



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 351 296**

② Número de solicitud: 200900961

⑤ Int. Cl.:
C12N 9/40 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **08.04.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
02.02.2011

⑰ Solicitante/s: **Universidade da Coruña
O.T.R.I.- Campus de Elviña, s/n
15071 A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Cerdán Villanueva, María Esperanza;
Pereira Rodríguez, Ángel;
Fernández Leiro, Rafael;
Becerra Fernández, Manuel y
González Siso, María Isabel**

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑳ Título: **Cepas de *S. cerevisiae* capaces de crecer en medios con melibiosa, estaquiosa y rafinosa.**

㉑ Resumen:

Cepas de *S. cerevisiae* capaces de crecer en medios con melibiosa, estaquiosa y rafinosa.

La invención se relaciona con cepas de *S. cerevisiae* capaces de secretar alfa-galactosidasa al medio de cultivo, así como a métodos para la obtención de alfa-galactosidasa utilizando dichas cepas y métodos para la producción de biomasa y bioetanol mediante el cultivo de dichas cepas en medios ricos en galactosa. En otro aspecto, la invención proporciona métodos para la expresión de proteínas recombinantes usando una composición rica en galactosa como medio de cultivo para los microorganismos productores de dicha proteína.

ES 2 351 296 A1

DESCRIPCIÓN

Cepas de *S. cerevisiae* capaces de crecer en medios con melibiosa, estaquirosa y rafinosa.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con cepas de *S. cerevisiae* que son capaces de producir α -galactosidasa. Para su mejor secreción, el gen de la α -galactosidasa tiene fusionada una secuencia señal. Dichas cepas son útiles en métodos para la producción de α -galactosidasa, de biomasa y de etanol, a partir de un medio rico en rafinosa, melibiosa y/o estaquirosa y, en el caso de que las cepas contengan una segunda construcción que exprese una proteína de interés terapéutica, para la producción de dichas proteínas terapéuticas.

Antecedentes de la invención

15 Las α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) catalizan la hidrólisis de residuos de galactosa unidos por enlaces $\alpha(1,6)$ de galacto-oligosacáridos y galacto-mananos poliméricos (polímeros de mañosas con ramificaciones de galactosa), así como la de oligosacáridos como la estaquirosa, rafinosa y melibiosa presentes en habas, soja y otras legumbres.

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, la mayoría de los mamíferos monogástricos, incluidos los humanos, carecen de α -galactosidasa pancreática, de manera que este tipo de oligosacáridos no pueden ser digeridos en el sistema digestivo y son fermentados por la microflora intestinal produciendo gases que generan flatulencia y otro tipo de desórdenes gastrointestinales que pueden causar problemas de diferente consideración en individuos sensibles. El caso de la soja y los productos derivados de ésta tiene especial importancia pues son un componente importante en la dieta de muchas personas, puesto que constituye una buena fuente de proteínas y se utiliza en algunos casos como sustituto de productos lácteos, por ejemplo en personas con intolerancia a la lactosa. Para el tratamiento de estos desórdenes existen suplementos alimentarios consistentes en concentrados de α -galactosidasas de diferentes orígenes (*Lactococcus*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces*, etc.) como por ejemplo los comprimidos fabricados por Promefarm (Sinaire). El pretratamiento con α -galactosidasa de estos productos de la soja, así como de otros preparados para nutrición humana y animal con contenido elevado en oligosacáridos no digeribles como la rafinosa y la estaquirosa, constituye una buena alternativa para evitar estos problemas gastrointestinales. Además contribuye al aumento del valor nutricional de los mismos; este punto tiene gran importancia en nutrición animal puesto que se aumenta el aprovechamiento energético de los piensos.

En humanos, la α -galactosidasa es una exoglicosidasa lisosómica que actúa sobre residuos terminales de tipo α -galactosil de glicolípidos y glicoproteínas. Mutaciones en este gen provocan deficiencias en estas degradaciones que resultan en la enfermedad de Fabry (esfingolipodosis ligada al cromosoma X). Esta enfermedad presenta una incidencia de 1/40.000. En la actualidad existen tratamientos, como el desarrollado por la empresa Genzyme Corp. (Fabrazyme), basado en la técnica de reemplazamiento enzimático para tratar esta enfermedad mediante la utilización de α -galactosidasas de humanos expresada en ratones CHO. Como alternativa más rentable a la utilización de células de mamíferos para la producción heteróloga de la proteína, se ha estudiado la utilización de α -galactosidasa humana expresada de forma recombinante en levaduras.

Por otro lado, el cáliz glicoproteico de la superficie celular de glóbulos rojos determina, entre otras muchas funciones, el tipo sanguíneo de cada individuo. La sangre de tipo 0 puede ser empleada para realizar transfusiones a cualquier individuo por lo que es la más necesaria. Empleando α -galactosidasas capaces de procesar enlaces de galactosa de tipo $\alpha(1-3)$ se puede imitar el tipo sanguíneo 0 a partir de sangre de tipo B.

En la producción de caramelo y de azúcar a nivel industrial también se utiliza la α -galactosidasa para eliminar la presencia de rafinosa que impide la correcta cristalización del caramelo y mejorar así la producción. Además, el producto de desecho de esta industria, las melazas, tiene un elevado contenido en rafinosa y estaquirosa, que hace que no pueda ser vertido de forma directa al tener una elevada biodegradabilidad (DBO). Esta enzima u organismos productores de la misma son empleados para degradar estos azúcares y acoplar esta degradación a otra función como puede ser la producción de etanol o de biomasa. Las melazas, además, son el sustrato más utilizado para la producción de las cerca de 430000 toneladas de *S. cerevisiae* para panificación (peso seco) que se producen anualmente. Las cepas de levaduras empleadas en panificación carecen de α -galactosidasa y se han desarrollado cepas de *Saccharomyces* de panificación con el gen que codifica para la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* var. *uvarum* con el fin de mejorar la producción de esta biomasa (Liljeström-Suominen *et al.*; Appl Environ Microbiol. 1988 Jan;54(1):245-249).

En el caso de levaduras, se ha descrito que la α -galactosidasa libera los residuos no reductores en posición terminal de galactosa situados en extremos terminales de los sustratos pero no los residuos internos (α). Además de la actividad hidrolítica, las α -galactosidasas poseen la capacidad de sintetizar oligosacáridos por transglicosilación y por hidrólisis inversa en presencia de concentraciones elevadas de monosacáridos (α). *Saccharomyces cerevisiae* es una de las fuentes de α -galactosidasa más estudiada y su utilización en aplicaciones biotecnológicas está ampliamente extendida (α).

Dada la importancia y las amplias aplicaciones biotecnológicas de esta enzima, existen datos acerca de la producción de α -galactosidasa a partir de bacterias como *Bacillus stearothermophilus* (patente US n° 3846239), *Thermus* sp. cepa T2 (patente ES n° 2172380), *Streptomyces griseoalbus* (Anisha *et al.*; Appl Biochem Biotechnol. 2008 Sep 4), sin embargo, y dado que muchas de las aplicaciones que va a tener esta enzima van a estar relacionados con el proce-

samiento o la preparación de materiales relacionados con la alimentación bien animal o bien humana, es esencial que el microorganismo que se vaya a utilizar sea GRAS (General Recognised As Safe), como es el caso de *S. cerevisiae*. También existen datos de la producción de α -galactosidasa a partir de cepas de hongos de los géneros *Neurospora* y *Rhizopus* (Worthington y Beuchat, J Agric Food Chem. 1974; 22(6): 1063-6), *Aspergillus oryzae*, *A. foetidus* (Liu *et al.*, Lett Appl Microbiol. 2007 Aug;45(2):206-12), *A. ficuum* (Zapater *et al.*, Prep Biochem. 1990;20(3-4):263-96) y *A. niger* entre otros (patentes US nº 6197566 y nº 5919690) aunque uno de los principales inconvenientes de la producción en hongos es la producción de productos secundarios no deseados. En el caso de la producción de α -galactosidasa en *A. niger* se producen cantidades importantes de ácido oxálico. Asimismo, existen datos de producción de α -galactosidasa no humana, como la de la planta guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) fusionada a diferentes secuencias señal (Harmsen, M. *et al.*, Gene. 1993 Mar 30; 125(2):115-23).

En cuanto a la producción en levaduras, la patente US 4431737 describe una cepa mutada de *S. cerevisiae* productora de α -galactosidasa obtenida por mutagénesis mediante radiaciones ultravioleta. El inconveniente de las cepas mutadas mediante un tratamiento mutagénico con radiación ultravioleta, es que este tratamiento altera fundamentalmente el ADN por la formación de dímeros de pirimidinas provocando una distorsión local de la configuración de la doble hélice, que interfiere en el normal emparejamiento de bases complementarias; ello, a su vez, provoca una interferencia en los procesos de replicación y transcripción, y secundariamente en el crecimiento y la respiración. Por lo tanto, las cepas así mutadas además de poder presentar otras mutaciones no deseadas suelen presentar lentos crecimientos. Existe también otra patente (US nº 5055401) en la cual se han construido cepas de *Saccharomyces* transformadas con el gen que codifica para la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* var. *uvarum* (Liljeström-Suominen *et al.*, 1988). Se ha producido también α -galactosidasa humana secretada al medio a partir de otras levaduras, como *Pichia Pastoris* (Chen, Y. *et al.*, Protein Expr Purif. 2000 Dec;20(3):472-84).

