

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 108**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/16** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

**C12N 15/69** (2006.01)

**C12N 15/55** (2006.01)

**C12N 1/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06021699 .1**

96 Fecha de presentación: **21.07.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1792982**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54 Título: **Fosfatasa alcalina codón-optimizada y su expresión en levadura**

30 Prioridad:  
**25.07.2000 DE 10036491**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.06.2012**

73 Titular/es:  
**F. Hoffmann-La Roche AG  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**Mueller, Rainer;  
Thalhofer, Johann-Peter;  
Geipel, Frank;  
Hoelke, Werner;  
Glaser, Stephan;  
Eckstein, Hellmut;  
Kirschbaum, Thomas y  
Bommarius, Bettina**

74 Agente/Representante:  
**Isern Jara, Jorge**

ES 2 384 108 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Fosfatasa alcalina codón-optimizada y su expresión en levadura

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción recombinada o expresión de la fosfatasa alcalina eucariota. Además, la invención se refiere a un ADN codón-optimizado que codifica para una fosfatasa alcalina eucariota altamente activa con una actividad específica de más de 3000 U/mg. La invención se refiere asimismo a un procedimiento para la inserción de ADN en un vector para su expresión en células de levadura.

10 Las fosfatasas alcalinas (AP) son fosfomonoesterasas diméricas, no específicas que contienen zinc y que se encuentran tanto en organismos procariotas como en organismos eucariotas, por ejemplo en *E. Coli* y en mamíferos (McComb y otros, 1979 Alkaline Phosphatases, Plenum Press, Nueva York). La comparación de la estructura primaria de varias fosfatasas alcalinas evidenció un alto grado de homología (25-30% de homología entre *E. Coli* y AP de mamíferos; Millán, 1988 Anticancer Res. 8, 995-1004; Harris, 1989 Clin. Chim. Acta 186, 133-150).

15 En el ser humano y en animales superiores, la familia de AP consiste en cuatro miembros que están codificados en diferentes sitios del gen (Millan, 1988 Anticancer Res. 8, 995-1004; Harris 1989 Clin. Chim. Acta 186, 133-150). Pertenecen a la familia de las fosfatasas alcalinas las APs específicas para cada tejido (AP de placenta (PLAP), AP de células germinales (GCAP) y AP de intestino (IAP)) y APs no específicas para los tejidos (TnAP), que están localizadas sobre todo en el hígado, el riñón y los huesos.

20 Una característica decisiva de las AP conocidas hasta el momento es la gran variabilidad en la actividad catalítica de las AP de mamíferos que poseen un valor  $k_{cat}$ s 10-100 veces superior al AP de *E. Coli*. Entre las AP de mamíferos las AP del intestino bovino (bIAP) muestran las actividades específicas más elevadas. Esta característica hace que las bIAP sean atractivas para aplicaciones bioquímicas tales como, por ejemplo, la utilización de los correspondientes conjugados enzimáticos como reactivo diagnóstico o para la desfosforilación de ADN. La existencia de diferentes fosfatasas alcalinas del intestino bovino con actividades específicas de diferentes intensidades se describe en el documento EP 0 955 369 o en Manes y otros (1998), J. Biol. Chem. 273 No. 36, 23353-23360. Hasta el momento se ha descrito una expresión recombinante de fosfatasas alcalinas, eucariotas, de baja actividad (hasta 3000 U/mg) en diferentes líneas de células eucariotas tales como, por ejemplo, células CHO (bIAP I/WO 93/18139; Weissig y otros, 1993, Biochem J. 260, 503-508), células COS (AP de placenta humana/Berger y otros, 1987 Biochemistry 84, 4885-4889) o el sistema de expresión de Baculovirus (AP de placenta humana/Davis y otros, 1992, Biotechnology 10, 1148-1150) también se ha descrito la expresión de APs de mayor actividad (actividad específica > 3000 U/mg) del intestino bovino en células CHO (bIAP II, III y IV/Manes y otros, 35 1998, J. Biol. Chem. 273 No. 36, 23353-23360). El inconveniente de la expresión de fosfatasas alcalinas en estos sistemas de expresión es, sin embargo, el bajo rendimiento de expresión que hace que la fabricación recombinante, en especial de una AP altamente activa, no sea económica.

