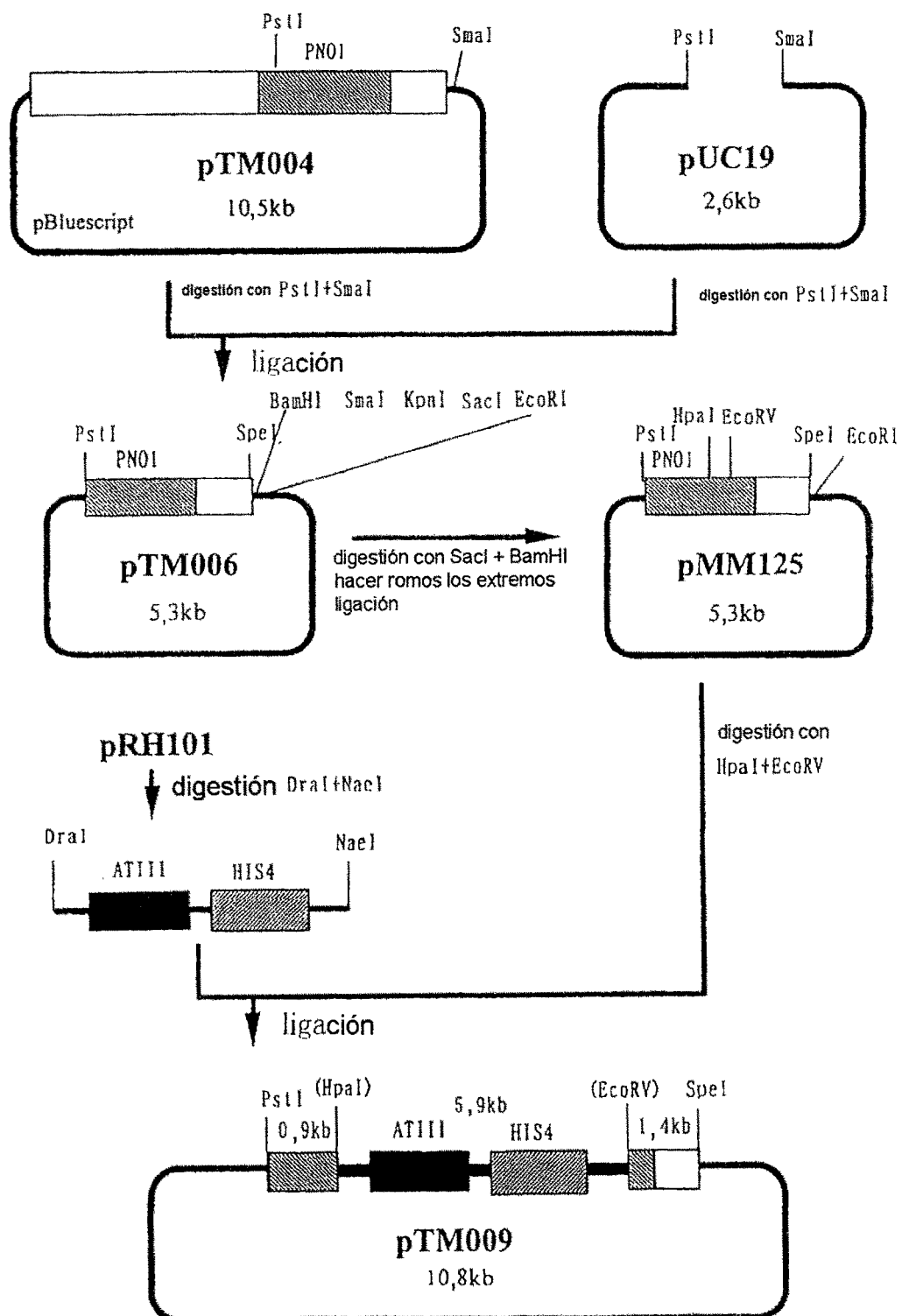


Fig.6

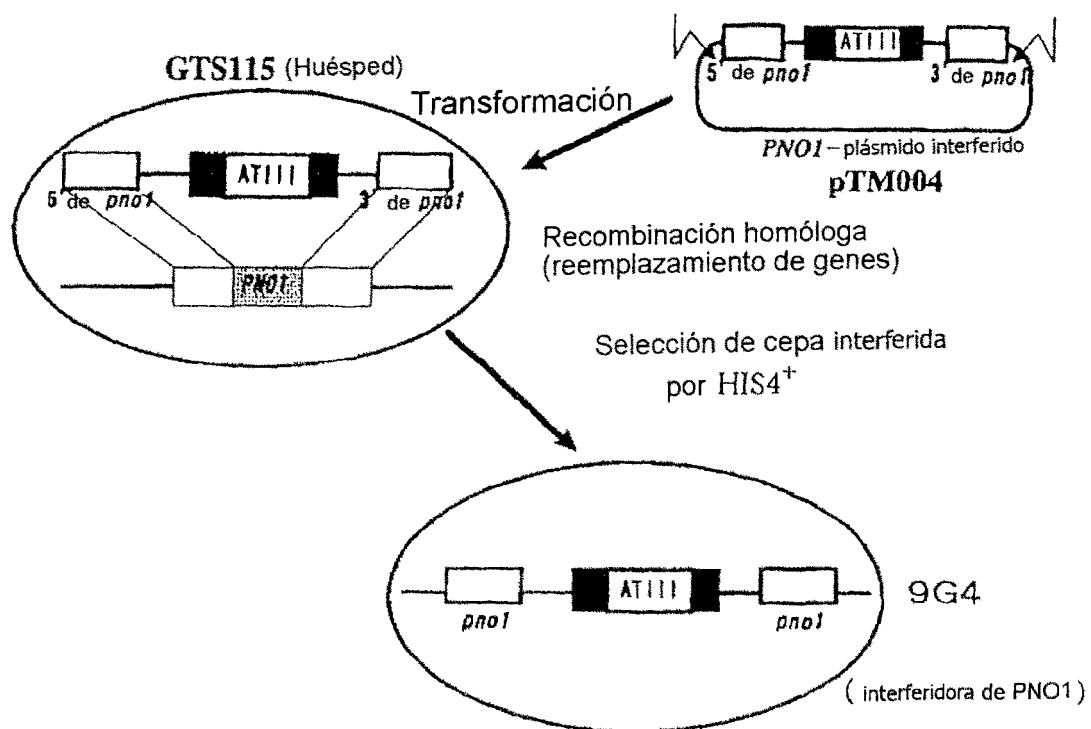


Fig.7

