

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 116**

51 Int. Cl.:
C12N 15/81 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03729992 .2**
96 Fecha de presentación: **08.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1504103**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54 Título: **Promotores con una eficiencia de transcripción modificada derivados de la levadura metilotrófica Hansenula polymorpha**

30 Prioridad:
10.05.2002 DE 10220894

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2012

73 Titular/es:
**RHEIN BIOTECH GESELLSCHAFT FÜR NEUE
BIOTECHNOLOGISCHE PROZESSE UND
PRODUKTE MBH
EICHSFELDER STRASSE 11
40595 DÜSSELDORF, DE**

72 Inventor/es:
SUCKOW, Manfred

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 377 116 T3

DESCRIPCIÓN

Promotores con una eficiencia de transcripción modificada derivados de la levadura metilotrófica *Hansenula Polymorpha*

- 5 La presente invención se refiere a un ácido desoxirribonucleico (ADN), que comprende al menos una secuencia de promotor que se deriva de un promotor de tipo silvestre de una levadura metilotrófica, cuya eficiencia de transcripción se modula en comparación con la eficiencia del promotor de tipo silvestre. Además, la presente invención se refiere a células huéspedes, vectores de expresión, kits y métodos para producir proteínas usando el ADN de la invención así como diferentes usos de los mismos y a un método para la preparación de vectores de expresión.
- 10 Hongos y, principalmente, levaduras representan sistemas atractivos para la producción de proteínas recombinantes debido a su capacidad para la modificación co- y post-translacional de proteínas, la cual es similar a la de los mamíferos. Para la preparación de proteínas recombinantes muchas veces se expresa la secuencia codificante de un gen para una proteína de interés bajo el control de un promotor heterólogo adecuado. En tal caso, los promotores inducibles de levaduras metilotróficas han demostrado ser particularmente ventajosos.
- 15 Las levaduras metilotróficas comprenden los géneros *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Torulopsis*. Sus promotores se caracterizan por una inducción de transcripción extraordinariamente fuerte así como por una regulabilidad buena y sencilla. Promotores particularmente sencillos son los promotores in vivo responsables por la regulación del metabolismo de metanol. Las levaduras metilotróficas catalizan la oxidación de metanol a través de las etapas intermedias del formaldehído y del formiato hacia el dióxido de carbono, en cuyo caso estas reacciones se catalizan respectivamente por una alcohol- o metanoloxidasas (Aoxp o Moxp), una formaldehído-dehidrogenasa (Fmdp) y una formiato-dehidrogenasa (Fmdhp). El peróxido de hidrógeno que surge en el primer paso se degrada por la catalasa. El compuesto de C1 se asimila mediante reacción de transcetolasa de xilulosa-5(P) con formaldehído. Esta reacción se cataliza mediante la dihidroxiacetona (Dhasp). Las enzimas Aoxp o Moxp, Fmdhp y Dhasp expresadas bajo el control de los promotores AOX o MOX, FMD y DHAS representan en las células inducidas por metanol hasta el 40% de toda la proteína de la célula. En los círculos especializados estos promotores se denominan, por lo tanto, como superpromotores. La mayoría de los promotores para los genes mencionados son reprimibles mediante glucosa y, por lo tanto, son muy bien regulables de forma individual.
- 20 Otro promotor muy fuerte derivado de levaduras metilotróficas es el promotor TPS1, el cual controla la expresión del gen de trehalosa-6-fosfato-sintasa y es inducible por calor. Tps1p cataliza la reacción de glucosa-6-fosfato (GLU6P) y UDP-glucosa (UDPG) hasta trehalosa-6-fosfato y UDP. Las células de levadura tratadas acumulan trehalosa durante un choque térmico de una hora de 27°C a 40°C y desarrollan de esta manera una tolerancia al calor elevada.
- 25 Las levaduras metilotróficas tienen además promotores constitutivos extraordinariamente fuertes. Dos de estos promotores constitutivos muy fuertes son GAPDH (glicerina-aldehído-fosfato-dehidrogenasa) y PMA1 (H⁺-ATPasa 1 enlazada a la membrana de plasma).
- 30 En la representación recombinante de proteínas heterólogas, tanto la actividad de la secuencia de promotor, su regulación como también su integración al genoma de una célula huésped adecuada, determinan la viabilidad económica y la eficiencia del proceso. En general es deseable una actividad de transcripción particularmente alta. Aunque en algunos casos una actividad de transcripción demasiado alta puede conducir a que se dañe o muera la célula huésped, antes que hayan podido introducirse todos los productos génicos heterólogos de la modificación co- y post-translacional necesaria para la actividad. Principalmente, la cantidad de proteínas tóxicas deben regularse de tal modo que el efecto tóxico se minimice hasta el rendimiento óptimo de las proteínas transcritas y modificadas de modo post-translacional. Una regulación así también es difícil de efectuar con los promotores conocidos, inducibles mediante metanol.
- 35 Por lo tanto, es objetivo de la presente invención proporcionar un ADN que comprende una secuencia promotora, el cual satisface los requisitos de sistemas de transcripción de levadura metilotróficas.
- Según la invención este objetivo se logra mediante un ADN tal como se define en la reivindicación 1.
- 40 Se estableció que los promotores MOX, FMD y TPS1 derivados de *Hansenula polymorpha* pueden modularse en su eficiencia de transcripción. Una modulación así de la eficiencia de transcripción puede llevarse a cabo tanto mediante el refuerzo como también mediante la reducción de la actividad de la secuencia promotora y/o integración multiplicada o reducida de la secuencia promotora al genoma de una célula huésped adecuada.
- 45 Por un promotor de tipo silvestre de una levadura metilotrófica ha de entenderse un promotor tal que tiene la misma secuencia de ADN y la misma eficiencia de transcripción que los promotores derivados de una levadura metilotrófica

de procedencia natural. El experto en la materia conoce promotores de tipo silvestre adecuados a partir de la literatura especializada, mediante depósito público y mediante divulgación en bancos de datos. De esta manera, por ejemplo, se han divulgado los promotores FMD, MOX y TPS1 en las solicitudes de patente europeas EP299108, EP173378 y EP1151112.

Ejemplos de secuencias de determinados promotores FMD, MOX y TPS1 de tipo silvestre pueden tomarse de las figuras 4 a 6. Puesto que el análisis secuencial era algunas veces deficiente, principalmente hace diez y hace más de veinte años, pero los posibles errores son reconocibles mediante verificación por medio de métodos rutinarios estandarizados, por promotores de tipo silvestre en el contexto de la invención se entienden no solo los promotores de tipo silvestre divulgados en el estado de la técnica por medio de una descripción, sino también los promotores de tipo silvestre accesibles realmente.

Por eficiencia de transcripción ha de entenderse la producción de transcripto, es decir ARNm por unidad de tiempo. Para el propósito de esta solicitud se determina como la cantidad de una proteína heteróloga que se expresa en una célula huésped adecuada bajo el control de un promotor por unidad de tiempo, en cuyo caso se supone que la eficiencia de translación depende solo de la cantidad de transcripto disponible. La eficiencia de transcripción se determina, por ejemplo, determinando la cantidad de la proteína heteróloga o evaluando las señales de un gen reportero como lacZ o fitasa en diferentes momentos de tiempo mediante métodos estándar.

Particularmente se prefiere un ADN de acuerdo con la invención en el que la eficiencia de la transcripción de la secuencia promotora se incrementa en comparación con la eficiencia del promotor de tipo silvestre insertando un sitio de enlace de ADN. En una forma de realización las secuencias de ADN de la invención tienen incluso una eficiencia de transcripción considerablemente elevada frente a los promotores de tipo silvestre. Esto es tanto más sorprendente por cuanto los promotores de tipo silvestre de las levaduras metilotróficas ya se cuentan entre los promotores más eficientes de todos. Un incremento más y, sobre todo, tan ostensible es por lo tanto supremamente asombroso.

En una forma preferida de realización la invención se refiere a un ADN cuya secuencia promotora en comparación con el promotor de tipo silvestre tiene una eficiencia de transcripción incrementada por al menos el factor 1,5, preferiblemente por al menos el factor 2, particularmente preferible por al menos el factor 2,5.

En otra forma preferida de realización, la invención se refiere a un ADN cuya secuencia promotora tiene una eficiencia de transcripción disminuida en comparación con el promotor de tipo silvestre preferentemente en al menos el factor 0,5.

Las secuencias promotoras de un ADN de acuerdo con la invención se derivan de un promotor derivado del género *Hansenula polymorpha*.

La secuencia promotora de un ADN de la invención se deriva de promotores del grupo de MOX, FMD y TPS1.

Preferentemente, un ADN de acuerdo con la invención comprende al menos una secuencia promotora que se deriva de un promotor de tipo silvestre mediante la inserción, delección y/o el intercambio de al menos una base, preferentemente mediante el intercambio de una o dos bases.

Sorprendentemente se estableció que las secuencias promotoras de tipo silvestre de levaduras metilotróficas tienen regiones de ADN que son similares pero no idénticas a los sitios de enlace de ADN para factores de transcripción de la clase de la proteína bZip, en cuyo caso estas regiones de ADN en la levadura metilotrófica no tienen naturalmente una función de enlace de ADN. Estos sitios de enlace de ADN, llamados crípticos, similares pero no funcionales, para factores de transcripción de la clase de las proteínas bZip representan una posibilidad preferida para modificar la eficiencia de transcripción de promotor. Se estableció que una modificación de estos sitios de ADN crípticos puede cambiar considerablemente la eficiencia de transcripción de promotor de levaduras metilotróficas mediante delección, inserción o intercambio de pares de bases individuales o múltiples. En tal caso, la formulación de estos sitios de enlace de ADN, como ADN palindrómico muestra principalmente una modificación fuerte de la actividad de transcripción.