Por tanto, es un objetivo de especial interés en biotecnología la producción y obtención de la α -galactosidasa a partir de levaduras, de una manera eficiente y mejorada.

Compendio de la invención

La presente invención contribuye a proporcionar cepas de *S. cerevisiae* transformadas con las construcciones de la invención, produciéndose una α -galactosidasa generada a partir de levaduras, con múltiples aplicaciones en la industria de la alimentación y empresas biotecnológicas. El aprovechamiento de la actividad catalítica de la α -galactosidasa es de interés, por ejemplo, en la hidrólisis de rafinosa en la producción de azúcar de remolacha y en el procesamiento de la soja; en la utilización de melazas por las cepas de levadura, en el desarrollo de tratamientos para la enfermedad de Fabry y como suplemento dietético para maximizar el aprovechamiento energético en dietas animales y para tratar desórdenes gastrointestinales en humanos.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una construcción de ADN que comprende un promotor heterólogo regulado mediante represión por glucosa, una secuencia que codifica una secuencia señal funcional en levadura, y la región del gen MEL1 que codifica la forma madura de α -galactosidasa o una variante funcionalmente equivalente; en donde las secuencias (b) y (c) han de estar bajo el mismo marco de lectura.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción de ADN que comprende el promotor ADH2 o una variante funcionalmente equivalente del mismo, una secuencia que codifica una secuencia señal funcional en levadura y la región de un gen que codifica una forma madura de α -galactosidasa o una variante funcionalmente equivalente; en donde la secuencia señal y el gen que codifica una forma madura de α -galactosidasa han de estar bajo el mismo marco de lectura.

En otro aspecto, la invención se refiere a una proteína codificada por alguna de las construcciones de ADN de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector de expresión que contiene la construcción de la invención.

Aún en otro aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo que contiene las construcciones de la invención, la proteína codificada por alguna de las construcciones de ADN de la invención, el vector de expresión con alguna de las construcciones de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir α -galactosidasa que comprende las etapas de cultivar un microorganismo y recuperar la α -galactosidasa secretada del medio de cultivo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de biomasa celular que comprende las etapas de cultivar un microorganismo que contiene el vector de expresión con la construcción de la invención en un sustrato que contenga residuos de α -D-galactosa no reductores, en posición terminal y recuperar la biomasa celular.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de etanol que comprende las etapas de cultivar un microorganismo que contiene el vector de expresión con la construcción de la invención en un sustrato que contenga residuos de α -D-galactosa no reductores, en posición terminal y recuperar el etanol producido.

ES 2 351 296 A1

En otro aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo que contiene el vector de expresión con la construcción de la invención y además una segunda construcción con un gen que codifica una proteína de interés.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de una proteína que comprende las etapas de cultivar un microorganismo que contiene el vector de expresión con la construcción de la invención y además una segunda construcción con un gen que codifica una proteína de interés, en un sustrato que contenga residuos de α -D-galactosa no reductores, en posición terminal y recuperar la proteína de interés.

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1 muestra las medidas de absorbancia a 600 nm y las curvas de actividad α -galactosidasa extracelular, intracelular y total de la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido de secreción conteniendo el gen íntegro que codifica la α -galactosidasa de *S. cerevisiae*. Las medidas de actividad α -galactosidasa extracelular e intracelular son el resultado de cuatro medidas independientes.

15 La Figura 2 muestra las medidas de comparación de la actividad α -galactosidasa extracelular y total de la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido de secreción conteniendo el gen íntegro que codifica la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* (símbolos en negro y líneas continuas) con la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el gen que codifica la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* bajo el promotor ADH1 (utilizada en US 5055401) (símbolos en blanco y líneas discontinuas).

20 La Figura 3 muestra las medidas de absorbancia a 600 nm y las curvas de actividad α -galactosidasa total de la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido de secreción conteniendo el gen íntegro que codifica la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* creciendo en un medio sintético con rafinosa al 2%. Se comparan los valores de absorbancia a 600 nm con los de la misma cepa sin transformar con el gen MEL1.

Descripción detallada de la invención

25 Los autores de la presente invención han desarrollado una construcción de ADN que está compuesta por un promotor heterólogo regulado mediante represión por glucosa, una secuencia que codifica una secuencia señal funcional en levadura fusionada en el mismo marco de lectura con un gen que codifica la forma madura de la α -galactosidasa de *S. cerevisiae*. Han puesto de manifiesto que las cepas de levadura que contienen dicha construcción secretan α -galactosidasa al medio en su forma activa, lo que permite el uso de las cepas para múltiples aplicaciones en la industria de la alimentación y empresas biotecnológicas. Gracias a estas características, las cepas proporcionan una solución a los problemas existentes en el estado de la técnica.

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con una construcción de ADN que comprende:

- 40 (a) un promotor heterólogo regulado mediante represión por glucosa,
(b) una secuencia que codifica una secuencia señal funcional en levadura, y
(c) la región del gen MEL1 que codifica la forma madura de α -galactosidasa o una variante funcionalmente equivalente,

45 en donde las secuencias (b) y (c) han de estar bajo el mismo marco de lectura. En adelante, se denominará primera construcción de la invención.

50 El componente (a) de la primera construcción de la invención es un promotor heterólogo regulado mediante represión por glucosa. El término "promotor heterólogo regulado mediante represión por glucosa" se refiere a que el gen de interés está regulado por un promotor de un gen distinto al de interés y por otro lado, se refiere a promotores cuya expresión está sujeta a represión por glucosa, de forma que la expresión de la α -galactosidasa se verá reprimida cuando comience a aumentar la concentración de glucosa en el medio.

55 Promotores útiles para la realización de la presente invención incluyen promotores tales como el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP) de *S. cerevisiae*, el promotor de la galactoquinasa (GAL1 y GAL7) y el del gen de 3-fosfoglicerato quinasa (PGK). En una forma de realización preferida, el promotor es el promotor del gen ADH2, cuya secuencia es SEQ ID NO:1.

60 El componente (b) de la primera construcción de la invención es una secuencia que codifica una secuencia señal funcional en levadura.

Por "secuencia señal funcional en levadura" se refiere a un péptido que es capaz de promover la secreción de cualquier proteína al medio extracelular, en una realización particular, la proteína es la α -galactosidasa.

65 Ejemplos ilustrativos pero no limitativos de secuencias señal que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen la secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae* y de otras especies de los géneros *Kluyveromyces*, *Pichia*, y *Hansenula*, la secuencia señal de la toxina killer de *K. lactis*, la secuencia señal de la glucoamilasa II de *S.*

diastaticus, la secuencia señal de la glucoamilasa de *C. albicans*, la secuencia señal de la fosfatasa de *S. cerevisiae*, la secuencia señal de la toxina *killer* de 128 kDa de *S. cerevisiae*, la secuencia señal de la invertasa de *S. cerevisiae*, así como secuencias aleatorias que son conocidas por su capacidad por reemplazar funcionalmente secuencias señales nativas de *E. coli*, tal y como han sido descritas por Kaiser, C. *et al.* (Science, 1987, 235:312-317) y secuencias señal que pueden ser identificadas usando los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo por Gallicioti, G. *et al.* J. Membrane Biology, 183:175-182).

La secuencia señal y la α -galactosidasa pueden estar directamente unidas o, alternativamente, pueden estar separadas por un péptido espaciador que queda unido a la α -galactosidasa tras el procesamiento de la secuencia señal y que puede servir para la identificación de la α -galactosidasa o para su purificación del medio de cultivo. En el primero de los casos, prácticamente cualquier péptido o secuencia peptídica que permita el reconocimiento del péptido o proteína de fusión puede ser utilizada, por ejemplo, una secuencia peptídica reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede servir para reconocer la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E, FLAG y, en general, cualquier otra secuencia reconocida por un anticuerpo. En el segundo de los casos, prácticamente cualquier péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento o purificación del péptido o proteína de fusión puede ser utilizada, por ejemplo, una secuencia de polihistidina, una secuencia peptídica reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede servir para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E, FLAG, etc. [Using Antibodies: A laboratory manual. Ed Harlow and David Lañe (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Capítulo: Tagging proteins. pp. 347-377] y, en general, cualquier otra secuencia reconocida por un anticuerpo. Preferiblemente, el péptido etiqueta es el epítipo FLAG (SEQ ID NO:2), y se encuentra conectado al extremo C-terminal de la secuencia señal y al extremo N-terminal de la α -galactosidasa, de forma que tras la eliminación de la secuencia señal, el epítipo FLAG forma el extremo N-terminal de la α -galactosidasa.

En una forma de realización preferida, la construcción de ADN puede comprender una secuencia que codifica la secuencia del factor α de *S. cerevisiae* (SEQ ID NO:3) o la secuencia señal endógena del gen MEL1 de *S. cerevisiae*, fusionado a través de su extremo 3' y en el mismo marco de lectura con la secuencia que codifica la α -galactosidasa.