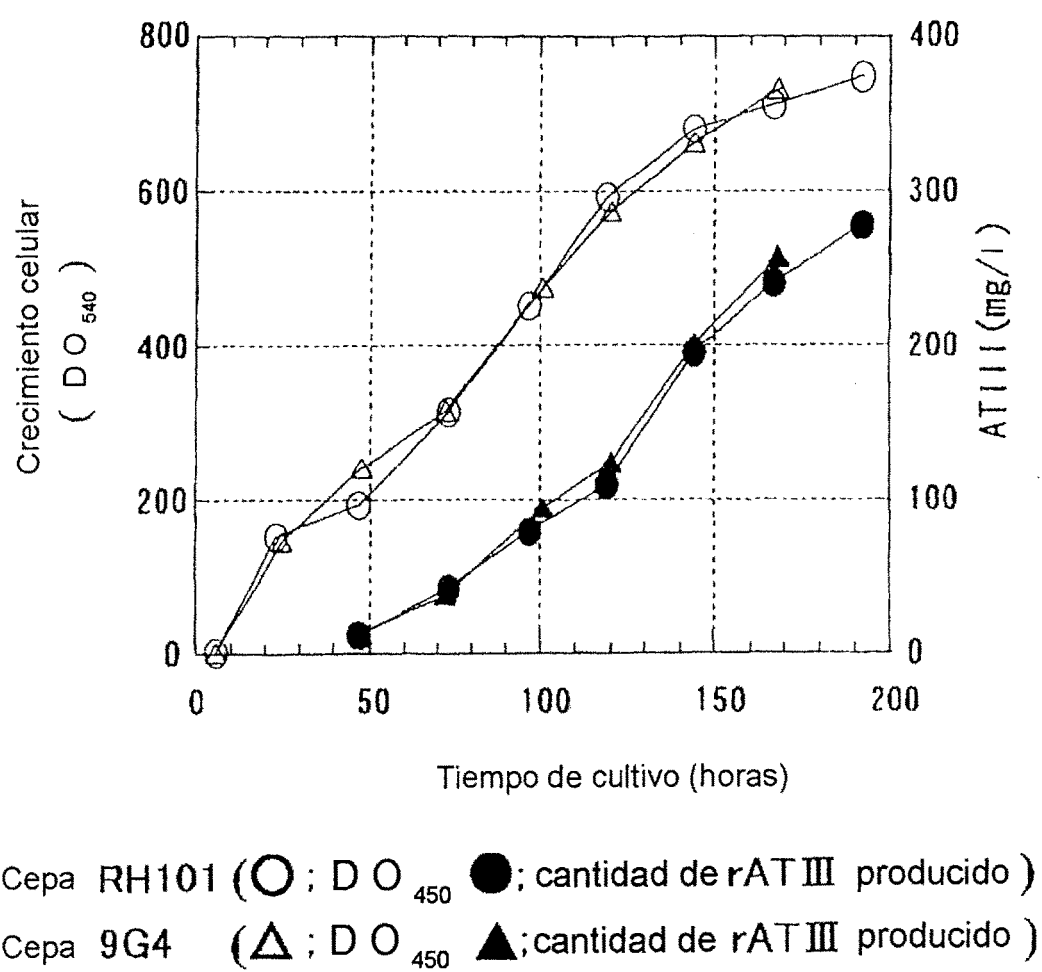
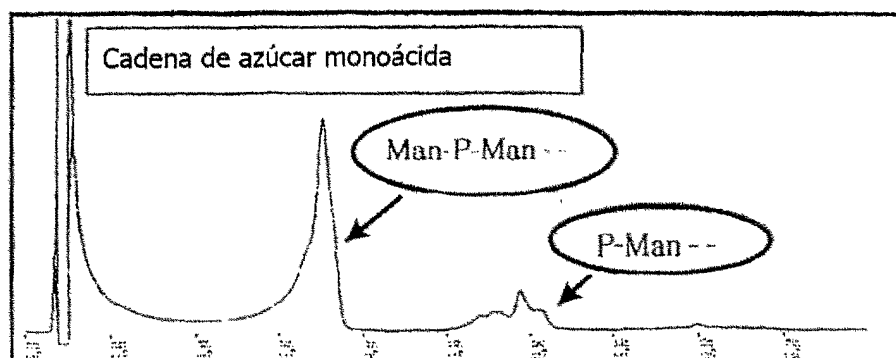
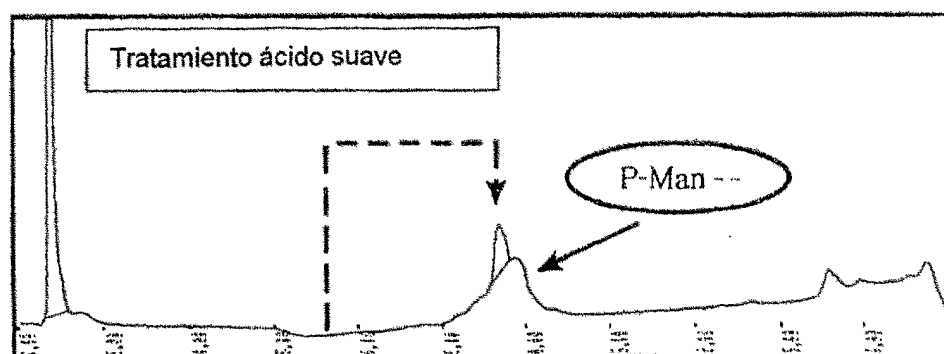