Por lo tanto, en una forma particularmente preferida de realización, la presente invención comprende un ADN cuya secuencia promotora tiene al menos un sitio de enlace de ADN, preferentemente un sitio de enlace de ADN palindrómico para factores de transcripción de la clase de las proteínas bZip.

Los factores de transcripción de la clase de las proteínas bZip se describen, por ejemplo, en Suckow et al., J. Mol. Biol. (1998) 276, 887-902. Las proteínas bZip tienen una región básica que es responsable del reconocimiento de ADN, así como un "cierre cremallera" de leucina C-terminal el cual es responsables de la formación de dímeros específica de estos factores. Los sitios de formación de ADN correspondientes de las proteínas bZip son en su mayoría secuencias palindrómicas o pseudopalindrómicas con 10 o 9 pares de bases.

Además, se estableció que la eficiencia de transcripción de secuencias promotoras de las levaduras metilotróficas puede modularse modificando regiones de ADN cuyo motivo es similar a los sitios de enlace de ADN palindrómicos de las proteínas Zinkfinger. Estas regiones de ADN pueden modificarse por delección, inserción o intercambio de al menos un par de bases, en cuyo caso surge preferentemente un sitio de ADN palindrómico para proteínas Zinkfinger. Por lo tanto, en una forma preferida de realización, la secuencia promotora de ADN de la invención comprende al menos un sitio de enlace de ADN, preferentemente un sitio de enlace de ADN palindrómico, para proteínas Zinkfinger.

Tanto los motivos de ADN para los factores de transcripción de la clase de las proteínas bZip como también para las proteínas Zinkfinger, son corrientes para el experto en el campo de biología molecular. De esta manera, en la implementación de la presente invención, el experto en la materia puede buscar en todas las secuencias de promotores de tipo silvestre las secuencias de ADN que se aproximen a los motivos mencionados y mediante métodos estándar modificarlos en sitios de enlace funcionales y/o idénticos para proteínas bZip o proteínas Zinkfinger.

Particularmente se prefieren secuencias de ADN de la invención cuya secuencia promotora tiene al menos un sitio de enlace de ADN, que corresponde esencialmente al sitio de enlace ATF/CREB, al sitio de enlace YAP, al sitio de enlace C/EBP, al sitio de enlace AP1 o al G-Box. Modalidades ejemplares de estos sitios de enlace preferidos se muestran en la figura 8 (ejemplo para AP1 o G-Box). "Esencialmente" significa en tal caso que, por cadena, no más de tres, preferible dos bases o solo una base de la secuencia se desvía(ro)n de la secuencia en el sitio de enlace mencionado.

La secuencia promotora de una ADN de la invención contiene al menos una secuencia de ADN palindrómica que se deriva de las secuencias indicadas en SEQ ID NO: 1-4, 11, 13, 16 o 20.

Tabla 1

SEQ ID NO:	Secuencia	Denominación de referencia
1	CACTGGTCAC	FMD AC1
2	ATGACTTTGG	FMD AC2
3	CTGACAGGGT	FMD AC3
4	GTGACGGAAT	FMD AC4
11	ATGGTGTCAT	MOX AC1
13	CGAATGTAAT	MOX Y1
16	ATGGTGAGAT	TPSI AC1
20	ATTGACCAAT	TPSI C1

La tabla 1 muestra las secuencias bZip crípticas preferidas en los promotores FMD, MOX y TPS1 de acuerdo con las figuras 4 a 6.

La secuencia palindromizada comprende preferentemente al menos 8 a 20, preferentemente 8 a 12, particularmente preferible 10 bases.

La secuencia palindromizada puede ser simétrica o asimétrica. Preferentemente es simétrica. La secuencia palindromizadas no se desvía en más de, máximo, 2 bases por cadena, particularmente preferible solo en una base y muy particularmente preferible no se desvía en absoluto de una secuencia completamente palindrómica.

Las moléculas de ADN de la invención pueden prepararse sintéticamente, por ejemplo, según métodos corrientes o, no obstante, aislarse de bibliotecas de ADN adecuadas y mutarse a continuación. La preparación de tales bibliotecas es igualmente conocida para el experto en la materia. Un aislamiento se efectúa, por ejemplo, preparando una sonda con una longitud de al menos 200 - 400 bp y la secuencia de un promotor de tipo silvestres de una levadura metilotrófica y con este se selecciona una biblioteca de ADN, principalmente una biblioteca de ADN genómica. Una sonda tal puede prepararse usando cebadores (primers) adecuados, que tienen de preferencia una longitud de 20 - 21 bp respectivamente y tienen secuencias adecuadas, y ADNc o genómico de levaduras metilotróficas como "template" (plantillas), por medio de PCR (Polymerase Chain Reaction o reacción en cadena de polimerasa).

Las sondas pueden sintetizarse, por ejemplo, o prepararse fragmentando ADN de promotor de tipo silvestre disponible. También es posible seleccionar directamente con sondas correspondientes a partes de la secuencia promotora. Pero un procedimiento tal es menos preferible debido a la conservación deficiente de la secuencia dentro de partes no codificantes-

Las moléculas de ADN de la invención pueden comprender además al menos una secuencia de ADN para un gen homólogo y/o heterólogo, la cual se encuentra bajo el control de transcripción de la secuencia promotora.

Por "gen heterólogo" debe entenderse la región codificante de un gen estructural que no se encuentra bajo el control del propio promotor (homólogo) o no se expresa en el organismo del cual se deriva, o bien no se expresa bajo el control del propio organismo ni en el organismo original.

la molécula de ADN de la invención puede comprender además una secuencia codificante para un péptido de señal, la cual garantiza la exportación de la proteína expresada, en cuyo caso la secuencia de ADN que codifica el péptido de señal preferentemente está enlazado de forma directa con el gen heterólogo a expresar. Para la secreción y modificación de muchas proteínas eucariotas se requiere fusionar la secuencia de proteína en el terminal N con una secuencia de señal con el fin de direccionar los polipéptidos al aparato de secreción. Aquí se consideran, por ejemplo, componentes del gen S. Occidentalis GAM1 o de un gen hormonal del cangrejo Carcinus maenas (CHH), que se han usado exitosamente para la secreción de hirudina (Weydemann et al., 1995). Un ADN de acuerdo con la invención comprende preferentemente una señal de secreción seleccionada del grupo GAM, GAM-kex2, CHH-kex2, MF α -prepro y de la señal de secreción de lisozima de pollo. Las señales de secreción previamente mencionadas son conocidas por el experto en la materia a partir del estado de la técnica, por ejemplo de los documentos patentes EP 394,538 B1, EP 716,705 B1 y de la solicitud de patente europea EP 725,822 A1. Además, el ADN de la invención puede comprender un elemento terminador que contiene estructuras de señal para la polimerasa de ARN que conducen a la terminación de la transcripción. Ejemplos de elementos terminadores utilizables son el terminador MOX o el terminador FO1 de H. polymorfa.

También es objeto de la invención una célula huésped que contiene al menos un ADN de la invención, en cuyo caso la célula huésped es una célula procariota o eucariota.

La célula eucariota puede ser, por ejemplo, una célula vegetal. La célula es preferentemente una célula de hongo, particularmente preferible una célula de levadura. Como célula huésped para la realización de la presente invención se consideran, por ejemplo, hongos filamentosos como, por ejemplo, Aspergillus, Neurospora, Mucor, Trichoma, Acremonium, Sordaria y Penicillium o levaduras como Saccharomyces, Hansenula, Pichia, Torulopsis, Kluyveromyces, Schwanniomyces, Yarrowia, Arxula, Trichosporon y Candida.

Muy particularmente se prefiere una célula de levadura metilotrófica, principalmente una tal del género Candida, Torulopsis, Hansenula o Pichia. La más preferida es Hansenula polymorfa.

La presente invención también se refiere a vectores de expresión, preferentemente plásmidos en los que el vector comprende un ADN de acuerdo con la invención.

En una forma preferida de realización tales vectores de expresión contienen el gen de fitasa o lacZ como marco de lectura reportero.

La presente invención proporciona además un kit que comprende:

(a) un vector de expresión de acuerdo con la invención que es adecuado para incorporar un ADN que recombina una proteína recombinante, y

(b) una célula huésped adecuada para producir la proteína recombinante.

La incorporación del ADN que codifica una proteína recombinante puede efectuarse mediante todos los métodos de clonación conocidos en el estado de la técnica. Sin embargo, estos no se describen en detalle porque pertenecen a las herramientas elementales del experto en la materia.

También se proporciona un kit que comprende:

(a) un vector de expresión de acuerdo con la invención que es adecuado para incorporar un ADN que codifica una proteína recombinantes, y

(b) una célula huésped que es adecuada para producir la proteína recombinante bajo el control de transcripción de la secuencia promotora.

Las moléculas de ADN, las células huéspedes, los vectores de expresión y los kits de la invención pueden usarse para la expresión recombinante de un gen bajo el control de la secuencia promotora para producir una o varias proteínas.

De esta manera, la presente invención también se refiere al uso de los objetos de la invención para producir proteínas.