El tercer elemento (c) de la primera construcción de ADN de la invención es la región del gen MEL1 que codifica la forma madura de la proteína α -galactosidasa (SEQ ID NO:4) o una variante funcionalmente equivalente.

Por variante funcionalmente equivalente de la secuencia identificada por SEQ ID NO:4, se entiende cualquier otra secuencia resultante de la inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos que mantiene la actividad α -galactosidasa.

Métodos para la determinación de la actividad α -galactosidasa son suficientemente conocidos en el estado de la técnica. Dichos métodos se basan en determinar la capacidad de la enzima de hidrolizar un conjugado cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente, que consta de galactosa conjugado a un compuesto cromóforo/fluoruro/quimioluminiscente mediante un enlace α -glicosídico en donde la liberación de dicho compuesto se puede detectar mediante medición de la fluorescencia liberada, de la densidad óptica a una longitud de onda determinada o de la quimioluminiscencia. Compuestos cromogénicos que pueden usarse como sustratos de la α -galactosidasa para determinar su actividad incluyen el p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNPG), siguiendo el método descrito por Kew y Douglas (Kew, O. M. y Douglas, H.C., 1976) que, al ser hidrolizado, produce un compuesto de color amarillo intenso generado a causa del cambio de pH producido al parar la reacción enzimática y proporcional a la cantidad de sustrato liberado.

Otros ensayos de actividad α -galactosidasa conocidos son los descritos por Dey y Pridham, 1969 (Dey, P.M., Pridham, J.B., 1969. Biochem. J. 113, 49-55); Lazo *et al.*, 1977 (Lazo, P. S., Ochoa, A. G., Gascón, S., 1977. Eur. J. Biochem. 77(2): 375-382); Ryan *et al.*, 1998 (Ryan, M.P., Jones, R., Morse, R.H., 1998. Mol Cell Biol 18(4): 1774-82); Garroa *et al.*, 2004 (Garroa MS, Valdeza GF, Gioria GS., 2004. Food Microbiol 21:511-8.); Liu *et al.*, 2007 (Liu, C., Ruan, H., Shen, H., Chen, Q., Zhou, B., Li, Y., He, G., 2007. J Food Sci 72(4): M120-M125).

Condiciones adecuadas para la realización del ensayo α -galactosidasa son ampliamente conocidos en la materia. Por ejemplo, en Maniatis *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)).

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con una construcción de ADN que comprende:

(a) el promotor ADH2 o una variante funcionalmente equivalente del mismo,

(b) una secuencia que codifica una secuencia señal funcional en levadura, y

(c) la región de un gen que codifica una forma madura de α -galactosidasa o una variante funcionalmente equivalente,

en donde las secuencias (b) y (c) han de estar bajo el mismo marco de lectura.

ES 2 351 296 A1

El promotor ADH2 es el promotor del gen alcohol deshidrogenasa II y está sujeto a represión catabólica.

El término “secuencia señal funcional en levadura” se encuentra definido en el primer aspecto y aplica de la misma manera en este caso. En una forma de realización preferida, la secuencia señal es la secuencia señal endógena del gen MEL1 o la secuencia señal del factor α de levadura.

Una forma madura de α -galactosidasa puede corresponder a cualquier α -galactosidasa presente en animales, plantas y microorganismos. Para el término “variante funcionalmente equivalente” se aplican los mismos criterios que para el primer aspecto. Una forma de realización preferida sería aquella en la que el gen que codifica la proteína α -galactosidasa es el gen MEL1.

Por otro lado, en otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína codificada por las construcciones definidas anteriormente y con un vector de expresión que contiene dichas construcciones.

La proteína generada a partir de una de las construcciones de ADN de la invención comprende una secuencia señal funcional en levadura y una α -galactosidasa fusionadas de forma que el extremo C-terminal de la secuencia señal se encuentra fusionado con el extremo N-terminal de la α -galactosidasa.

El término “vector de expresión” se refiere a una construcción de ADN replicativo utilizado para expresar ADN que codifica el polipéptido de la invención o la proteína de fusión de la invención y que incluye una unidad transcripcional que comprende el ensamblaje de (1) elemento/s génico/s que tienen un papel regulatorio en la expresión génica, por ejemplo, promotores, operadores o “*enhancers*” (aumentadores), operativamente unidos a (2) una secuencia de ADN que codifica el polipéptido o la proteína de fusión de la invención que es transcrito a ARN mensajero y traducido a proteína y (3) secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción y traducción.

Los vectores que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, típicamente, un marcador genético, un origen de replicación en bacterias o en levaduras, sitios múltiples de clonaje, y un marcador genético. El marcador genético es, habitualmente, un gen que confiere resistencia a un antibiótico o, alternativamente, un marcador auxotrófico, en el caso de levaduras.

Los vectores de levaduras adecuados para la presente invención pueden estar basados en los siguientes tipos de plásmidos

- Plásmidos autónomos multicopia: Estos plásmidos contienen secuencias que permiten la generación de múltiples copias de dichos vectores. Estas secuencias pueden ser las denominadas 2μ , como la que aparece en los plásmidos episomales (YE_p o “yeast episomal plasmids”) o secuencias tipo ARS, como las que aparecen en los plásmidos de replicación (YR_ps o “yeast replication plasmids”). Ejemplos de vectores basados en este tipo de plásmidos son p426GPD, p416GPD, p426TEF, p423GPD, p425GPD, p424GPD o p426GAL, YE_p24 y YE_plac.
- Plásmidos autónomos de una única copia: Plásmidos que contienen la secuencia autónoma de replicación ARS1 y una secuencia centromérica (CEN4). Este tipo de plásmidos incluye los plásmidos centroméricos (YC_ps o “yeast centromere plasmids”).
- Plásmidos de integración: Plásmidos que son capaces de integrarse en el genoma de la célula que los hospeda. Este tipo de plásmidos incluyen plásmidos de integración (YIPs o “yeast integrating plasmids”). Ejemplos de vectores basados en este tipo de plásmidos son pRS303, pRS304, pRS305 o pRS306 y similares.

En general, todos los vectores mencionados en Sikorski (“Extrachromosomal cloning vectors of *Saccharomyces cerevisiae*”, in Plasmid, A Practical Approach, Ed. K. G. Hardy, IRL Press, 1993) y en Ausubel *et al.* (“Yeast Cloning Vectors and Genes” Current Protocols in Molecular Biology, Section II, Unit 13.4, 1994) son útiles en el contexto de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo que contiene la construcción de ADN según la invención, el vector de expresión que contiene la construcción de la invención o la proteína de fusión según la invención. En una realización particular, el microorganismo es una levadura. Por levadura se entiende cualquier organismo eucariota perteneciente al tipo de los ascomicetos, que incluye los organismos conocidos de forma general como levaduras así como los conocidos de forma general como hongos filamentosos. Las levaduras y los hongos filamentosos incluyen *Pichia* sp (por ejemplo, *P. pastoris*, *P. finlandica*, *P. trehalophila*, *P. koclamae*, *P. membranaefaciens*, *P. minuta*, *P. opuntiae*, *P. thermotolerans*, *P. salictaria*, *P. guercuum*, *P. pijperi*, *P. stiptis*, *P. methanolica*), *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*), *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. wickeramii*, *K. waltii*, *K. drosophilae*, *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*, *K. yarrowia*), *Trichoderma reesei*, *Neurospora crassa*, *Schwanniomyces*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Penicillium*, *Totiplectadum*, *Aspergillus* (por ejemplo, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*), *Hansenula polymorpha*, *Candida*, *Kloeckera*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* sp. (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*), *Candida albicans*, *Aspergillus* sp (por ejemplo, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*), *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium luchowense*, *Fusarium* sp. (por ejemplo, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*), *Physcomitrella patens*.

ES 2 351 296 A1

Prácticamente cualquier levadura puede ser utilizada para la puesta en práctica del procedimiento de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha levadura es una levadura del género *Saccharomyces*, como *S. cerevisiae*.

5 Para la obtención de la levadura de la invención, es necesario introducir el vector que contiene la construcción en la célula de levadura. Métodos adecuados para introducir una molécula de ADN en una célula de levadura incluyen:

- Transformación de esferoplastos, lo que implica eliminar la pared celular de la levadura y poner en contacto las esferoplastos con el plásmido en presencia de PEG.
- 10 - Transformación con Li^+ , que implica el tratamiento de células de levadura con cationes alcalinos monovalentes (Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ y Li^+) en combinación con PEG para estimular la captación del ADN por las células intactas.
- 15 - Electroporación, que implica la administración de pulsos eléctricos a las levaduras lo que resulta en la apertura de poros en la membrana de esferoplastos y de células de levadura intactas.

Los microorganismos de la invención son capaces de producir y secretar al medio α -galactosidasa. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir α -galactosidasa que comprende cultivar un microorganismo de acuerdo a la invención y recuperar la α -galactosidasa secretada del medio de cultivo.