Fig.8

(A)



(B)



(C)

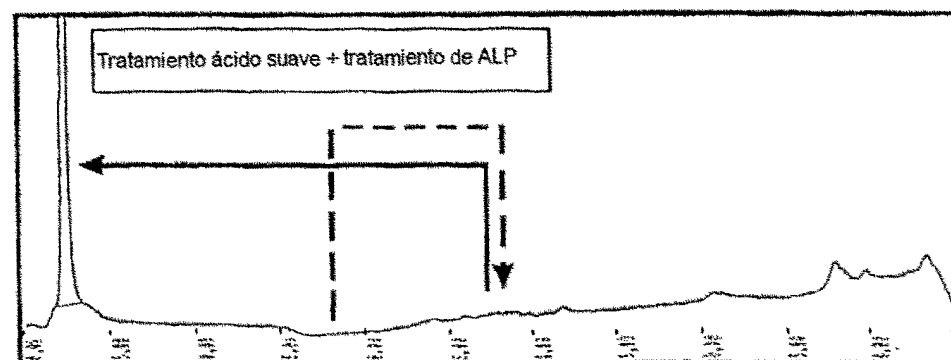


Fig.9

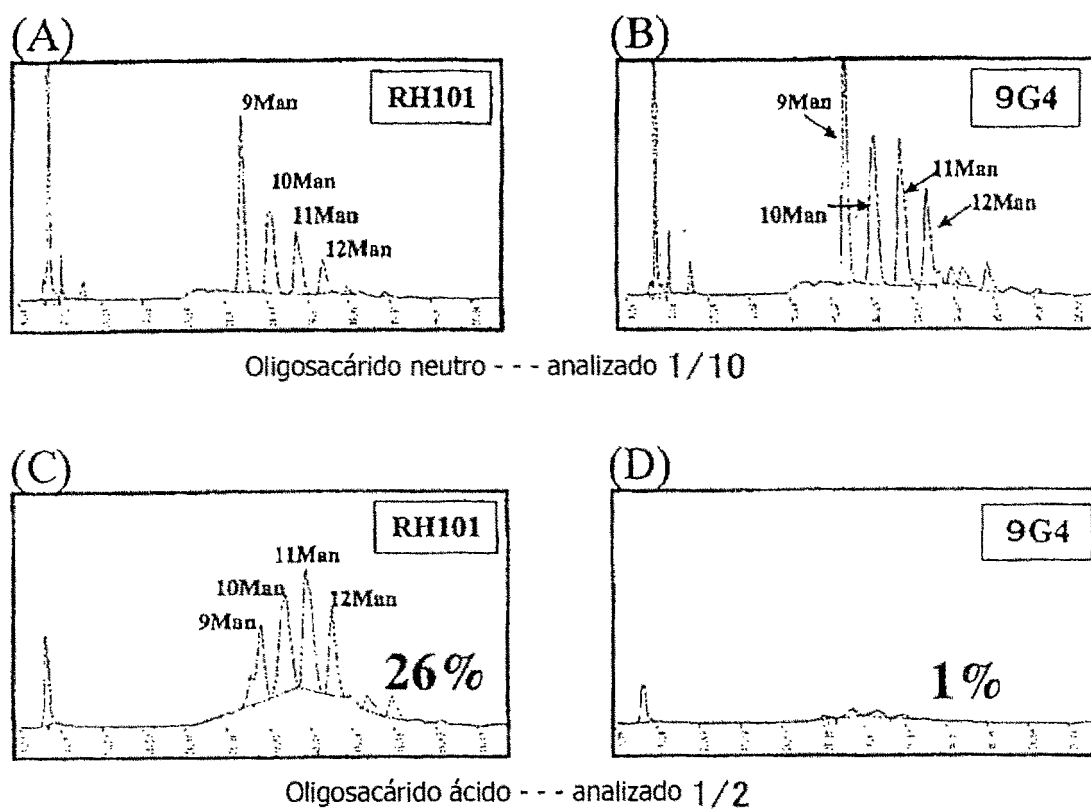
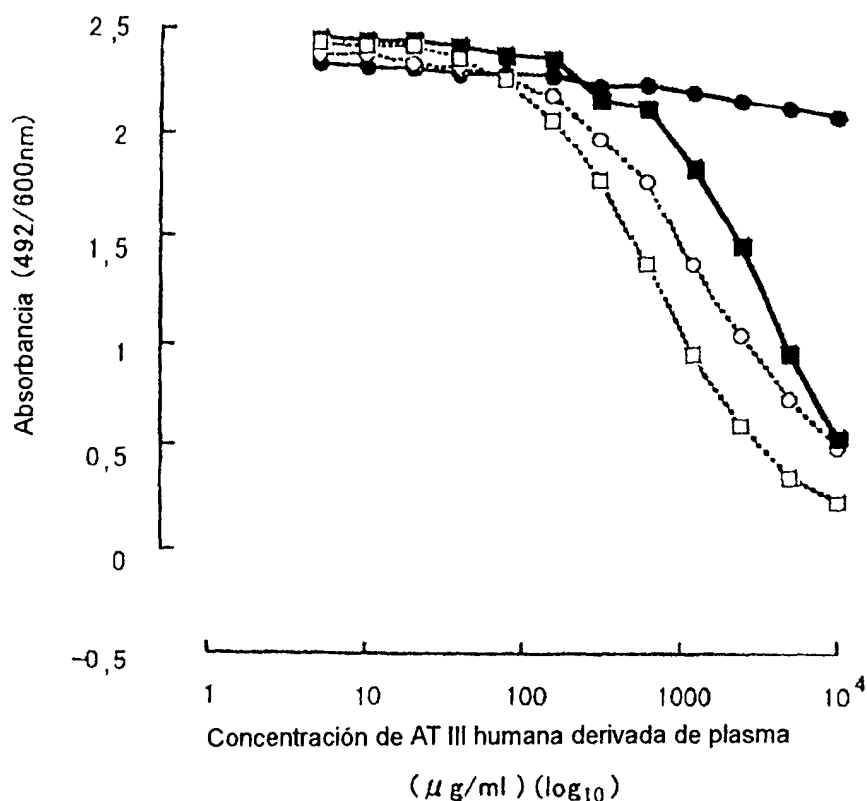


Fig. 10

- Reacción de unión de un antisuero contra ATIII humana recombinante derivada de una levadura de tipo natural con ATIII humana recombinante derivada de una levadura de tipo natural
- Reacción de unión de un antisuero contra ATIII humana recombinante derivada de una interferidora de PNO1 con ATIII humana recombinante derivada de una interferidora de PNO1
- Reacción de unión de un antisuero contra ATIII humana derivada de plasma con ATIII humana recombinante derivada de una levadura de tipo natural
- Reacción de unión de un antisuero contra ATIII humana derivada de plasma con ATIII humana recombinante derivada de una interferidora de PNO1



ES 2 328 106 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> WELFIDE CORPORATION
5 <120> Procedimiento para producción de glicoproteína que tiene una cantidad reducida de oligosacárido ácido y la glicoproteína producida de este modo
<130> GP01-009
<150> JP2000-144643
10 <151> 17-5-2000
<160> 5
<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> *Pichia pastoris*
20 <400> 1

Met Thr Leu Arg Ser Ala Ile Lys Ala Arg Thr Ser Lys Gly Leu Ile
25 1 5 10 15

Gly Ala Val Ile
20

30 <210> 2
<211> 2632
<212> ADN
35 <213> *Pichia pastoris*
<220>
<221> CDS
40 <222> (150)..(2483)