Por "expresión recombinante en una célula huésped adecuada" deben entenderse todos los métodos de expresión conocidos en el estado de la técnica en sistemas de expresión conocidos que podrían emplearse aquí. Sin embargo, éstos no se describen en detalle porque pertenecen a las herramientas elementales del experto en la materia.

También es objeto de la invención un método para producir una o varias proteínas que comprende

(i) la construcción de un vector de la invención;

(ii) la introducción del vector de expresión obtenido en (i) a una célula huésped que es adecuada para la producción de la proteína recombinante, opcionalmente después de la inducción de la secuencia promotora;

(iii) el cultivo de las células huéspedes obtenidas en (ii);

(iv) y opcionalmente la inducción de la secuencia promotora de una manera conocida per se.

También es objeto de la invención un método para producir una o varias proteínas que comprende:

(i) introducir un vector de expresión según la invención a una célula huésped que es adecuada para producir la proteína recombinante, opcionalmente después de inducir la secuencia promotora;

(ii) cultivar las células huéspedes obtenidas en (i);

(iii) y opcionalmente inducir la secuencia promotora de una manera conocida per se.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la producción de los vectores de expresión de acuerdo con la invención tal como se define en la reivindicación 20.

Las figuras y ejemplos explican la invención.

Figuras

La invención se explica en mayor detalle a continuación bajo la referencia a las figuras, en cuyo caso las figuras muestran lo siguiente:

Figuras 1A y 1B muestran la eficiencia de expresión para cepas con los genes reporteros lacZ (Figura 1A) y fitasa (Figura 1B) bajo el control de las variantes de promotor FMD según la invención (FMD id1 y FMD id1-4) en comparación gráfica con el promotor de tipo silvestre (FMD wt, cepa con promotor de tipo silvestre) después de crecimiento de 24 horas sobre glucosa (gris claro) o glicerina (gris oscuro). De hecho, el valor del promotor FMD id1 después de la inducción de glicerina es relativamente bajo tanto con lacZ como también con fitasa como gen reportero, aunque es muy alto en términos absolutos (en comparación con el promotor wt FMDr) y además similarmente alto que bajo condiciones de glucosa. Esto indica que FMD id1 es un promotor constitutivo respecto de las fuentes de carbono glicerina y glucosa. FMD id1-4 tiene sobre glucosa valores similares como los del promotor wt FMD, aunque muestra sobre glicerina valores ostensiblemente más altos. Tanto FMD id1 como también FMD id1-4 muestran de esta manera una regulación y una fuerza modificada frente al promotor wt FMD.

La figura 2 muestra los factores de regulación (el cociente de los valores medidos de actividad sobre glicerina sobre glicerina y glucosa) de las diferentes variantes de promotor FMD id1 y id1-4 con lacZ (gris oscuro) o fitasa (gris claro) como gen reportero en comparación con el factor de regulación del promotor FMD de tipo silvestre (FMD wt). Un cociente de 1 significa que el promotor es constitutivo respecto de las fuentes de carbono estudiadas. Valores >1 muestran la extensión de la des-represión de glicerina. Comparado con el promotor wt FMD el promotor FMD id1 es entonces constitutivo, mientras que el promotor FMD id1-4 es muy capaz de des-reprimirse.

La figura 3 muestra un examen de recubrimiento de X-Gal con cepas que se cultivaron previamente a 37°C sobre placas de YNB/glucosa. Tanto con el plásmido MOX pC11 MOX idAC1 como también con el promotor TPS1 se mostró que la palindromización del primer (el más cercano al TATA box) motivo similar a la secuencia ATF/CREB bajo la condición ensayada conducía a un incremento de la actividad promotora, comparado con el promotor respectivo de tipo silvestre (plásmido pC11 MOX wt, plásmido pC11 TPS wt).

Promotor MOX

- Plásmido pC11 MOX idAC1: secuencia AC1 natural (críptica) (atggtgtcat) idealizada por dos intercambios hacia atgacgtcat (ATF/CREB sitio de enlace). Las bases modificadas se subrayan (también en los siguientes ejemplos).

5 - Plásmido pC11 MOX idY1: secuencia Y1 natural (críptica) (cgaatgtaat) idealizada por cuatro intercambios hacia attacgtaat (sitio de enlace YAP).

Promotor TPS1:

- Plásmido pC11 TPS idAC1: secuencia AC1 natural (críptica) (atggtgagat) idealizada por cuatro intercambios hacia atgacgtcat (ATF/CREB sitio de enlace).

10 - Plásmido pC11 TPS idC1: secuencia C1 natural (críptica) (attgaccaat) idealizada por dos intercambios hacia attgcgcaat (C/EBP sitio de enlace)]

Figuras 4 a 6: en las Figuras 4 a 6 el TATA box y los sitios de enlace crípticos individuales se representan como sigue.

- Doblemente subrayados: presunto TATA BOX.

- Enmarcado con línea continua: posibles sitios de enlace ATF/CREB crípticos para proteínas bZip.

15 - Enmarcado con línea discontinua: posibles sitios de enlace YAP crípticos para proteínas bZip.

- (AC = Sitio de enlace ATF/CREB crípticos; Y = sitio de enlace YAP críptico; C = sitio de enlace C/EBP críptico).

- Las bases con homología hacia la secuencia de consenso se subrayan.

20 - La numeración se refiere al inicio de traducción. Todas las secuencias terminan con guanina. Esta guanina es respectivamente la primera base de un sitio de corte EcoRI gaattc. Inmediatamente a continuación sigue el respetivo codón de inicio. Respecto de la atg la guanina dicha tiene de esta manera el número (-6).

La figura 4 muestra la secuencia del promotor FMD de tipo silvestre usado en los ejemplos con presunto TATA-BOX y posibles sitios de enlace crípticos para proteínas bZip. Se modificaron los sitios 1 a 4 enmarcados con líneas continuas que son todas las variantes crípticas de la secuencia ATF/CREB. Las variantes idealizadas se designaron con id1 a id4.

25 AC: secuencia ATF/CREB críptica

id# La secuencia ATF/CREB críptica con el número respectivo se transfirió a una secuencia ATF/CREB ideal.

La figura 5 muestra la secuencia del promotor MOX de tipo silvestre usado en los ejemplos con presunto TATA-BOX y posibles sitios de enlace crípticos para proteínas bZip. Se modificaron los sitios 1 enmarcados con línea continua (idAC1) y los sitios 1 enmarcados con línea punteada (idY1).

30 AC: Secuencia ATF/CREB críptica.

idAC# La secuencia ATF/CREB críptica con el número respectivo se transfirió a una secuencia ATF/CREB ideal.

Y: Sitio de enlace YAP críptico.

idY# El sitio de enlace YAP críptico con el número respectivo se transfirió a un sitio de enlace YAP ideal.

35 La figura 6 muestra la secuencia del promotor TPS9 de tipo silvestre usado en los ejemplos con presunto TATA-BOX y posibles sitios de enlaces crípticos para proteínas bZip. Se modificaron los sitios enmarcados 1 con línea continua (idAC1) y los sitios 1 enmarcados con línea punteada (idC1).

AC: Secuencia ATF/CREB críptica.

idAC# La secuencia ATF/CREB críptica con el número respectivo se transfirió a una secuencia ATF/CREB ideal.

C: Críptica C/EBP-Sitio de enlace.

idC# El sitio de enlace C/EBP críptico con el número respectivo se transfirió a un sitio de enlace C/EBP ideal.

Las figuras 7A, 7B y 7C muestran mapas génicos de los plásmidos reporteros lacZ pC11-FMD, pC11-MOX y pC11-TPS1, que solo se distinguen por el respectivo promotor indicado en el nombre de plásmido.

- 5 La figura 8 muestra sitios de enlace idea para proteínas bZip, en cuyo caso la primera columna refleja la denominación, la columna media la secuencia idealizada y la columna a la derecha el origen biológico de la secuencia.

Ejemplos

Introducción

- 10 Los siguientes ejemplos muestran la modificación de la eficiencia de transcripción de promotores de levadura metilotrófica tal como la de los promotores FMD, MOX y TPS1 mediante transferencia de sitios de enlace de ADN crípticos, individuales o múltiples, a sus derivados palindrómicos y, de esta manera formalmente idealizados.

Representación de promotores de tipo silvestre modificados

- 15 Los promotores de tipo silvestre a modificar (ver figuras 4 (FMD), 5 (MOX), y 6 (TPS1)) se transfirieron a pUC18 y allí se modificaron de manera dirigida de una manera conocida per se por medio de mutagénesis PCR. Después de verificar los intercambios mediante análisis secuencial los promotores modificados se subclonaron en plásmidos de expresión que contenían fitasa o lacZ como marco de lectura reportero. Las dos series de plásmidos reporteros generadas de esta manera se distinguen solo en sus secuencias de promotor (ver, por ejemplo, para lacZ como gen reportero las figuras 7A (promotor FMD), figura 7B (promotor MOX) y figura 7C (promotor TPS1)).

- 20 Sistema de ensayo integrador

- 25 Para poder comparar promotores entre sí, las dosis de gen reportero de las cepas a comparar deben ser comparables. Por lo tanto, se construyó el siguiente ensayo integrador el cual es adecuado tanto para plásmidos reporteros lacZ como también para plásmidos reporteros de fitasa. H. polymorfa se transformó con el respectivo plásmido reportero y se generaron 48 cepas con ADN de plásmido integrado por constructo. Estas 48 cepas se sometieron respectivamente a continuación a un ensayo de proteína reportero. Este ensayo suministró dos informaciones: por una parte, las fuerzas de expresión de gen reportero condicionadas por el constructo en la condición ensayada como determinación de punto final, por otra parte, la identificación de las dos cepas respectivas con las más altas ratas de expresión de gen reportero. Estas cepas se sometieron luego a otros experimentos comparativos. Además, en ellas se determinó el número de copias del plásmido reportero integrado para excluir que cualesquiera actividades de promotor fortalecidas se atribuyan a un efecto de dosis génica.