La proteína α -galactosidasa puede purificarse convenientemente en un único paso de cromatografía de afinidad mediante el uso de análogos de sustrato, como por ejemplo, el p-aminofenil- β -D-tiogalactopiranosido (Steers, E. *et al*, 1970, J. Biol. Chem. 246:196-200).

La determinación del grado de pureza de la α -galactosidasa se puede estimar mediante el valor de la actividad enzimática específica que se calcula dividiendo el número de unidades de actividad enzimática entre la cantidad de mg. de proteína en un volumen determinado. Preferiblemente, la actividad enzimática se determina mediante el método de Guarente, L. (Methods Enzymol. 1983, 101:181-191).

Los microorganismos de la invención son capaces de crecer en medios que contienen un sustrato rico en residuos de α -D-galactosa no reductores en posición terminal como única fuente de carbono. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener biomasa celular a partir de una composición rica en residuos de α -D-galactosa no reductores en posición terminal que comprende (a) cultivar un microorganismo que comprende una de las construcciones de la invención y (b) recuperar la biomasa del medio de cultivo.

Los medios ricos en residuos de α -D-galactosa no reductores en posición terminal preferidos son medios ricos en estaquiosa, rafinosa, melibiosa, melazas de caña de azúcar y/o remolacha, permeados de pro teína de soja y una combinación de cualquiera de los anteriores.

La biomasa se puede recuperar del medio de cultivo mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia incluyendo, sin estar limitado, centrifugación, depósito o filtración. Preferiblemente, la técnica empleada debe minimizar al máximo el daño a las células. En caso de que el mismo cultivo se use para la preparación de biomasa y la producción de α -galactosidasa, la separación de la biomasa de células debe minimizar al máximo la pérdida de α -galactosidasa.

Típicamente, el microorganismo recuperado del medio de cultivo es lavado con una solución acuosa para eliminar materiales indeseados que pudiesen estar asociados al mismo. Preferiblemente, el contenido de proteína en la levadura es de entre 35 y 65%. La biomasa de levadura recuperada se puede utilizar como ingrediente en productos alimenticios sin necesidad de procesamiento adicional. La biomasa recuperada también se puede lisar y, opcionalmente, separar las células intactas. Las células de levadura Usadas pueden ser usadas en medios de cultivo como extracto de levadura o puede ser procesado adicionalmente para separar sus distintos componentes, tales como péptidos, nucleótidos, aminoácidos o componentes específicos de la pared celular tales como quitina, glucanos, mananos y oligosacáridos.

Los sustratos susceptibles de ser utilizados (estaquiosa, rafinosa, melibiosa, melazas de caña de azúcar y/o remolacha y/o permeados de proteína de soja) son digeridos por la levadura de la invención, generando galactosa que sería un sustrato adecuado para la fermentación alcohólica produciéndose etanol u otros compuestos. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener un producto de fermentación que comprende las etapas de cultivar un microorganismo en un medio rico en residuos de α -D-galactosa no reductores en posición terminal, en donde dicha levadura comprende una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión con la forma madura de una α -galactosidasa fusionada en el mismo marco de lectura con una secuencia señal, en donde dicha secuencia señal es capaz de promover la secreción de la α -galactosidasa de una célula de levadura y (b) recuperar el producto de fermentación del medio de cultivo.

Por producto de fermentación se entiende en el contexto de la presente invención un producto que puede ser obtenido a partir de una levadura a partir de un azúcar en condiciones anaerobias. Productos de fermentación que pueden ser obtenidos usando las cepas y métodos de la presente invención incluyen alcoholes (etanol, metanol, butanol), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico), cetonas (por ejemplo, acetona), amino

ES 2 351 296 A1

ácidos (por ejemplo, ácido glutámico), gases (H_2 y CO_2), antibióticos (penicilina, tetraciclina), etc. En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es etanol, que puede ser usado como combustible, en bebidas o a nivel industrial. Típicamente, la fermentación alcohólica para dar lugar a etanol se lleva a cabo durante 30-60 h a una temperatura de en torno a 32°C.

Las condiciones de cultivo para la producción de productos de fermentación son esencialmente las mismas que las usadas en la producción de α -galactosidasa, en lo que se refiere a los medios de cultivo que pueden ser usados como fuente de carbono. Sin embargo, con objeto de mejorar el rendimiento de la reacción, es importante que las condiciones de cultivo sean aquellas que favorecen la fermentación de los monosacáridos. Una vez se haya alcanzado la concentración adecuada de producto de fermentación en el medio, es necesario recuperar dicho producto del medio. La forma de recuperar el producto dependerá de la naturaleza química del producto. En el caso de que el producto de fermentación sea etanol, éste se recupera usando técnicas convencionales entre las que se incluyen, por ejemplo, la destilación.

Los microorganismos de la presente invención también pueden ser transformados con un segundo vector de expresión que contiene un gen que codifica una proteína de interés y así ser utilizadas para la producción de proteínas de interés mediante el cultivo de dichas cepas doblemente transformadas en un medio de cultivo rico en residuos de α -D-galactosa no reductores en posición terminal, como única fuente de carbono.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo que comprende además de la primera construcción de la invención, una segunda construcción con un gen que codifica una proteína de interés.

Los vectores de expresión que pueden ser usados para la expresión de las proteínas heterólogas son esencialmente los mismos que se pueden usar para la expresión de la proteína de fusión con la α -galactosidasa. Sin embargo, es conveniente que los dos vectores tengan marcadores de selección diferentes para asegurarse que ambos permanecen de forma estable en las levaduras. Adicionalmente, los promotores que regulan la expresión de la proteína heteróloga pueden ser los mismos que se usan para regular la expresión de las proteínas de fusión. Promotores útiles para la realización de la presente construcción incluyen:

- Promotores constitutivos como por ejemplo, el promotor de la alcohol deshidrogenasa (ADH1), el promotor del factor de elongación 1 alfa (TEF) y el promotor del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa (TPI), el promotor de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa (GPK), el promotor MRP7 y el promotor de la alcohol oxidasa (AOX1).
- Promotores inducibles como por ejemplo el promotor de la metalotioneina (CUP1) cuya expresión se regula mediante adición de cobre al medio de cultivo, el promotor del gen que codifica el gen FUS1 o el gen FUS2, cuya expresión se activa en presencia de feromonas (el factor α) según se describen en US5063154, el promotor TET cuya expresión se regula en presencia de tetraciclinas, los promotores GAL1-10, GALL, GALS que se activan en presencia de galactosa, el promotor VP16-ER, inducible por estrógenos, y el promotor de la fosfatasa (PH05) cuya expresión se activa en presencia de fosfato y el promotor de la proteína de choque térmico HSP150, cuya expresión se activa a elevada temperatura.
- Promotores reprimibles como por ejemplo el promotor del gen de la enolasa (ENO-1) de *S. cerevisiae* cuya expresión se puede reprimir cuando se hace crecer el microorganismo en una fuente de carbono no fermentable así como promotores cuya expresión está sujeta a represión por glucosa, de forma que la expresión se verá reprimida cuando parte de la lactosa se ha hidrolizado y comienza a aumentar la concentración de glucosa en el medio, el promotor de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *S. cerevisiae* y el promotor de la galactoquinasa (GAL1).

Preferiblemente, se usan promotores distintos en las dos construcciones de forma que se pueda regular independientemente la expresión de la α -galactosidasa y de la proteína heteróloga. Preferiblemente, en aquellos casos en los que se sospeche que la proteína heteróloga pudiese ser tóxica para la célula hospedadora, el promotor usado para regular su expresión es convenientemente un promotor regulable, de forma que se pueda retrasar la expresión de la proteína de interés hasta que se han alcanzado niveles suficientes de biomasa. Como medio de cultivo rico en residuos de α -D-galactosa no reductores en posición terminal, la invención contempla el uso de estaquiosa, rafinosa, melibiosa, melazas de caña de azúcar y/o remolacha, permeados de proteína de soja y una combinación de cualquiera de los anteriores.

Las proteínas de interés pueden carecer de secuencia señal o, alternativamente, pueden sintetizarse con una secuencia señal con el fin de provocar su liberación al medio de cultivo y así facilitar su recuperación. Secuencias señales que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen esencialmente las mismas que se pueden usar para promover la secreción de la α -galactosidasa.

Las cepas doblemente transformadas pueden ser utilizadas convenientemente para la producción de proteínas de interés usando residuos de α -D-galactosa no reductores en posición terminal como fuente principal de carbono. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de una proteína de interés que comprende las etapas de (a) cultivar una cepa de levadura doblemente transformada de acuerdo a la invención en un medio rico en residuos de α -D-galactosa no reductores en posición terminal y (b) recuperar la proteína de interés del medio.

En una forma de realización preferida, el medio rico en residuos de α -D-galactosa no reductores en posición terminal es estaquirosa, melibiosa, rafinosa, melazas de caña 1 de azúcar y/o remolacha, permeados de proteínas de soja y una combinación de cualquiera de los anteriores.