<400> 2

45 gcagtttaat catagccac tgctangcca gaattcta atgtaactac glaccttcc 60

ttttaalaaa tgatctgtat ttccaccia agtagcagat caaattgttc aactttaagt 120
50

ctttggtecc tcaagegaga gaacttgcg atg aca ctc agg agt gcc ata aaa 173
55 Met Thr Leu Arg Ser Ala Ile Lys
1 5

60 gcc aga acc tca aaa gga ctg atc gga gct gti att ata gcc tca ala 221
65 Ala Arg Thr Ser Lys Gly Leu Ile Gly Ala Val Ile Ile Ala Ser Ile
10 15 20

ES 2 328 106 T3

ata ttt ttc acc aca gta acc ttc tac gat gaa agc aaa att gtc ggc 269
 5 Ile Phe Phe Thr Thr Val Thr Phe Tyr Asp Glu Ser Lys Ile Val Gly
 25 30 35 40
 10
 ata ata aga gtt tct gat act tat aca ggc cat agc gct gta tct tca 317
 15 Ile Ile Arg Val Ser Asp Thr Tyr Thr Gly His Ser Ala Val Ser Ser
 45 50 55
 20
 act ttc aat gct tct tcc gtt gtt agt gac aac aag atc aac gga tat 365
 25 Thr Phe Asn Ala Ser Ser Val Val Ser Asp Asn Lys Ile Asn Gly Tyr
 60 65 70
 30
 gga ctt cct ttg att gac acg gaa tca aat agc cgt tat gag gat cca 413
 35 Gly Leu Pro Leu Ile Asp Thr Glu Ser Asn Ser Arg Tyr Glu Asp Pro
 75 80 85
 40
 gac gat att tcc att gaa aac gaa ttg cgc tat aga att gcc caa tct 461
 45 Asp Asp Ile Ser Ile Glu Asn Glu Leu Arg Tyr Arg Ile Ala Gln Ser
 90 95 100
 50
 acc aaa gag gaa gaa aac atg tgg aaa ctc gat acc act ctc acg gaa 509
 55 Thr Lys Glu Glu Glu Asn Met Trp Lys Leu Asp Thr Thr Leu Thr Glu
 105 110 115 120
 60
 gca agc ttg aaa atc ccc aac ata cag tcg ttt gag ctg cag ccg ttc 557
 65 Ala Ser Leu Lys Ile Pro Asn Ile Gln Ser Phe Glu Leu Glu Pro Phe

ES 2 328 106 T3

	125	130	135	
5				
	aaa gaa aga ctt gal aat tca ctt tac aat tct aag aac ata gga aac	605		
10	Lys Glu Arg Leu Asp Asn Ser Leu Tyr Asn Ser Lys Asn Ile Gly Asn			
	140	145	150	
15				
	ttt tac ttc tat gac cca agg ctt aca ttc tca gtt tac ttg aag tat	653		
20	Phe Tyr Phe Tyr Asp Pro Arg Leu Thr Phe Ser Val Tyr Leu Lys Tyr			
	155	160	165	
25				
	atc aag gat aaa ttg gcc tct gga agc aca aca aat ctt aca ata ccc	701		
30	Ile Lys Asp Lys Leu Ala Ser Gly Ser Thr Thr Asn Leu Thr Ile Pro			
	170	175	180	
35				
	ttc aac tgg gca cat ttt aga gat tta tgg tca ctg aat cct tat ttg	749		
40	Phe Asn Trp Ala His Phe Arg Asp Leu Ser Ser Leu Asn Pro Tyr Leu			
	185	190	195	200
45				
	gac ala aaa caa gaa gat aag gtc gca tgt gat tac ttt tat gaa tca	797		
50	Asp Ile Lys Gln Glu Asp Lys Val Ala Cys Asp Tyr Phe Tyr Glu Ser			
	205	210	215	
55				
	agt aat aaa gac aaa cga aaa ccc acg ggt aac tgt att gag ttt aaa	845		
60	Ser Asn Lys Asp Lys Arg Lys Pro Thr Gly Asn Cys Ile Glu Phe Lys			
	220	225	230	
65				