Determinación de variantes de promotor FMD con actividad elevada y/o regulación modificada

- 35 Las cepas con id1 o id1-4 en la denominación de cepa contienen casetes de expresión con variantes de promotor FMD con modificaciones deliberadas en la región de sitios de enlace crípticos bZip (aquí: en la región de las secuencias ATF/CREB 1 a 4). Los diferentes promotores se ensayaron tanto en combinación con lacZ como también en combinación con el gen de fitasa.

Para la cuantificación de la β -galactosidasa se realizaron mediciones ONPG (ONPG: orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido; J. H. Miller (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, NY, USA) con fracciones solubles intracelulares.

- 40 Para fitasa se realizó el ensayo de fitasa con sobrenadantes de cultivo (A F. Mayer, K. Hellmuth, H. Schlieker, R. Lopez-Ulibarry, S. Oertel, U. Dahlems, A. W. M. Strasser, A. P. G. M. van Loon (1999) An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of Hansenula polymorfa. Biotechnology and Bioengineering 63, 373-381; L. Pasamontes, M. Haiker, M. Wyss, M. Tessier, A. P. G. M. van Loon (1997) Gene cloning, purification and characterization of a heat-stable fitasa from the fungus Aspergillus fumigatus. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1696-1700).

- 45 Independiente del gen reportero se analizaron dos características diferentes de promotor: fuerza y regulación. La determinación de los números de copias relativos de los plásmidos integrados arrojó que las cepas comparadas con promotores modificados contienen menos o la misma cantidad de copias que la respectiva cepa que sirve de fundamento con el promotor FMD de tipo silvestre.

Fuerza de los promotores FMD modificados

Para evaluar la fuerza del respectivo promotor FMD modificado de acuerdo con la invención en comparación con la fuerza del promotor FMD de tipo silvestre se realizó el siguiente experimento. La respectiva cepa más fuerte por plásmido reportero se cultivó por 48 horas sobre glucosa o sobre glicerina como fuente de carbono. Después de 4, 24 y 48 horas se cultivaron células (*lacZ*) o sobrenadante de cultivo (gen de fitasa). Para *lacZ* se prepararon fracciones solubles intracelulares a partir de células cosechadas, con las cuales a continuación se realizó una medición ONPG para determinar la actividad de β -galactosidasa específica. Para fitasa se realizó un ensayo de fosfatasa en el que se emplearon directamente sobrenadantes de cultivo cosechados. Las figuras 1 A y B muestran los valores de medición absolutos de las cepas ensayadas después de un crecimiento de 24 horas sobre glucosa (figura 1A) y glicerina (figura 1 B). Tanto con *lacZ* como también con el gen de fitasa se logran valores máximos con los promotores modificados, los cuales se encuentran ostensiblemente por encima de los valores alcanzados con el promotor FMD de tipo silvestre. Este efecto en general se acentuó de manera más fuerte con *lacZ* (dibujo 1B) que con el gen de fitasa (dibujo 1A). Esto se lleva a cabo siendo la fitasa una glicoproteína secretora, para lo cual debe completarse una gran cantidad de pasos de transporte y modificación entre la transcripción del gen y la aparición del producto génico activo en el sobrenadante de cultivo, los cuales no son necesarios para la generación de la β -galactosidasa localizada citosólica. Tanto con el gen de fitasa como también con *lacZ*, las variantes individuales de promotor FMD sobre glucosa logran actividades más altas que el promotor de tipo silvestre sobre glicerina. En el caso de *lacZ*, los valores de punta (máximos) obtenidos con el promotor de tipo silvestre se excedieron por un factor de 3,5, en el caso de gen de fitasa en un factor de hasta 2,5 (véanse figuras 1A y 1B).

Regulación de promotores FMD modificados

Las variantes ensayadas de promotor FMD mostraron parcialmente una regulación que se desvía de la del promotor de tipo silvestre. Como medida para la regulación se formó el cociente de los valores de medición después de un cultivo de 24 horas sobre glicerina y sobre glucosa. Un factor de 1 significa constitutividad respecto de las fuentes de carbono investigadas. Factores superiores muestran que el promotor respectivo sobre glicerina tiene una actividad superior que sobre glucosa. El orden de los factores de regulación medidos con las diversas variantes de promotor FMD es cualitativamente idéntico a los dos genes reporteros (*lacZ* y gen de fitasa) (figura 2): $id1-4 > wt > id1$.

El promotor *id1* es aproximadamente constitutivo mientras que el promotor *id1-4* con ambos genes reportero presenta un factor de regulación superior que el promotor FMD de tipo silvestre (véase figura 2).

De esta manera se mostrado que de acuerdo con la invención tanto la fuerza como también la regulación de promotores metilotróficos, en este caso el promotor FMD, pueden modificarse significativamente.

Variantes de promotor MOX y TPS1 con actividad superior en medios con glucosa como fuente de carbono

Para demostrar la capacidad de transferencia de la modulabilidad arriba mostrada de la eficiencia para los promotores FMD hacia otros promotores de levaduras metilotróficas, también se moduló la eficiencia de transcripción de un promotor MOX y de un promotor TPS1 de acuerdo con la invención. En la secuencia del promotor MOX de *H. polymorpha* se identificaron cinco sitios de enlace crípticos para proteínas bZip, y de hecho dos motivos con similitud con la secuencia ATF/CREB y tres motivos con similitud con el sitio de enlace YAP (véase figura 5). En analogía a las modificaciones realizadas en el promotor FMD se palindromizaron dos de estos motivos de secuencia. Las variantes resultantes de promotor MOX-*idA/C1* y MOX-*idY1* así como el promotor MOX de tipo silvestre, se transfirieron al plásmido reportero *lacZ*, como ya se describieron para el promotor FMD, de tal modo que tomaron el control del gen reportero.

En la secuencia del promotor TPS1 se identificaron en total ocho motivos bZip crípticos posibles (véase figura 6). De los motivos mostrados en este ejemplo cinco tienen similitud con la secuencia ATF/CREB, dos con el sitio de enlace C/EBP y uno con el sitio de enlace YAP. Para este promotor se construyeron dos variantes cada una con un motivo de secuencia palindromizado, TPS-*idA/C1* y TPS-*idC1*.

Otros motivos crípticos bZip o Zinkfinger son corrientes para el experto en la materia mediante análisis más detallado, por ejemplo utilizando algoritmos de comparación sustentados por procesamiento electrónico de datos.

Por constructo se generaron 48 cepas. Tal como se describió para los constructos FMD, por medio de un ensayo de recubrimiento de X-Gal primero se determinaron las cepas con las actividades determinadas de gen reportero más altas, que luego se analizaron más detalladamente. La figura 3 muestra un ensayo de recubrimiento X-Gal de cinco de estas cepas que se habían cultivado previamente a 37°C sobre placas de YNB/glucosa. Tanto con el promotor MOX como también con el promotor TPS1 se mostró que la palindromización del primer (que se encuentra más cercano al TATA box) motivo similar a la secuencia ATF/CREB bajo la condición ensayada conducía a un incremento visible de la actividad promotora, comparada con el respectivo promotor de tipo silvestre (véase figura 3). Con otras fuentes de carbono ensayadas, este efecto no pudo observarse. Ese resultado muestra que también

pueden modificarse las propiedades de transcripción del promotor MOX y TPS1 mediante la modificación, principalmente palindromización de los sitios de enlace de ADN ya presentes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> RHEIN BIOTECH GESELLSCHAFT FÜR NEUE BIOTECHNOLOGISCHE PROZESSE Y PRODUKT MBH

5 <120> Promotores con eficiencia de transcripción modificada

<130> P33924-01912

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

10 <211> 10

<212> DNA

<213> Hansenula polymorfa

<220>

<223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor FMD

15 <400> 1

cactggtcac 10

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

20 <213> Hansenula polymorfa

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Segmento del promotor FMD

<400> 2

atgactttgg 10

25 <210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> Hansenula polymorfa

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia: Segmento del promotor FMD

<400> 3
 ctgacaggg 10
 <210> 4
 <211> 10
 5 <212> DNA
 <213> Hansenula polymorfa
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: Segmento del promotor FMD
 <400> 4
 10 gtagcggaat 10
 <210> 5
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Hansenula polymorfa
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: Segmento del promotor FMD
 <400> 5
 atgacagcat 10
 <210> 6
 20 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Hansenula polymorfa
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: Segmento del promotor FMD
 25 <400> 6
 tggaggtcaa 10
 <210> 7
 <211> 10
 <212> DNA
 30 <213> Hansenula polymorfa

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Segmento del promotor FMD

<400> 7

atgagccagt 10

5 <210> 8

<211> 10

<212> DNA

<213> Hansenula polymorfa

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia: Segmento del promotor FMD

<400> 8

tccagatcat 10

<210> 9

<211> 10.