5 Prácticamente no existe limitación con respecto a la proteína de interés que puede ser expresada usando las cepas y métodos de la presente invención. Estas incluyen tanto proteínas humanas y de mamíferos de interés terapéutico como enzimas de distintos orígenes que permitan reconstituir vías metabólicas en levadura y la consiguiente producción de compuestos de interés.

10 Ejemplos de proteínas de interés terapéutico que pueden ser producidas por las células objeto de la invención son eritropoietina (EPO), hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa (CRH), hormona liberadora de hormona somatotropa (GHRH), hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), hormona liberadora de tiotropina (TRH), hormona liberadora de prolactina (PRH), hormona liberadora de melatonina (MRH), hormona inhibidora de prolactina (PIH), somatostatina, hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona somatotropa o del crecimiento (GH), hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), tiotropina (TSH u hormona estimulante del tiroides), prolactina, oxitocina, hormona antidiurética (ADH o vasopresina), melatonina, factor inhibidor Müllleriano, calcitonina, hormona paratifoidea, gastrina, colecistoquinina (CCK), secretina, factor de crecimiento de tipo insulina tipo I (IGF-I), factor de crecimiento de tipo insulina tipo II (IGF-II), péptido natriurético atrial (PNA), gonadotrofina coriónica humana (GCH), insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático (PP), leptina, neuropéptido Y, renina, angiotensina I, angiotensina II, factor VIII, factor IX, factor tisular, factor VII, factor X, trombina, factor V, factor XI, factor XIII, interleuquina 1 (IL-1), factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8 y quemoquinas), interleuquina 12 (IL-12), interleuquina 16 (IL-16), interferones α , β , gamma, factor de crecimiento neuronal (NGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF y KGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF y relacionados), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento glial, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento endotelial, antitripsina 1 alfa, factor de necrosis tumoral, factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos (GM-CSF), ciclosporina, fibrinógeno, lactoferrina, activador de plasminógeno tipo tisular (tPA), quimotripsina, inmunoglobinas, hirudina, superóxido dismutasa y imiglucerasa.

30 Prácticamente cualquier método conocido en la técnica puede ser utilizado para la recuperación de la proteína de interés del interior celular o del medio de cultivo. Si la proteína se produce en el interior de la célula de levadura, es necesario lisar las células para liberar las proteínas de interés. Convencionalmente, las células de levaduras, se lisan mediante lisis hipotónica de esferoplastos formados previamente mediante tratamiento con glucanasas, mediante sonicación o mediante agitación en presencia de bolas de vidrio. Una vez que la proteína de interés se encuentra en el medio, bien mediante liberación del interior celular bien porque la proteína es secretada por la propia maquinaria de secreción de la levadura, se emplean métodos convencionales para la purificación de dicha proteína, incluyendo, sin estar limitado, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, de interacción hidrofóbica, de filtración en gel, HPLC), métodos electroforéticos (isoelectroenfoque preparativo, electroforesis preparativa en geles de poliácridamida-SDS), solubilidad diferencial (precipitación con sulfato amónico), ultracentrifugación preparativa en gradiente de sacarosa. Una vez que se ha alcanzado el grado deseado de pureza, lo que puede requerir más de un paso cromatográfico, es frecuente que sea necesario concentrar la proteína o eliminar sales e iones que puedan ser perjudiciales para su posterior uso. En ese caso, se recurre a técnicas conocidas, tales como liofilización o ultrafiltración.

45 La invención se describe a continuación mediante unos ejemplos que no son limitativos de la invención, sino ilustrativos.

Ejemplos

50 Ejemplo 1

Obtención de la cepa de levadura modificada para producir α galactosidasa

55 *Materiales y métodos*

1. Clonación de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la α galactosidasa

Se diseñaron dos pares de cebadores con el fin de amplificar por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) el gen MEL1 que codifica la α galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se amplificaron dos fragmentos, uno de ellos correspondiente al gen completo de la α galactosidasa (SEQ ID NO:4), amplificado con los siguientes cebadores, con SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 y el otro fragmento correspondiente al gen de la α galactosidasa al que se le eliminaron los 54 nucleótidos que codifican la señal de secreción (SEQ ID NO:7) y amplificado por los siguientes cebadores, con secuencias SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9. El gen completo de la α galactosidasa se insertó en el vector YEpFLAG1 (Eastman Kodak Company Cat. N° IB 13400) para expresión en levaduras, bajo el promotor ADH2 (Alcohol Deshidrogenasa 2) (SEQ ID NO:1) y el terminador transcripcional del gen CYC1 (SEQ ID NO: 10). El segundo producto de amplificación con el gen de la α galactosidasa sin la señal de secreción fue insertado en un vector como el anterior, que presenta además la señal de secreción del factor α de levadura (83 aminoácidos) y el péptido FLAG para su pos-

ES 2 351 296 A1

terior detección inmunológica (SEQ ID NO:2). Las construcciones resultantes fueron transformadas en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (*pep4::HIS3 prb-Δ1.6R HIS3 lys2-208 trp1-Δ101 ura3-52 gal2 can1*) mediante el método de Acetato de Litio (Ito *et al.*, J Bacteriol. 1983 Jan;153(1):163-8).

5 2. Cultivo de las cepas recombinantes

Las cepas transformadas con las dos construcciones se cultivaron en medio CM (Zitomer *et al.*, J Biol Chem. 1976 Oct 25;251(20):6320-6), utilizando como marcador auxótrofo el triptófano. Cuando alcanzaron la fase de crecimiento estacionaria se utilizaron para inocular 100 ml de medio YPHSM (1% de glucosa, 3% de glicerol, 1% de extracto de levadura y 8% de peptona) o bien el mismo medio de cultivo pero conteniendo rafinosa al 2% en vez de glucosa al 1%.

Todos los cultivos ensayados se hicieron crecer a 30°C, con una agitación orbital de 250 r.p.m y partiendo de una absorbancia a 600 nm inicial de 0,05. Se determinaron los valores de absorbancia a 600 nm, actividad α -galactosidasa extracelular e intracelular y dependiendo del caso consumo de rafinosa, melibiosa, fructosa, glucosa y galactosa a diferentes intervalos de tiempo.

En algunos casos se realizaron cultivos en 2 litros de medio en fermentadores de tipo *Biostat-MD* (*Braun-Bio-tech*) monitorizando la aireación (2 l/min), temperatura (30°C), pH, agitación (250 r.p.m). Se recogieron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se analizaron igualmente los parámetros mencionados anteriormente.

20 3. Determinación de la actividad α galactosidasa

Las medidas de la actividad α galactosidasa *in vitro* se llevaron a cabo utilizando el sustrato cromogénico p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNPG) (*Sigma-Aldrich*) siguiendo el método descrito por Kew y Douglas (Kew, O. M. *et al.*, J Bacteriol. 1976 Jan;125(1):33-41). El compuesto incoloro PNPG da lugar a un producto tras la hidrólisis que, a causa del cambio de pH producido al parar la reacción enzimática, adquiere un color amarillo cuantificable utilizando un espectrofotómetro y proporcional a la cantidad de sustrato liberado.

La actividad α -galactosidasa se expresa en unidades enzimáticas; definiendo la unidad enzimática (U.E.) como la cantidad de enzima que libera un nanomol de p-nitrofenil por minuto en las condiciones del ensayo (U.E.= nanomol x min⁻¹ x ml⁻¹). Las unidades se expresan como U.E./ml de medio de cultivo.

35 4. Determinación de la presencia de rafinosa, melibiosa, fructosa, glucosa y galactosa

Para la determinación de rafinosa, melibiosa, fructosa, glucosa y galactosa se utilizó un HPLC (High Performance Liquid Chromatography) de *Waters* con bomba isocrática de la serie Breeze modelo 1515 con detector de índice de refracción modelo 2414 y una columna de separación Sugar Pak I de 6.5 mm x 300 mm.

40 Resultados

En la Figura 1 se muestra el crecimiento celular obtenido mediante medidas de absorbancia a 600 nm y la actividad α -galactosidasa extracelular e intracelular de la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido de expresión que contiene el gen *MEL1* íntegro que codifica para la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* creciendo en un medio sintético con glucosa al 1%. Los datos de actividad enzimática mostrados en la Figura 1 fueron el resultado de 4 medidas independientes. La actividad total es la suma de la actividad intracelular y extracelular. Esta cepa recombinante secreta unas 18700 U.E./ml de media de α -galactosidasa al medio de cultivo, entre las 90 y 140 horas, siendo la actividad total media para ese mismo intervalo de tiempo de 32000 U.E./ml, lo que supone que la actividad extracelular es un 58,4% de la total.