ES 2 328 106 T3

gat gtt cgt gat gag cac ctg ata cag tat ggg att tca tca aaa gac 893
 5 Asp Val Arg Asp Glu His Leu Ile Gln Tyr Gly Ile Ser Ser Lys Asp
 235 240 245
 10 cat cta cct ggt cct ttt att tta aag tca ctt gga att ccc atg cag 941
 15 His Leu Pro Gly Pro Phe Ile Leu Lys Ser Leu Gly Ile Pro Met Gln
 250 255 260
 20 cat aca gcc aag cga ctg gaa tca aat ctt tat cta tta acc ggt gcg 989
 25 His Thr Ala Lys Arg Leu Glu Ser Asn Leu Tyr Leu Leu Thr Gly Ala
 265 270 275 280
 30 cca gtt cca ctt tca tta agt ttc atg act aaa aag gga tta tac caa 1037
 35 Pro Val Pro Leu Ser Leu Ser Phe Met Thr Lys Lys Gly Leu Tyr Gln
 285 290 295
 40 gtt gga gtt gac caa aca gga aaa ctt gat cca aac att gct cgt act 1085
 45 Val Gly Val Asp Gln Thr Gly Lys Leu Asp Pro Asn Ile Ala Arg Thr
 300 305 310
 50 gaa cta tgg gag ttt tac aaa aat ggg aaa gaa aac ctt caa ttt aat 1133
 55 Glu Leu Trp Glu Phe Tyr Lys Asn Gly Lys Glu Asn Leu Gln Phe Asn
 315 320 325
 60 gca caa gag gag cta tct cac ctg ata gag aca gtc cct tca tct agt 1181
 65 Ala Gln Glu Glu Leu Ser His Leu Ile Glu Thr Val Pro Ser Ser Ser

ES 2 328 106 T3

	330	335	340	
5				
	aac tca tcc agt gga gaa ggc tat ttc act act gaa tta aag gag aac	1229		
10	Asn Ser Ser Ser Gly Glu Gly Tyr Phe Thr Thr Glu Leu Lys Glu Asn			
	345	350	355	360
15				
	aac ttt gag ttg ccc ctg agt aag aat gat ttt acc ttt gat gat tcc	1277		
20	Asn Phe Glu Leu Pro Leu Ser Lys Asn Asp Phe Thr Phe Asp Asp Ser			
	365	370	375	
25				
	gag gtc gag tca ttg att aaa ggt tta tct gaa cag gac ttg gac ctt	1325		
30	Glu Val Glu Ser Leu Ile Lys Gly Leu Ser Glu Gln Asp Leu Asp Leu			
	380	385	390	
35				
	cat acc cag aga tac aaa gaa tct ttg cag tac tct ttt geg act cga	1373		
40	His Thr Gln Arg Tyr Lys Glu Ser Leu Gln Tyr Ser Phe Ala Thr Arg			
	395	400	405	
45				
	gag aat gac gtg aag naa tac ttt tat gag gcc aga atg att atc aat	1421		
50	Glu Asn Asp Val Lys Lys Tyr Phe Tyr Glu Ala Arg Met Ile Ile Asn			
	410	415	420	
55				
	act gtt aac aaa gaa ggt gga gcg cat tat gac tgg agg ttt ttc aat	1469		
60	Thr Val Asn Lys Glu Gly Gly Ala His Tyr Asp Trp Arg Phe Phe Asn			
	425	430	435	440

ES 2 328 106 T3

5 gga gcc atg aat cat gaa agt tcc ggt ttt act gag gaa gaa aga caa 1517
 Gly Ala Met Asn His Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Glu Glu Arg Gln
 445 450 455
 10
 15 ctg aga aag aga tct gtt ttg cat cgt tta ttg cga aac tgg ctt gta 1565
 Leu Arg Lys Arg Ser Val Leu His Arg Leu Leu Arg Asn Trp Leu Val
 460 465 470
 20
 25 ttc aat tac cag caa gga tct ccc act tgg ttg gct cat gga act tta 1613
 Phe Asn Tyr Gln Gln Gly Ser Pro Thr Trp Leu Ala His Gly Thr Leu
 475 480 485
 30
 35 ctt tct tgg tat tgg aat tca ttg atg ttc cct tgg gat tat gat att 1661
 Leu Ser Trp Tyr Trp Asn Ser Leu Met Phe Pro Trp Asp Tyr Asp Ile
 490 495 500
 40
 45 gat gtg caa atg cca atc aag agt ttg aac aat cta tgt gct aac ttc 1709
 Asp Val Gln Met Pro Ile Lys Ser Leu Asn Asn Leu Cys Ala Asn Phe
 505 510 515 520
 50
 55 aac caa tca tta ata att gag gat ctt act gaa gga tat tct tct ttt 1757
 Asn Gln Ser Leu Ile Ile Glu Asp Leu Thr Glu Gly Tyr Ser Ser Phe
 525 530 535
 60
 65 ttc ttg gat tgc gga tca agt atc acg cat aga aca aaa ggc aaa gga 1805
 Phe Leu Asp Cys Gly Ser Ser Ile Thr His Arg Thr Lys Gly Lys Gly