15 <212> DNA

<213> Hansenula polymorfa

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Segmento del promotor FMD

<400> 9

20 ggaggctcag 10

<210> 10

<211> 10

<212> DNA

<213> Hansenula polymorfa

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia: Segmento del promotor FMD

<400> 10

atttcgtaat 10

<210> 11

30 <211> 10

<212> DNA

<213> Hansenula polymorfa

<220>

<223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor MOX

5 <400> 11

atggtgtcat 10

<210> 12

<211> 10

<212> DNA

10 <213> Hansenula polymorfa

<220>

<223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor MOX

<400> 12

cttggtcat 10

15 <210> 13

<211> 10

<212> DNA

<213> Hansenula polymorfa

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor MOX

<400> 13

cgaatgtaat 10

<210> 14

<211> 10

25 <212> DNA

<213> Hansenula polymorfa

<220>

<223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor MOX

<400> 14

30 gaagcgtaat 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Hansenula polymorfa
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor MOX
 <400> 15
 gcccggaat 10
 <210> 16
 10 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Hansenula polymorfa
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor TPS1
 15 <400> 16
 atggtgagat 10
 <210> 17
 <211> 10
 <212> DNA
 20 <213> Hansenula polymorfa
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor TPS1
 <400> 17
 atgaaaggct 10
 25 <210> 18
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Hansenula polymorfa
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor TPS1

<400> 18
 atgaatctcc 10
 <210> 19
 <211> 10
 5 <212> DNA
 <213> Hansenula polymorfa
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor TPS1
 <400> 19
 10 atgacgatat 10
 <210> 20
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Hansenula polymorfa
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor TPS1
 <400> 20
 attgaccaat 10
 <210> 21
 20 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Hansenula polymorfa
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor TPS1
 25 <400> 21
 attgcacca 10
 <210> 22
 <211> 10
 <212> DNA
 30 <213> Hansenula polymorfa

<220>

<223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor TPS1

<400> 22

gattcgtaat 10

5 <210> 23

<211> 10

<212> DNA

<213> Hansenula polymorfa

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia: segmento de promotor TPS1

<400> 23

tttcgtcat 10

<210> 24

<211> 1230

15 <212> DNA

<213> Hansenula polymorfa

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Promotor FMD

<400> 24

ES 2 377 116 T3

agcttgagca agttctcaaa cgcggtttg tcgacgtctt cccttatgctg actcctgcat	60
taggaagcag cccagtagta ggttgaggcc gttgagcacc gccgccgcaa ggaatggtgt	120
cgacgcggag aacgatctcc tcgacgcgga gaacgatctc ctcgagatcc aggaagcgca	180
acgacgcggg gaatttcgta atcttccccg aggaaaaccg cttcccaaag atttcaccgg	240
caataacgcc ttcattgacc gcacagagta ccacttgaac aacattctga aacggcagga	300
ggcggttccg ccgtggatag agaaacaggg cagtgtggag gctcagatcc gccagtttcg	360
ggccagctc gactccgatt ggacactgca ggccgtgcac atcgtttgctg agaaacactc	420
gaagaaaagc gacacggaca agatccagat catgagccag tacgccgagg cagagcgcaa	480
caataactcg agttatacga agctgcgcag cagccaatgg gaacagaaat acagcaacta	540
tctggaggtc aaattaaaag cgctgaatga cagcatccga gggtataatc tgcaggctcc	600
tttggcatcg cagaaactgt atctaaacgc aaactccgag ctggaaaaat gttaccggcg	660
atgcgcggac aatttagagg cggcgatcaa gaaacacctg ctgggcgagc agtctggagc	720
acagtcttcg atgggcccga gatcccaccg cgttcctggg taccgggacg tgaggcagcg	780
cgacatccat caaatatacc aggcgccaac cgagtctctc ggaaaacagc ttctggatat	840
cttcgctgg cggcgcaacg acgaataata gtccctggag gtgacggaat atatatgtgt	900
ggagggtaaa tctgacaggg ttagacaaag gtaatatctt cctaaaacat gcaatcggct	960
gccccgcaac gggaaaaaga atgactttgg cactcttcac cagagtgggg tgtcccgctc	1020
gtgtgtgcaa ataggctccc actggtcacc ccgattttg cagaaaaaca gcaagttccg	1080
gggtgtctca ctggtgtccg ccaataagag gagccggcag gcacggagtc tacatcaagc	1140
tgtctccgat aactcgcact accatccggg tctctcagag aggggaatgg cactataaat	1200
accgcctcct gcgctctctg cttcatcggg	1230

<210> 25

<211> 1508

<212> DNA

<213> Hansenula polymorfa

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1508)

<223> n = a o g o c o t/u, desconocida u otra

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia: Promotor MOX

<400> 25

agcttgcgga gaacgatctc ctcgagctgc tcgcggatca gcttgtggcc cggtaatgga	60
accaggccga cgcgacgctc cttgcggaacc acggtggctg gcgagcccag tttgtgaacg	120
aggtcgttta gaacgtcctg cgcaaagtcc agtgtcagat gaatgtcctc ctcggaccaa	180
ttcagcatgt tctcgagcag ccatctgtct ttggagtaga agcgtaatct ctgctcctcg	240
ttactgtacc ggaagaggta gtttgcctcg ccgcccataa tgaacagggt ctctttctgg	300
tggcctgtga gcagcgggga cgtctggacg gcgtcgatga ggcccttgag gcgctcgtag	360
tacttgttcc gtcgctgtag ccggccgcgg tgacgatacc cacatagagg tccttggcca	420
ttagtttgat gaggtggggc aggatgggag actcggcatc gaaatttttg ccgtcgctcg	480
acagtgtgat gtcaccatcg aatgtaatga gctgcagctt gcgatctcgg atgggttttg	540

ES 2 377 116 T3

```

aatggaagaa ccgcgacatc tccaacagct gggccgtggt gagaatgagc cggacgtcgt      600
tgaacgaggg ggccacaagc cggcgtttgc tgatggcgcg gcgctcgccc togatgtaga      660
aggccttttc cagaggcagt ctcgtaaga agctgccaac gctcggaacc agctgcacga      720
gccgagacaa ttcgggggtg ccggctttgg tcatttcaat gttgtcgtcg atgaggagtt      780
cgaggtcgtg gaagatttcc gcgtagcggc gttttgcctc agagtttacc atgaggtcgt      840
ccactgcaga gatgccgttg ctcttcaccg cgtacaggac gaacggcggtg gccagcaggg      900
ccttgatcca ttctatgagg ccctctcgac ggtgttcctt gaggcggtac tccactctgt      960
agcgactgga catctcgaga ctgggcttgc tgtgctggat gcaccaatta attggtgccg     1020
catgcctcct tgcaccgcaa gtttttaaaa cccactcgct ttagccgtcg cgtaaaactt     1080
gtgaatntgg caactgaggg ggttctgcag ccgcaaccga acttttcgct tcgaggacgc     1140
agctggatgg tgtcatgtga ggctctgttt gctggggtag cctacaacgt gaccttgccct     1200
aacgggacgg cgctaccac tgctgtctgt gcctgctacc agaaaatcac cagagcagca     1260
gagggccgat gtggcaactg gtggggtgtc ggacaggctg tttctccaca gtgcaaactgc     1320
gggtgaaccg gccagaaagt aaattcttat gctaccgtgc agcgactccg acatccccag     1380
tttttgccct acttgatcac agatggggtc agcgctgccg ctaagtgtac ccaaccgtcc     1440
ccacacggtc catctataaa tactgctgcc agtgcacggg ggtgacatca atctaaagta     1500
caaaaacg                                     1508

```

<210> 26

<211> 566

<212> DNA

5 <213> Hansenula polymorfa

<220>

<223> Descripción de la secuencia: Promotor TPS1

ES 2 377 116 T3

<400> 26

gatgtcaaaa tgggggatca caaaagtaca ctcacgagga aaatcaaaac cttctcgtac	60
ctttaacaca tacggaaatg atcgatcgat ttgagaagat tcctcaatga ttttcgtcat	120
atataggtat ctgaggtatt tatggaccga ttcgtaataa catcatatac atcgcgcttt	180
gtccctgtcc cagagatttc gatgaaaaaa gcgaatttta ttctaataat tgaagcatgc	240
caaacatggg gcagttgatt tgtgtgaggg taaaatatca tgaattgcac ccatcaaattg	300
cagcaagata ttgaccaatc ctataataga aaacagactt accacaaata gattgtgatg	360
acgatattat gaatctccag atgaaaggct cgaaagctat gaagcctctt gaaacttttc	420
atggtgagat aatatttttcg aaattttcac gaacttctaa aacgcaatta ttgaatataa	480
aggaaaaata atattttccat atagcaagca aatcaagctg cactcctcat ccttaaaaact	540
aataaatctt acccatttga taccag	566