Con el fin de verificar el crecimiento de la cepa recombinante con el gen *MEL1* íntegro en medios con rafinosa, en la Figura 3 se muestran las medidas de absorbancia a 600 nm y de actividad α -galactosidasa total de la cepa creciendo en un medio sintético con rafinosa al 2%. A modo comparativo se muestran las medidas de absorbancia a 600 nm de la misma cepa sin transformar creciendo en rafinosa al 2%. Se puede observar que mientras que la cepa sin transformar alcanza valores de absorbancia en torno a 12 al final del cultivo, en la cepa transformada prácticamente se duplican alcanzando valores en torno a 22. La cepa sin transformar puede utilizar sólo la fructosa de la rafinosa, pero no es capaz de metabolizar la melibiosa. Sin embargo la cepa transformada, además de utilizar la fructosa de la rafinosa, es capaz de utilizar la melibiosa. La determinación mediante HPLC de los azúcares rafinosa, melibiosa, fructosa, glucosa y galactosa confirmaron la presencia de melibiosa en el cultivo en la cepa sin transformar mientras que prácticamente desaparece la melibiosa a las 48 de cultivo en la cepa transformada.

60 Ejemplo 2

Comparación de la actividad α -galactosidasa de la cepa con *MEL1* bajo el promotor *ADH2* [A] y de una cepa con *MEL1* bajo el promotor *ADH1* [B]

Los detalles de clonación y las medidas de la actividad α -galactosidasa están descritos en el Ejemplo 1. El cultivo de la cepa recombinante [A] se llevó a cabo en un medio sintético con glucosa al 1%.

ES 2 351 296 A1

En la Figura 2 se han comparado los datos obtenidos por la cepa [B] descrita en US 5055401 con la cepa recombinante [A] de la invención. Para ello se han extraído los datos de las figuras 7 A y 7B de US 5055401 y se han comparado. Se puede observar que, mientras que en la cepa descrita en US 5055401 se alcanzó a las 36-54 horas una actividad total de α -galactosidasa de 8000 UE/ml, con la cepa [A] de la invención se obtuvieron para ese mismo intervalo de tiempo una actividad total que va de 10000 U.E./ml a 20000 UE/ml, alcanzando, como se ha comentado anteriormente, valores en torno a 32000 U.E./ml en fases posteriores del cultivo. Dicho aumento supone un incremento en actividad α -galactosidasa total del 25% al 300% en la cepa recombinante [A] de la invención con respecto a la cepa [B] descrita en US 5055401. Asimismo, en lo que respecta a la actividad α -galactosidasa extracelular de la cepa [B] descrita en US 5055401, comparada con la cepa recombinante [A] de la invención, se puede observar que en la primera se obtiene una actividad en torno a 2600 U.E./ml, a las 36-54 horas, lo que supone el 32,5% de la actividad total, mientras que en la cepa [A] de la invención, se obtuvieron valores de 3400 a 7800 U.E./ml (aproximadamente un 37,25% de la actividad total) aumentando a 18700 U.E./ml (un 58,4% de la actividad total) en fases posteriores del cultivo.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Construcción de ADN que comprende:

5 (a) un promotor heterólogo regulado mediante represión por glucosa,

(b) una secuencia que codifica una secuencia señal funcional en levadura, y

10 (c) la región del gen MEL1 que codifica la forma madura de α -galactosidasa o una variante funcionalmente equivalente

en donde las secuencias (b) y (c) han de estar bajo el mismo marco de lectura.

15 2. Construcción según la reivindicación 1, en la que el promotor heterólogo regulado mediante represión por glucosa sería el promotor ADH2.

20 3. Construcción según la reivindicación 1, en la que la secuencia señal es la secuencia señal endógena del gen MEL1.

4. Construcción según la reivindicación 1, en la que la secuencia señal es la secuencia señal del factor α de levadura.

25 5. Construcción de ADN que comprende:

(a) el promotor ADH2 o una variante funcionalmente equivalente del mismo,

(b) una secuencia que codifica una secuencia señal funcional en levadura, y

30 (c) la región de un gen que codifica una forma madura de α -galactosidasa o una variante funcionalmente equivalente,

en donde las secuencias (b) y (c) han de estar bajo el mismo marco de lectura.

35 6. Construcción según la reivindicación 5, en la que el gen que codifica la proteína α -galactosidasa sería el gen MEL1.

40 7. Construcción según la reivindicación 5, en la que la secuencia señal es la secuencia señal endógena del gen MEL1.

8. Construcción según la reivindicación 5, en la que la secuencia señal es la secuencia señal del factor α de levadura.

45 9. Proteína codificada por las construcciones según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Vector de expresión que contiene la construcción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

50 11. Un microorganismo que contiene el vector según la reivindicación 10, la construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la proteína según la reivindicación 9.

12. Microorganismo según la reivindicación 11, en la que el microorganismo es una levadura.

13. Microorganismo según la reivindicación 12, en la que el microorganismo es *Saccharomyces cerevisiae*.

55 14. Un método para producir α -galactosidasa que comprende las etapas de (a) cultivar un microorganismo según las reivindicaciones 11, 12 ó 13, en un sustrato que contenga residuos de α -D-galactosa no reductores en posición terminal, y (b) recuperar la α -galactosidasa secretada del medio de cultivo.

60 15. Método según la reivindicación 14, en el que el sustrato que contiene residuos de α -D-galactosa no reductores en posición terminal se selecciona del grupo de rafinosa, melibiosa, estaquiosa, melazas de caña de azúcar y/o remolacha, permeados de proteína de soja y una combinación de cualquiera de los anteriores.