40 Una expresión de fosfatasas alcalinas eucariotas en huéspedes de expresión procariotas tales como, por ejemplo, *E. Coli* es ciertamente posible en principio (AP de placenta humana/Beck and Burtscher, 1994 Protein Expression and Purification 5, 192-197), sin embargo las fosfatasas alcalinas expresadas en procariotas no presentan glicosilación, la cual resulta ser esencial, en especial, para la fabricación de conjugados enzimáticos.

45 Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo desarrollar un procedimiento de expresión estable y resistente para la fabricación de fosfatasa alcalina eucariota glicosilada con una elevada actividad específica, el cual facilite además, debido a un alto rendimiento de expresión, una fabricación económica de la correspondiente fosfatasa alcalina y, además, proporcione una enzima que es comparable en lo referente a sus propiedades tales como, por ejemplo, la actividad específica y la estabilidad térmica con la fosfatasa alcalina nativa de alta o de baja actividad (disponible en el comercio, por ejemplo en Roche Diagnostics GmbH, Biozyme, Oriental Yeast).

50 Un primer objeto de la presente invención es una cepa huésped transformada que se obtiene al llevar a cabo las etapas (a), la clonación de una secuencia genética codón-optimizada que codifica para una fosfatasa alcalina eucariota en un primer vector de expresión con un gen de resistencia a un primer antibiótico, y en un segundo vector de expresión con un gen de resistencia a un segundo antibiótico; seguido de (b), la transformación de un huésped de levadura con el primer vector de expresión y la selección de transformantes que tienen integrados en el genoma por lo menos una copia del primer vector de expresión con la secuencia genética y el gen de resistencia al primer antibiótico, por medio de su crecimiento sobre un medio de cultivo con una baja concentración del primer antibiótico; seguido de (c), el aumento del número de copias de genes del primer vector de expresión mediante transformación múltiple con el primer vector de expresión, en el que la selección se realiza por medio del crecimiento sobre un medio de cultivo con una concentración más elevada del primer antibiótico comparada con la etapa (b); seguido de (d), la transformación de clones transformados del huésped con el máximo rendimiento de expresión en fosfatasa alcalina con el segundo vector de expresión y la selección de transformantes que, además de las copias del primer vector de expresión han incluido las copias del segundo vector de expresión con la secuencia genética y el gen resistente al segundo antibiótico, por medio del crecimiento en un medio de cultivo con el segundo antibiótico; seguido de (e), el aumento del número de copias de genes del segundo vector de expresión por medio de la transformación múltiple con el segundo vector de expresión, en el que la selección se realiza por medio del

crecimiento sobre un medio de cultivo con una concentración más elevada del segundo antibiótico comparada con la etapa (d); seguido de (f), la selección de los clones que tienen integrados de forma estable en el genoma varias copias de la secuencia genética y de los genes de resistencia a los marcadores de selección; y (g), la examinación de los clones obtenidos por la etapa (f) en cuanto a expresión elevada por medio de una prueba de actividad de la fosfatasa alcalina; siendo el rendimiento de expresión de los clones obtenidos en la etapa (t) aumentado por el factor 4 con respecto a la expresión de los clones obtenidos en la etapa (b).

También es objeto de la invención un cultivo líquido en un recipiente de cultivo que contiene un medio de cultivo, metanol y una cepa huésped transformada, según la invención.

También es objeto de la invención una biomasa que contiene una cepa huésped transformada, según la invención.