REIVINDICACIONES

1. ADN, que comprende al menos una secuencia de promotor que se deriva de un promotor de tipo silvestre de Hansenula polymorfa, el cual se selecciona del grupo compuesto por el promotor MOX, FMD y TPS1, caracterizado porque la eficiencia de transcripción de esta secuencia de promotor se modula modificando un sitio de enlace de ADN en comparación con la eficiencia del promotor de tipo silvestre, en cuyo caso la modificación se efectúa mediante palindromización de al menos una de las secuencias de ADN según las SEQ ID No: 1-4, 11, 13, 16 y 20, en cuyo caso la secuencia palindromizada se desvía en no más de 2 bases por cadena de una secuencia completamente palindromizada.
2. ADN según la reivindicación 1, caracterizado porque la eficiencia de transcripción de la secuencia promotora se eleva en comparación con la eficiencia del promotor de tipo silvestre.
3. ADN según la reivindicación 1, caracterizado porque la eficiencia de transcripción de la secuencia promotora en comparación con la eficiencia del promotor de tipo silvestre se eleva en al menos el factor 1,5, preferentemente en al menos el factor 2, particularmente preferible en al menos el factor 2,5.
4. ADN según la reivindicación 1, caracterizado porque la eficiencia de transcripción de la secuencia promotora se reduce en comparación con la eficiencia del promotor de tipo silvestre, se reduce preferentemente en al menos el factor 0,5.
5. ADN según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la secuencia de promotor se deriva de un promotor de tipo silvestre mediante inserción, delección y/o el intercambio de al menos una base, preferentemente mediante el intercambio de una o dos bases.
6. ADN según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la secuencia palindromizada es simétrica o asimétrica, preferentemente simétrica y se desvía en solo una base y particularmente preferible no se desvía absolutamente de una secuencia completamente palindrómica.
7. ADN según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende además al menos una secuencia de ADN que se encuentra bajo el control de transcripción de la secuencia del promotor para un gen homólogo y/o heterólogo.
8. ADN según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende además una secuencia de ADN que codifica para una señal de secreción.
9. ADN según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la señal de secreción se selecciona del grupo de GAM, GAM-kex2, CHH- kex2, MF α -prepro y la señal de secreción de lisozima de pollo.
10. Célula huésped, caracterizada porque la célula huésped contiene al menos un ADN según una de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Célula huésped según la reivindicación 10, caracterizada porque el ADN se integra al genoma de la célula huésped o se presenta como molécula de ADN extracromosómica, preferentemente episómica, en la célula huésped.
12. Célula huésped según una de las reivindicaciones 10 o 11, caracterizada porque la célula huésped es una célula de levadura, preferentemente una célula de levadura metilotrófica, particularmente preferible una célula de levadura de los géneros Candida, Torulopsis, Hansenula o Pichia, particularmente preferible Hansenula polymorfa.
13. Vector de expresión, preferentemente un plásmido, caracterizado porque el vector comprende un ADN según una de las reivindicaciones 1 a 9.
14. Vector de expresión según la reivindicación 13, caracterizado porque el vector contiene el gen de fitasa o lacZ como marco de lectura reportero.
15. Kit que comprende:
 - (a) un vector de expresión según la reivindicación 13 o 14, el cual es adecuado para clonar un ADN, el cual codifica una proteína recombinante, y
 - (b) una célula huésped para producir la proteína recombinante.

16. Uso de un ADN según una de las reivindicaciones 1 a 9 o de una célula huésped según una de las reivindicaciones 10 a 12 o de un vector de expresión según la reivindicación 13 o 14 o de un kit según la reivindicación 15 para la expresión de un gen.

5 17. Uso de un ADN según una de las reivindicaciones 1 a 9 o de una célula huésped según una de las reivindicaciones 10 a 12 o de un vector de expresión según la reivindicación 13 o 14 o de un kit según la reivindicación 15 para producir una o varias proteínas.

18. Método para producir una o varias proteínas que comprende:

10 (i) introducir un vector de expresión según la reivindicación 13, que contiene un ADN según la reivindicación 7, a una célula huésped que es adecuada para producir la proteína recombinante, opcionalmente después de la inducción de la secuencia promotora;

(ii) cultivar la célula huésped obtenida en (i);

(iii) y opcionalmente inducir la secuencia promotora de una manera conocida para los cual se prepara(n) la(s) proteína(s) por parte de la célula huésped.

19. Método para producir una o varias proteínas que comprende:

15 (i) construir el vector de expresión que contiene un ADN según la reivindicación 7;

(ii) introducir un vector de expresión a una célula huésped que es adecuada para producir una proteína recombinante, opcionalmente después de la inducción de la secuencia promotora;

(iii) cultivar la célula huésped obtenida en (ii);

20 (iv) y opcionalmente inducir la secuencia promotora de una manera conocida per se, por lo cual se produce(n) la(s) proteína(s) por parte de la célula huésped.

20. Método para la preparación de vectores de expresión según una de las reivindicaciones 13 o 14, que comprende:

(i) insertar un ADN según una de las reivindicaciones 1 a 9 a un vector de expresión; o

25 (ii) modificar una secuencia de promotor de Hansenula polymorfa, en cuyo caso el promotor se selecciona del grupo compuesto del promotor MOX, FMD y TPS1, a un vector de expresión mediante inserción, delección y/o intercambio de al menos un par de bases de una manera conocida per se, en cuyo caso la eficiencia de transcripción de esta secuencia de promotor se modula en comparación con la eficiencia del promotor de tipo silvestres modificando un sitio de enlace de ADN, en cuyo caso la modificación se efectúa por palindromización de al menos una de las secuencias de ADN según SEQ ID No: 1-4, 11, 13, 16 y 20 y en cuyo caso la secuencia palindromizada no se desvía en más de 2 bases por cadena de una secuencia completamente palindromizada; y

30 (iii) introducir opcionalmente un gen heterólogo de una manera conocida per se a un vector de expresión, de modo que el gen heterólogo se encuentre bajo control de transcripción del ADN de (a) o (b).