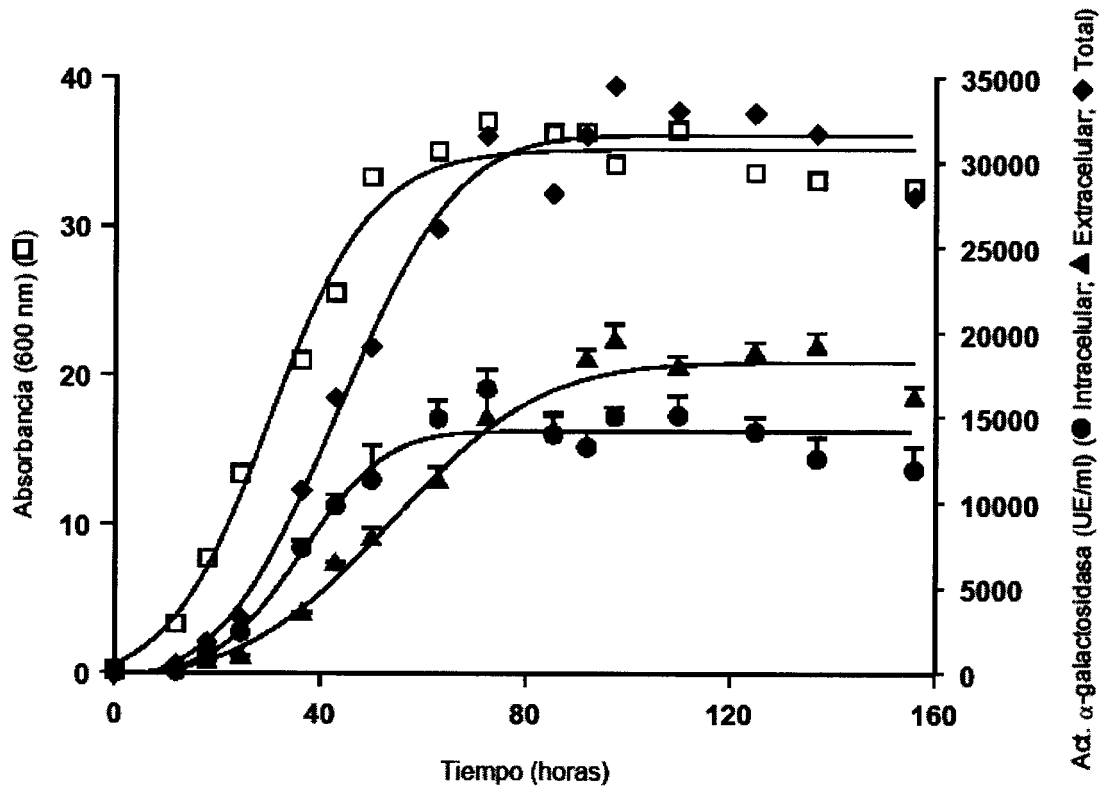


FIGURA 1

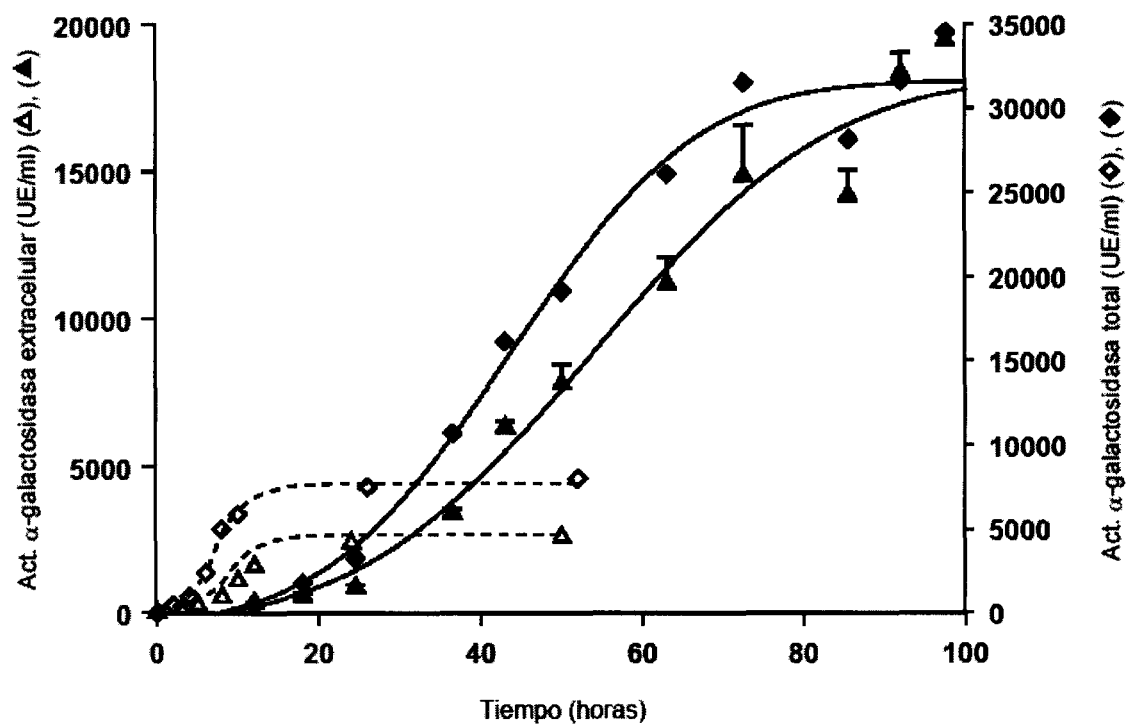


FIGURA 2

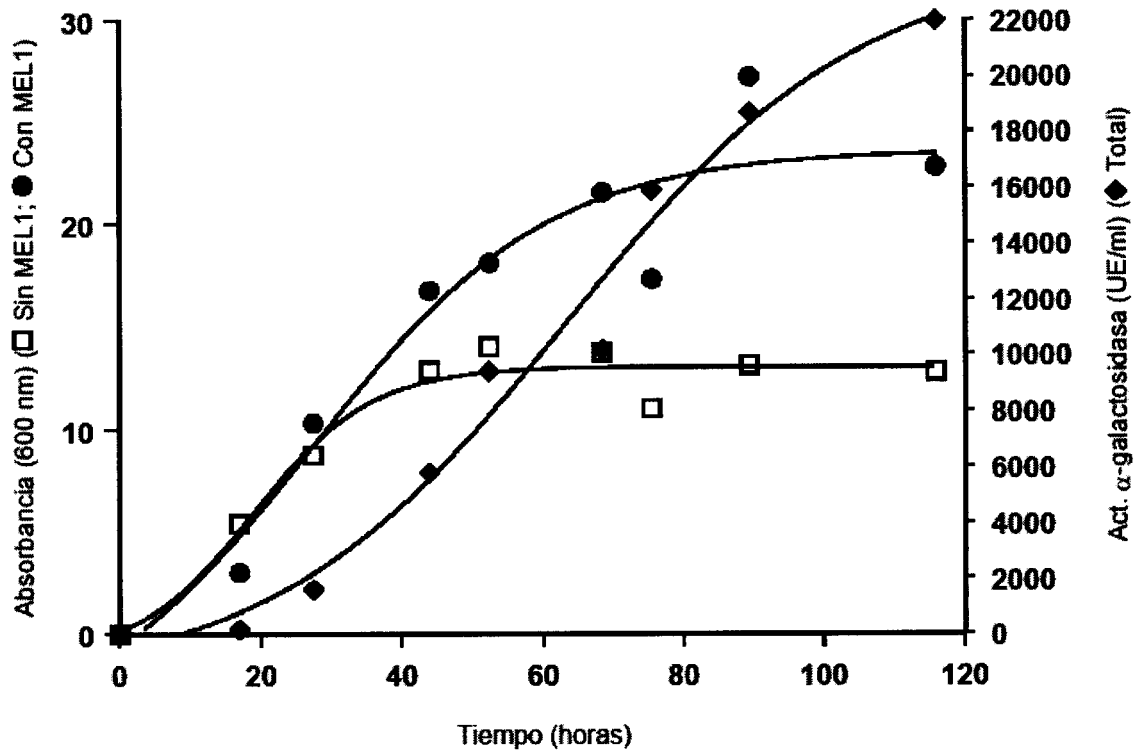


FIGURA 3

ES 2 351 296 A1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> UNIVERSIDADE DA CORUÑA	
5	<120> CEPAS DE <i>S. CEREVISIAE</i> CAPACES DE CRECER EN MEDIOS CON MELIBIOSA, ESTAQUIOSA Y RAFINOSA	
	<130> P4444ES00	
10	<160> 10	
	<170> PatentIn version 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 1201	
	<212> DNA	
20	<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<400> 1	
25	gatccttcaa tatgcgaca tacgctgta tgttcaaggt cccttcgttt aagaacgaaa 60	
	gcggtcttcc ttttgaggga tgtttcaagt tgttcaaadc tatcaaattt gcaaattccc 120	
	agtctgtatc tagagcgttg aatcgggtgat gcgatttggt aattaaattg atgggtgtcac 180	
	cattaccagg tctagatata ccaatggcaa actgagcaca acaataccag tccggatcaa 240	
30	ctggcaccat ctctcccgta gtctcatcta atttttcttc cggatgaggt tccagatata 300	
	ccgcaacacc tttattatgg tttccctgag ggaataatag aatgtcccat tcgaaatcac 360	
	caattctaaa cctgggagaa ttgtatttcg ggtttgtaa ctcgttccag tcaggaatgt 420	
	tccacgtgaa gctatcttcc agcaaagtct ccacttcttc atcaaattgt gggagaatac 480	
35	tcccaatgct cttatctatg ggacttccgg gaaacacagt accgatactt cccaattcgt 540	
	cttcagagct cattgtttgt ttgaagagac taatcaaaga atcgttttct caaaaaaatt 600	
	aatatcttaa ctgatagttt gatcaaaggg gcaaaacgta ggggcaaaca aacggaaaaa 660	
	tcgtttctca aattttctga tgccaagaac tctaaccagt cttatctaaa aattgcctta 720	
40	tgatccgtct ctccggttac agcctgtgta actgattaat cctgcctttc taatcaccat 780	
	tctaattggt taattaaggg attttgtctt cattaacggc tttcgctcat aaaaatggtta 840	
	tgacgttttg cccgcaggcg ggaaaccatc cacttcacga gactgatctc ctctgccgga 900	
	acaccgggca tctccaactt ataagttgga gaaataagag aatttcagat tgagagaatg 960	
45	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa ggcagaggag agcatagaaa tggggttcac tttttggtta 1020	
	agctatagca tgcctatcac atataaatag agtgccagta gcgacttttt tcacactcga 1080	
	aatactctta ctactgctct cttggtggtt ttatcacttc ttggttcttc ttggtaataa 1140	
	gaatatcaag ctacaaaaag catacaatca actatcaact attaactata tcgtaataca 1200	
50	c	1201
	<210> 2	
	<211> 24	
55	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Secuencia que codifica péptido etiqueta para la detección inmunológica	
	<400> 2	
65	gactacaagg atgacgatga caag	24
	<210> 3	

ES 2 351 296 A1

<211> 249

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

5

<400> 3

	atgagatttc cttcaatddd tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct	60
	ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt	120
10	tacttagatt tagaagggga ttfcgatggt gctgtdttgc cattttccaa cagcacaat	180
	aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta	240
	tctttggat	249

15 <210> 4

<211> 1458

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

20

<400> 4

	atgtttgctt tctactttct caccgcatgc atcagtttga agggcgtdttt tgggggtgtct	60
25	ccgagttaca atggccttgg tctcactcca cagatgggtt gggacaactg gaatacgttt	120
	gcctgcgatg tcagtgaaca gctacttcta gacaccgctg atagaatttc tgacttgggg	180
	ctaaaggata tgggttaca gtatatcatt ctggatgact gctgggtctag cggcagagat	240
	tccgacgggt tctctggtgc agatgaacaa aaatttccca atggatggg ccatggttga	300
30	gaccacctgc ataataacag ctttcttttc ggtatgtatt cgtctgctgg tgagtacacc	360
	tgtgctggat atcctgggtc tctgggtcgt gaggaagaag atgcacagtt ctttgcaaat	420
	aaccgcgttg actacttgaa gtacgataat tgttacaata agggtcagtt tgggtacaccg	480
	gaaatttctt accaccgtta caaggccatg tcagatgctt tgaataaaac tggtaggcct	540
35	atattctatt ctctatgtaa ctggggctag gatttaacat tttactgggg ctctggtatc	600
	gccaatctt ggagaatgag tggagatggt actgctgagt tcaactgtcc agatagcaga	660
	tgtccctgtg atggcgatga atacgattgc aagtaocccg gtttccattg ttctattatg	720
	aatattctta acaaggcagc tccaatgggg caaaatgcag gtggtgggtg ttggaatgat	780
40	ctggacaatc tagaggttgg tgtcgggaat ttgactgacg atgaggaaaa ggcacatttc	840
	tctatgtggg caatggtaaa gtctccactt atcattgggtg ccaatgtgaa taacttaaag	900
	gcatcttctg actcaatcta tagtcaagcc tctgtcatcg caattaatca agattcaaat	960
	ggtattccag caacaagagt ctggagatat tatgtttcag acacagatga atatggacaa	1020
45	ggtgaaattc aaatgtggag tggctctct gacaatgggt atcaagtgg tgcctttattg	1080
	aatggaggaa gcgtatctag accaatgaac acgaccttg aagagatttt ttttgacagc	1140
	aatctgggtt caaagaaact gacatcgact tgggatattc acgacctatg ggccaacaga	1200
	ggtgacaact cgacagcgtc tgctatcctt ggacggaata agacagccac cgggtattctc	1260
50	tacaatgcta cggagcaatc ctacaaagac ggtttgtcta agaatgatac aagactgttt	1320
	ggtcagaaaa ttggtagtct ttctccaaat gctatactta acacgactgt tccagctcac	1380
	ggtatcgctt tctatagggt gagaccctct tcttgagctt attggtgagc aaagcagggc	1440
	gagaagtatt gatgattg	1458