ES 2 328 106 T3

	540	545	550	
5				
	tta aac ttc att gat gca aga ttc ata aat gtt gaa aca ggc ctt tat	1853		
10	Leu Asn Phe Ile Asp Ala Arg Phe Ile Asn Val Glu Thr Gly Leu Tyr			
	555	560	565	
15				
	atc gat atc act gga tta agt acc agt cag tca gct cga ccg cca agg	1901		
20	Ile Asp Ile Thr Gly Leu Ser Thr Ser Gln Ser Ala Arg Pro Pro Arg			
	570	575	580	
25				
	ttt agt aac gct tgc aag aaa gat cct att tac aat tgc agg aat aat	1949		
30	Phe Ser Asn Ala Ser Lys Lys Asp Pro Ile Tyr Asn Cys Arg Asn Asn			
	585	590	595	600
35				
	cat ttc tac tct cat aac aat ata gca cct ctc aaa tac acg ttg atg	1997		
40	His Phe Tyr Ser His Asn Asn Ile Ala Pro Leu Lys Tyr Thr Leu Met			
	605	610	615	
45				
	gag ggg gtt ccc agt ttc att cct caa cag tat gaa gaa ata ttg aga	2045		
50	Glu Gly Val Pro Ser Phe Ile Pro Gln Gln Tyr Glu Glu Ile Leu Arg			
	620	625	630	
55				
	gag gag tat aca act ggt ttg act tgc aaa cac tac aac ggc aac ttt	2093		
60	Glu Glu Tyr Thr Thr Gly Leu Thr Ser Lys His Tyr Asn Gly Asn Phe			
	635	640	645	

ES 2 328 106 T3

5 ttt atg act caa ttg aat ttg tgg ctt gaa aga gat cca atg cta gca 2141
 Phe Met Thr Gln Leu Asn Leu Trp Leu Glu Arg Asp Pro Met Leu Ala
 650 655 660

10 ctt gtg cct tca tcc aaa tac gaa att gaa ggt gga ggg gtg gac cat 2189
 15 Leu Val Pro Ser Ser Lys Tyr Glu Ile Glu Gly Gly Gly Val Asp His
 665 670 675 680

20 aac aag att atc aag tct att ctt gaa ctt tcc aac atc aaa aaa ttg 2237
 25 Asn Lys Ile Ile Lys Ser Ile Leu Glu Leu Ser Asn Ile Lys Lys Leu
 685 690 695

30 gaa ttg ttg gat gat aat ccc gat ata tta gag gag gtg atc agg aca 2285
 35 Glu Leu Leu Asp Asp Asn Pro Asp Ile Leu Glu Glu Val Ile Arg Thr
 700 705 710

40 tac gaa ctg act tcc att cac cat aaa gag atg cag tat ctt tcc agt 2333
 45 Tyr Glu Leu Thr Ser Ile His His Lys Glu Met Gln Tyr Leu Ser Ser
 715 720 725

50 gtc aaa cca gat ggg gac agg tcc atg cag tca aat gac ata acc agt 2381
 55 Val Lys Pro Asp Gly Asp Arg Ser Met Gln Ser Asn Asp Ile Thr Ser
 730 735 740

60 tct tac cag gag ttt cta gca agt ctg aag aaa ttc cag cct tta cgc 2429
 65 Ser Tyr Gln Glu Phe Leu Ala Ser Leu Lys Lys Phe Gln Pro Leu Arg

ES 2 328 106 T3

745 750 755 760
 5
 aaa gat ttg ttc caa ttt gag cgg ata gac ctt tct aag cat aga aaa 2477
 10 lys Asp Leu Phe Gln Phe Glu Arg Ile Asp Leu Ser Lys His Arg Lys
 765 770 775
 15
 cag tga gcagccgttt lgcctaaaat gttccagaaa ctataggata aatatataca 2533
 20 Gln
 25 glaatgaatt aggtgatgtt agcatttagt ccccaaaaat acctegaatc tccagctcca 2593
 30 tagcgcaaaa tctccaaaac tacttcaaga cgcactcat 2632
 <210> 3
 <211> 777
 <212> PRT
 35 <213> *Pichia pastoris*
 <400> 3
 40 Met Thr Leu Arg Ser Ala Ile Lys Ala Arg Thr Ser Lys Gly Leu Ile
 1 5 10 15
 45 Gly Ala Val Ile Ile Ala Ser Ile Ile Phe Phe Thr Thr Val Thr Phe
 20 25 30
 50 Tyr Asp Glu Ser Lys Ile Val Gly Ile Ile Arg Val Ser Asp Thr Tyr
 35 40 45
 55
 60
 65