Figura 1A

Valores de medición de LacZ

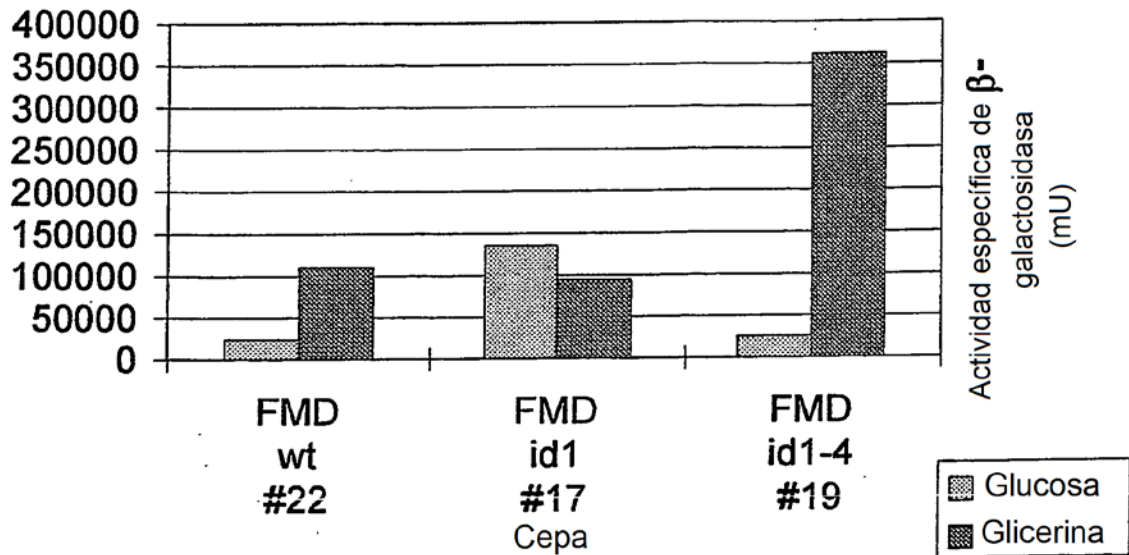


Figura 1B

Valores de medición de fitasa

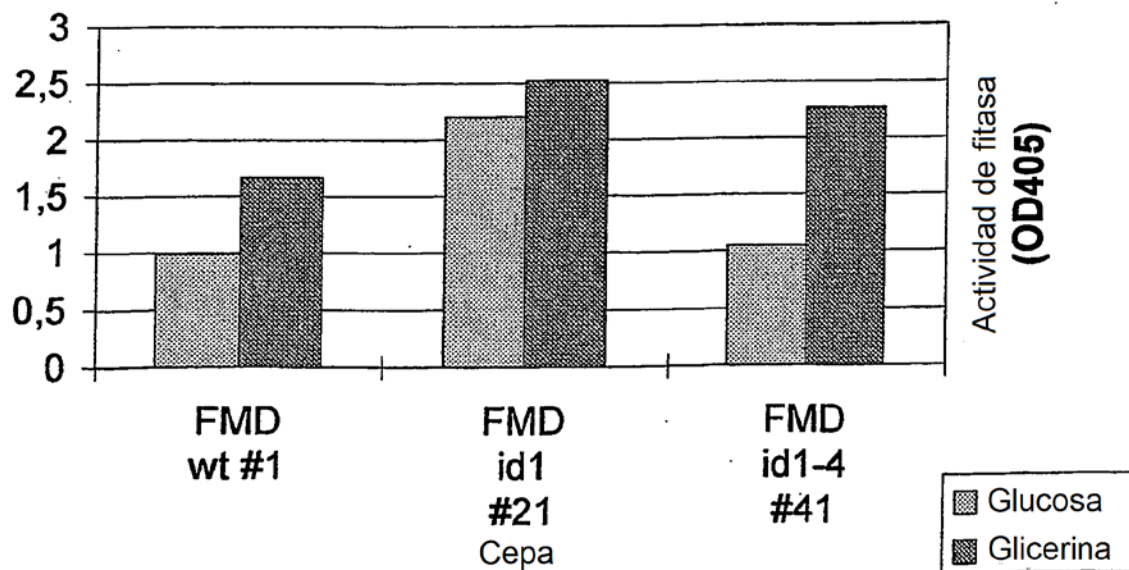


Figura 2

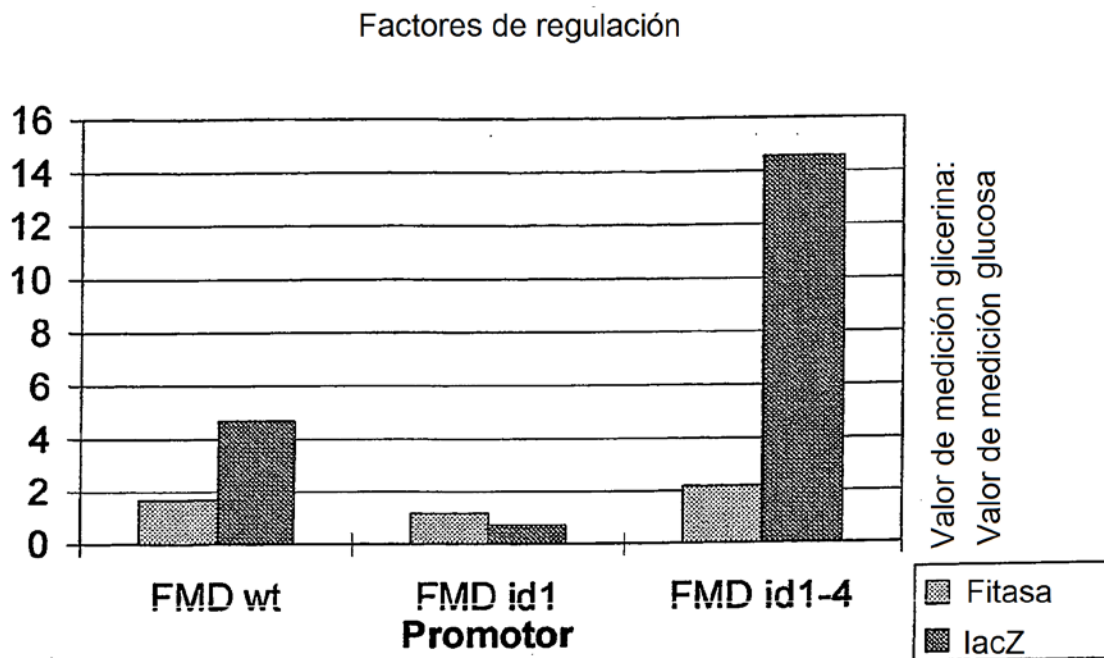


Figura 3

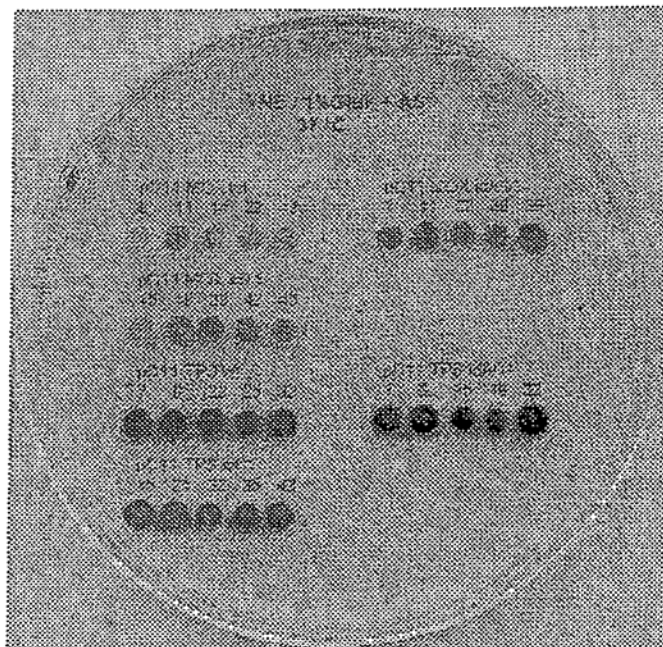


Figura 4a

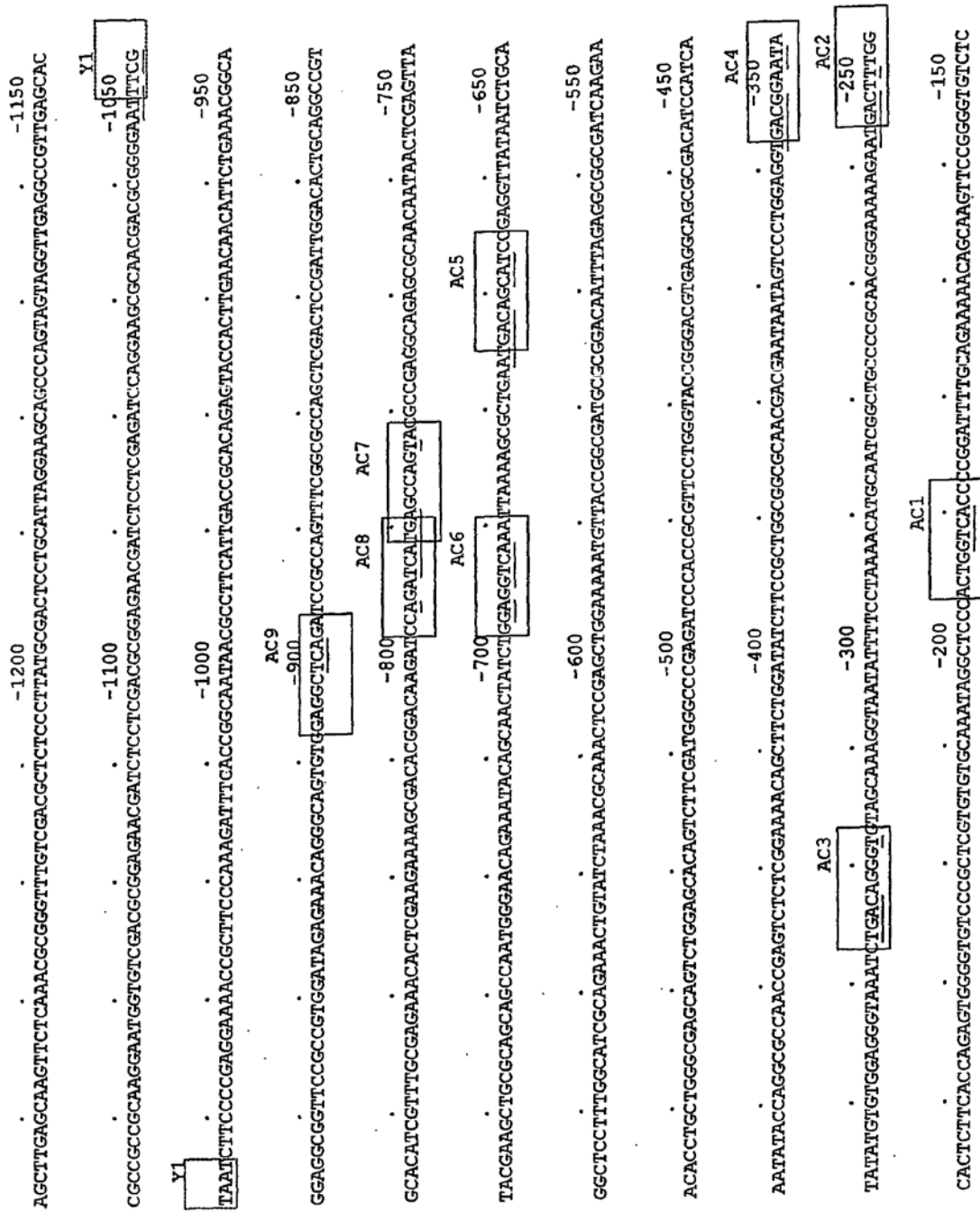
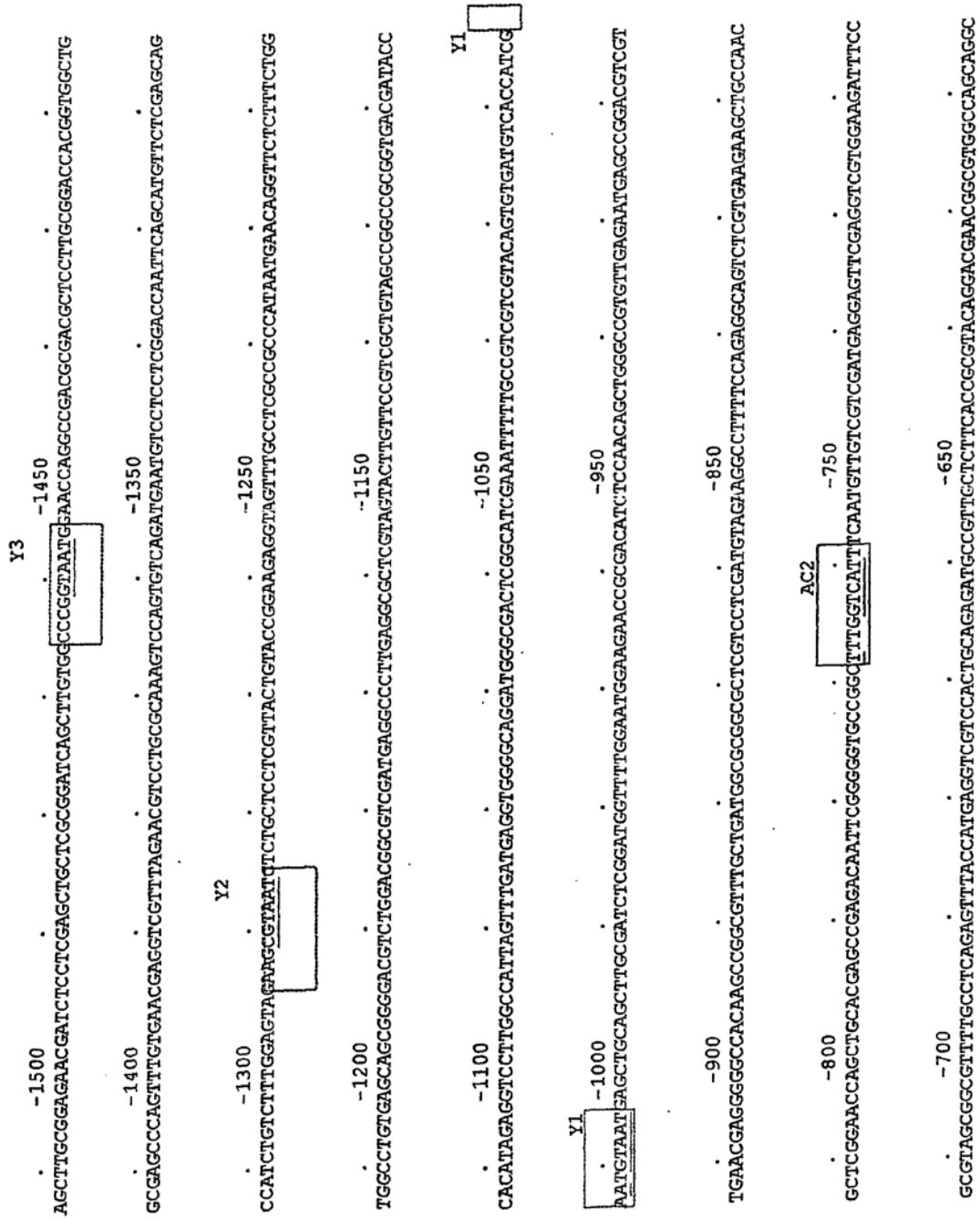