55

<210> 5

<211> 54

<212> DNA

60

<213> Secuencia artificial

<220>

65

<223> Cebador directo para amplificar el gen MEL1 integro

ES 2 351 296 A1

<400> 5
ctatatcgta atacaccaag ctgcacctcg cgatggttgc tttctacttt ctca 54

<210> 6
5 <211> 52
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador inverso para amplificar el gen MEL1 integro

15 <400> 6
ggtcgacggg cccggatcca tcgatagatc tcaatcatca atacttctcg cc 52

<210> 7
20 <211> 1362
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

25 <400> 7
gtgtctccga gttacaatgg ccttgggtctc actccacaga tggggtggga caactggaat 60
acgtttgcct gcgatgtcag tgaacagcta cttctagaca ccgctgatag aatttctgac 120
ttggggctaa aggatatggg ttacaagtat atcattctgg atgactgctg gtctagcggc 180
30 agagattccg acggtttcct cgttgcagat gaacaaaaat ttcccaatgg tatggggccat 240
gttgcagacc acctgcataa taacagcttt cttttcggta tgtattcgtc tgctgggtgag 300
tacacctgtg ctggatatcc tgggtctctg ggtcgtgagg aagaagatgc acagttcttt 360
gcaaataacc gcggttgacta cttgaagtac gataattggt acaataaggg tcagtttggg 420
35 acaccggaaa tttcttacca ccggttacaag gccatgtcag atgctttgaa taaaactggg 480
aggcctatat tctattctct atgtaactgg ggtcaggatt taacatttta ctggggctct 540
ggtatcgcca attcttggag aatgagtgga gatgttactg ctgagttcac tgcctcagat 600
40 agcagatgtc cctgtgatgg cgatgaatac gattgcaagt acgccggttt ccattgttct 660
attatgaata ttcttaacaa ggcagctcca atggggcaaa atgcagggtg tgggtggttg 720
aatgatctgg acaatctaga ggttgggtgct ggggaatttga ctgacgatga ggaaaaggca 780
catttctcta tgtgggcaat ggtaaagtct ccacttatca ttgggtgcaa tgtgaataac 840
45 ttaaaggcat cttcgtactc aatctatagt caagcctctg tcatcgcaat taatcaagat 900
tcaaatggta ttccagcaac aagagtctgg agatattatg tttcagacac agatgaatat 960
ggacaagggtg aaattcaaat gtggagtggg cctcttgaca atgggtgatca agtgggtgct 1020
ttattgaatg gaggaagcgt atctagacca atgaacacga ccttgggaaga gatttttttt 1080
50 gacagcaatc tgggttcaaa gaaactgaca tcgacttggg atatctacga cctatggggc 1140
aacagagttg acaactcgac agcgtctgct atccttggac ggaataagac agccaccggg 1200
attctctaca atgctacgga gcaatcctac aaagacgggt tgtctaagaa tgatacaaga 1260
ctgtttggtc agaaaattgg tagtctttct ccaaagtcta tacttaacac gactgttcca 1320
55 gctcacggta tcgccttcta taggttgaga ccctcttctt ga 1362

<210> 8
60 <211> 51
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Cebador directo para amplificar MEL1 sin señal de secreción

ES 2 351 296 A1

<400> 8
cccgggagat ctatcgatgg atccgggccc gtgtctccga gttacaatgg c 51

5 <210> 9
<211> 51
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

10 <400> 9
tgggacgctc gacggatcag cggccgctta tcaagaagag ggtctcaacc t 51

15 <210> 10
<211> 243
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

20 <400> 10
tcgagcgtcc caaaccttc tcaagcaagg ttttcagtat aatgttacat gcgtacacgc 60
25 gtttgtacag aaaaaaaga aaaatttgaa atataaataa cgttcttaat actaacataa 120
ctattaaaaa aaataaatag ggacctagac ttcaggttgt ctaactcctt ccttttcggt 180
tagagcggat gtgggaggag ggcgtgaatg taagcgtgac ataactaatt acatgatatc 240
gac 243

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200900961

②² Fecha de presentación de la solicitud: 08.04.2009

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US5055401 A (ALKO) 08.10.1991	1-15
Y	LEE K M. et al. "Evaluation of the Saccharomyces cerevisiae ADH2 promoter for protein synthesis". Yeast. 2005. Vol. 22, N.º. 6, páginas 431-440. ISSN 0749-503X (print).	1-15
A	BRUNELLI JOSEPH P. "A Series of Yeast Shuttle Vectors for Expression of cDNAs and Other DNA Sequences". Yeast. 1993. Vol. 9, N.º. 12, páginas 1299-130. ISSN 0749-503X.	1-15
A	MAYA DOUGLAS et al. "Systems for applied gene control in Saccharomyces cerevisiae." Biotechnology letters. Jun 2008. Vol. 30, N.º. 6, páginas 979-987. ISSN 0141-5492 (Print).	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
14.01.2011

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/40 (01.01.2006)

C12N9/42 (01.01.2006)

C12N15/81 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI, EBI-SITE, EMBASE, BIOSIS, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US5055401 A (ALKO)	08.10.1991
D02	LEE K M. et al. "Evaluation of the Saccharomyces cerevisiae ADH2 promoter for protein synthesis". Yeast. 2005. Vol. 22, Nº. 6, páginas 431-440. ISSN 0749-503X (print)	
D03	BRUNELLI JOSEPH P. "A Series of Yeast Shuttle Vectors for Expression of cDNAs and Other DNA Sequences". Yeast. 1993. Vol. 9, Nº. 12, páginas 1299-130. ISSN 0749-503X.	
D04	MAYA DOUGLAS et al. "Systems for applied gene control in Saccharomyces cerevisiae." Biotechnology letters. Jun 2008. Vol. 30, Nº. 6, páginas 979-987. ISSN 0141-5492 (Print).	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se relaciona con cepas de *S. cerevisiae* que son capaces de producir @-galactosidasa bajo el control del promotor heterólogo ADH2. Para su mejor secreción, tiene fusionada una secuencia señal, en concreto el factor @ de levadura.

Las reivindicaciones 1-8, 10, 11-13 hacen referencia a la construcción génica en cuestión, a un vector y a un microorganismo que contenga la construcción génica. La reivindicación 9 pretende proteger la proteína que codifica la construcción génica anterior. La reivindicaciones 14 y 15 se refieren a un método para producir @-D-galactosidasa haciendo uso de la construcción génica.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga una construcción génica que contenga como promotor ADH2, como factor de secreción, el factor alpha, unidos al gen MEL1. Por tanto, las reivindicaciones 1-15 serían nuevas según lo mencionado en el art. 6.1 de la LP.

D01, considerado como el estado de la técnica más cercano al objeto de la solicitud, divulga una nueva cepa de *Saccharomyces cerevisiae* a la que se le ha transferido el gen de la @-galactosidasa (MEL1) mediante tecnología del ADN recombinante. La diferencia entre la presente solicitud y el documento en cuestión sería la introducción del promotor ADH2 para controlar la expresión de MEL1. El efecto técnico producto de esta diferencia sería el aumento de la expresividad de MEL1. Por tanto, el problema técnico que plantearía la presente invención sería la provisión de promotores que aumentasen la expresión de MEL1 en cepas de levaduras. La presente solicitud divulga que la introducción del promotor ADH2 consigue incrementos de actividad de @-galactosidasa de entre 25% a 300% con respecto a las cepas divulgadas en D01.

Sin embargo, esta solución no puede considerarse inventiva puesto que en el estado de la técnica existen documentos que ya han demostrado la superior capacidad del promotor ADH2 frente a otros promotores comúnmente utilizados en *Saccharomyces*, como son CUP1 o GAL1 (D02, página 439; D03, tablas 3 y 4). Por tanto, para el experto en la materia sería obvio la elección de ADH2 para incrementar la expresión de @-galactosidasa, teniendo una gran certeza de conseguir incrementos significativos frente a ADH1. Así pues, las reivindicaciones 1-15 no implicarían actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la LP.