ES 2 328 106 T3

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

ES 2 328 106 T3

	Lys	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Met	Gln	His	Thr	Ala	Lys	Arg	Leu	Glu	Ser
5				260				265					270			
	Asn	Leu	Tyr	Leu	Leu	Thr	Gly	Ala	Pro	Val	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Phe
10				275				280					285			
	Met	Thr	Lys	Lys	Gly	Leu	Tyr	Gln	Val	Gly	Val	Asp	Gln	Thr	Gly	Lys
15				290				295					300			
	Leu	Asp	Pro	Asn	Ile	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Trp	Glu	Phe	Tyr	Lys	Asn
20				305			310					315			320	
	Gly	Lys	Glu	Asn	Leu	Gln	Phe	Asn	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	Ser	His	Leu
25					325				330					335		
	Ile	Glu	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser	Ser	Gly	Glu	Gly	Tyr
30					340				345					350		
	Phe	Thr	Thr	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asn	Phe	Glu	Leu	Pro	Leu	Ser	Lys
35					355				360					365		
	Asn	Asp	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Ser	Glu	Val	Glu	Ser	Leu	Ile	Lys	Gly
40					370				375					380		
	Leu	Ser	Glu	Gln	Asp	Leu	Asp	Leu	His	Thr	Gln	Arg	Tyr	Lys	Glu	Ser
45					385				390				395		400	
	Leu	Gln	Tyr	Ser	Phe	Ala	Thr	Arg	Glu	Asn	Asp	Val	Lys	Lys	Tyr	Phe
50						405				410					415	
	Tyr	Glu	Ala	Arg	Met	Ile	Ile	Asn	Thr	Val	Asn	Lys	Glu	Gly	Gly	Ala
55					420				425						430	
	His	Tyr	Asp	Trp	Arg	Phe	Phe	Asn	Gly	Ala	Met	Asn	His	Glu	Ser	Ser
60					435				440					445		
	Gly	Phe	Thr	Glu	Glu	Glu	Arg	Gln	Leu	Arg	Lys	Arg	Ser	Val	Leu	His
65					450				455					460		

ES 2 328 106 T3

	Arg	Leu	Leu	Arg	Asn	Trp	Leu	Val	Phe	Asn	Tyr	Gln	Gln	Gly	Ser	Pro
5	465					470					475					480
	Thr	Trp	Leu	Ala	His	Gly	Thr	Leu	Leu	Ser	Trp	Tyr	Trp	Asn	Ser	Leu
10					485						490					495
	Met	Phe	Pro	Trp	Asp	Tyr	Asp	Ile	Asp	Val	Gln	Met	Pro	Ile	Lys	Ser
15				500						505						510
	Leu	Asn	Asn	Leu	Cys	Ala	Asn	Phe	Asn	Gln	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Asp
20			515						520					525		
	Leu	Thr	Glu	Gly	Tyr	Ser	Ser	Phe	Phe	Leu	Asp	Cys	Gly	Ser	Ser	Ile
25		530						535						540		
	Thr	His	Arg	Thr	Lys	Gly	Lys	Gly	Leu	Asn	Phe	Ile	Asp	Ala	Arg	Phe
30	545					550					555					560
	Ile	Asn	Val	Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Asp	Ile	Thr	Gly	Leu	Ser	Thr
35					565					570					575	
	Ser	Gln	Ser	Ala	Arg	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser	Asn	Ala	Ser	Lys	Lys	Asp
40				580						585					590	
	Pro	Ile	Tyr	Asn	Cys	Arg	Asn	Asn	His	Phe	Tyr	Ser	His	Asn	Asn	Ile
45			595						600						605	
	Ala	Pro	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	Met	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Phe	Ile	Pro
50		610						615						620		
	Gln	Gln	Tyr	Glu	Glu	Ile	Leu	Arg	Glu	Glu	Tyr	Thr	Thr	Gly	Leu	Thr
55	625					630					635					640
	Ser	Lys	His	Tyr	Asn	Gly	Asn	Phe	Phe	Met	Thr	Gln	Leu	Asn	Leu	Trp
60					645					650					655	
	Leu	Glu	Arg	Asp	Pro	Met	Leu	Ala	Leu	Val	Pro	Ser	Ser	Lys	Tyr	Glu
65				660						665					670	

ES 2 328 106 T3

	Ile Glu Gly Gly Gly Val Asp His Asn Lys Ile Ile Lys Ser Ile Leu				
5	675	680	685		
	Glu Leu Ser Asn Ile Lys Lys Leu Glu Leu Leu Asp Asp Asn Pro Asp				
10	690	695	700		
	Ile Leu Glu Glu Val Ile Arg Thr Tyr Glu Leu Thr Ser Ile His His				
15	705	710	715	720	
	Lys Glu Met Gln Tyr Leu Ser Ser Val Lys Pro Asp Gly Asp Arg Ser				
20	725	730	735		
	Met Gln Ser Asn Asp Ile Thr Ser Ser Tyr Gln Glu Phe Leu Ala Ser				
25	740	745	750		
	Leu Lys Lys Phe Gln Pro Leu Arg Lys Asp Leu Phe Gln Phe Glu Arg				
30	755	760	765		
	Ile Asp Leu Ser Lys His Arg Lys Gln				
35	770	775			
	<210> 4 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético				
45	<400> 4 ccgaccctcg tctcacgtgg tcc 23				
50	<210> 5 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético				
55	<400> 5 ccaagcttag actttggtaa ctcttcag 29				
65					