Figura 5a



-600
 CCTTGATCCATTCTATGAGGCCATCTCGACGGTGTTCCTTGAGTGCGTACTCCACTCTGTAGCGACTGGACATCTCGAGACTGGGCTTGCTGTGCTGGAT
 -550
 GCACCAATTAATTGTTGCCGATGCATCCTTGCACCGCAAGTTTTTAAACCCCACTCGCTTTAGCCGTGCGGTAAAACTTGTGAATNTGGCAACTGAGGG
 -500
 GGTTCGCAGCCGAACCGAACTTTTCGCTTCGAGGACGCAGCTGGATGGTGCATGTGAGGCTCTGTCTGCTGGGGTAGCCTACAACGTGACCTTGCCCT
 -400
 AACCGGACGGCGCTACCCACTGCTGTCTGTGCCTGCTACCAGAAAATCACCAGAGCAGCAGAGGGCCGATGTGGCAACTGGTGGGGTGTCTGGACAGGCTG
 -300
 TTTCTCCACAGTGCAAATGCGGGTGAACCGGCCAGAAAGTAAATCTTATGCTACCGTGACGGACTCCGACATCCCCAGTTTTTGCCCTACTTGATCAG
 -200
 AGATGGGTCAGCGCTGCCGCTAAGTGTAACCAACCGTCCCACACGGTCCATCTATATAAATACTGCTGCCAGTGCACGGTGGTGACATCAATCTAAAGTA
 -100
 CAAAAACG

GATGTCAAAATGGGGGATCACAAAAGTACACTCAGAGGAATAAACAACCTTTCTCGTAGCTTAAACACATACGGAAATGATCGATCGATTGAGAAGAT
-500

Y1

AC5 -450 TCCTCAATGATTTTCGTGCATATATAGGTATCTGAGGTATTTATGGACC~~GATTCGTAATAACA~~TATACATCGCGCTTTGTCCCTGTCCCAGAGATTTTC
-400

C2 -350 GATGAAAAAAGCGGAATTTTATTCTAATATTGAAGCATGCCAAACATGGGGCAGTTGATTTGIGTGAGGGTAAATAATCATGAATTCACCCCATCAAATG
-300

C1 -250 CAGCAAGATATTGACCAATCTATAATAGAAAACAGACTTACCACAAATAGATTGTGATGACCGATATTGAATCTCCAGATGAAAGGCTCGAAAGCTAT
-200 AC1 AC4 AC3 AC2

-150 GAAGCCTCTTGAAACTTTTCATGGTGAGATATATTTTCGAAATTTCCACGAACCTCTAAACCGCAATTATTGAATATAAAGGAAAAATAATATTTCAT
-100

-50 ATAGCAAGCAAATCAAGCTGCACCTCCTCATCTTAAAACTAATAAATCTTACCCATTTGATACCAG -6

Figura 7A

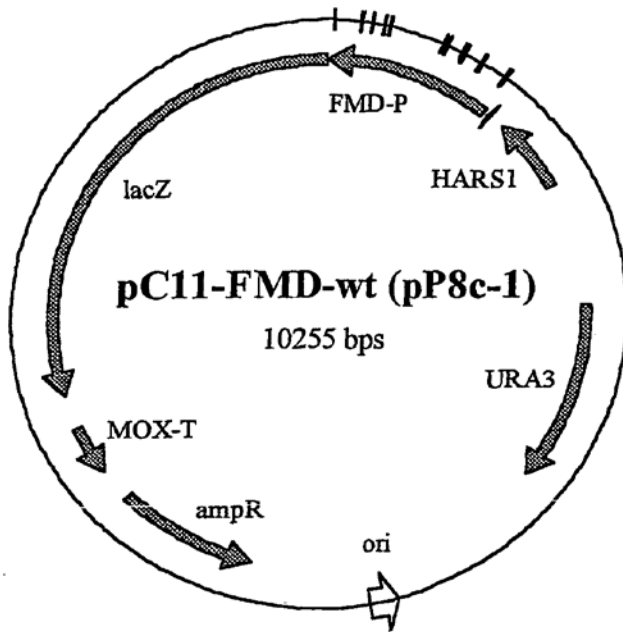


Figura 7B

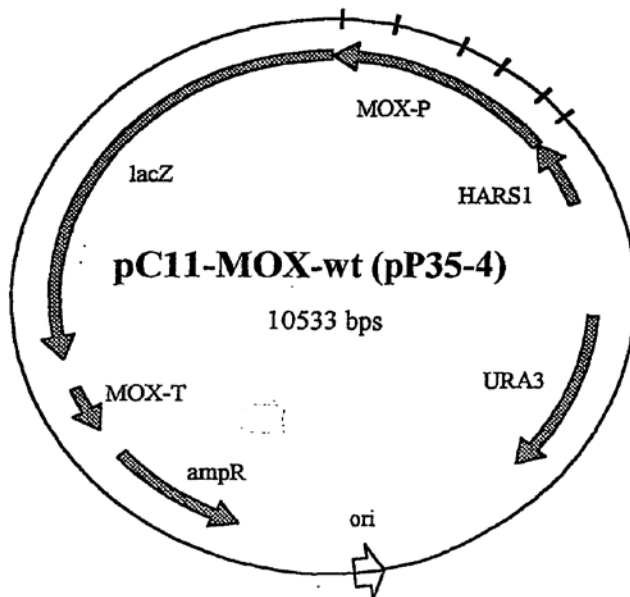


Figura 7C

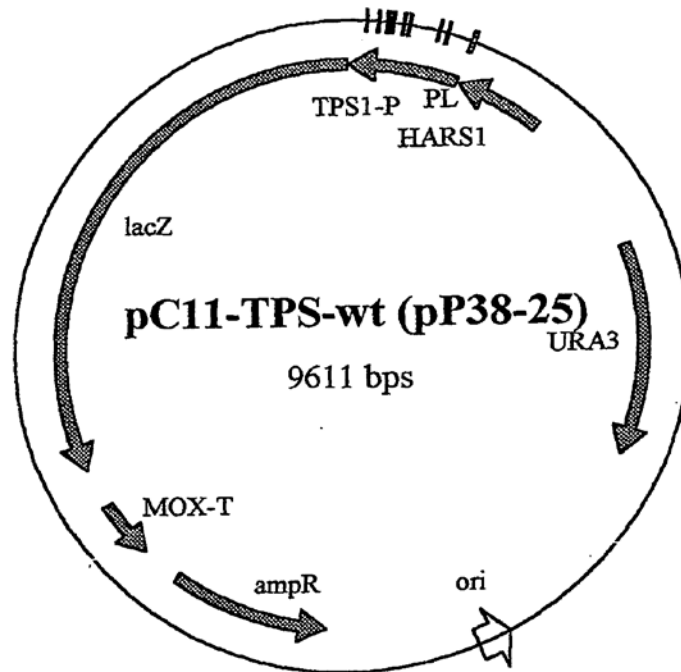


Figura 8

Centro de simetría



Secuencia AP1	5' ATGA C TCAT 3'	Hefe <i>S. cerevisiae</i>
Secuencia ATF/CREB	5' ATGAC * G TCAT 3'	Hefe <i>S. cerevisiae</i> /Säuger
Secuencia YAP	5' ATTAC * G TAAT 3'	Hefe <i>S. cerevisiae</i>
Secuencia C/EPB	5' ATTGC * G CAAT 3'	Mamífero
G-Box	5' GCCA C * G TGGC 3'	Vegetales