Asimismo, la presente memoria da a conocer un procedimiento para la obtención de una fosfatasa alcalina eucariota con una elevada actividad específica en levadura, en especial en una levadura metilotrófica, que comprende las siguientes etapas:

- a) clonación de una secuencia genética en diferentes vectores,
- b) transformación de la levadura,
- c) expresión, y
- d) purificación de la fosfatasa alcalina, caracterizado porque

- (i) un primer vector presenta un gen de resistencia a un primer marcador de selección,
- (ii) los transformantes que tienen integrados en el genoma el gen de resistencia y la secuencia genética son seleccionados por su crecimiento sobre un medio de cultivo con una baja concentración del primer marcador de selección,
- (iii) el número de copias de genes es aumentado por transformación múltiple, siendo los transformantes múltiples seleccionados por su crecimiento sobre un medio de cultivo con una elevada presión de selección,
- (iv) se añade un segundo vector que presenta, además de la secuencia genética, un gen de resistencia a un segundo marcador de selección,
- (v) el número de copias de genes es aumentado por transformación múltiple con el segundo vector, siendo los transformantes múltiples seleccionados por su crecimiento sobre un medio de cultivo con una elevada presión de selección, y
- (vi) se seleccionan aquellos clones que tienen integrados en el genoma de forma estable varias copias de la secuencia genética y de los genes de resistencia a marcadores de selección.

Como secuencia genética resulta preferente una secuencia de ADN que codifica para una fosfatasa alcalina eucariota que presenta una actividad específica de más de 3000 U/mg, en casos especiales de más de 7000 U/mg hasta aproximadamente 10.000 U/mg. Según la invención, ha resultado ser apropiada, por ejemplo, una secuencia de ADN según SEQ ID NO: 1. Resulta muy preferente una secuencia de ADN codón-optimizada que corresponde al nivel de aminoácidos a la secuencia genética SEQ ID NO: 1. Optimización de codón significa que se optimiza cada codón por mutación silenciosa, es decir por modificaciones a nivel de ADN que, sin embargo, no tiene efectos a nivel de aminoácidos, por ejemplo de SEQ ID NO: 1 para aumentar la traslación en función de las necesidades del huésped de expresión seleccionado, debido a lo cual se conserva, por ejemplo, la secuencia genética según SEQ ID NO: 5. Sin embargo, también se pueden incorporar en el vector otras secuencias genéticas que la SEQ ID NO: 1 que codifican para fosfatasas alcalinas y, en su caso, están codón-optimizadas tal como, por ejemplo, bIAP1, III, IV (DE 198 19 962 o EP 0 955 369). Resulta muy preferente para el procedimiento, según la invención, la utilización de una secuencia genética codón-optimizada según SEQ ID NO: 5. La correspondiente secuencia genética es clonada entonces en un vector o en varios vectores que se eligen(n) en función del huésped a transformar.

Como huésped de levadura resultan apropiadas, en especial, las levaduras metilotróficas como, por ejemplo, levadura *Pichia Pastoris*, *Hansenula polymorpha* o también otras levaduras tales como, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* o *Schizosaccharomyces pombe*. El experto en la materia conoce los vectores adecuados tal como, por ejemplo, pICAαA, pPIC9K, vectores Yes, pTEF1/Zeo, pYDI (por ejemplo, Invitrogen). El vector de expresión generado de esta manera es transformado preferentemente en diferentes cepas de *Pichia pastoris* e integrado de forma estable en el genoma. La integración estable en el genoma de levadura tiene la ventaja de que para la posterior producción, por ejemplo, de la fosfatasa alcalina eucariota altamente activa en fermentos de gran volumen no se precisa ninguna presión de selección. Integración estable en el genoma significa que el vector de expresión es integrado en el genoma de, por ejemplo, *Pichia pastoris* a través de una recombinación homóloga y, por lo tanto, se transmite de generación en generación como parte integral del genoma de levadura (Cregg, J.M. y otros, *Mol. Cell. Biol.* 5 (1985), 3376-3385).

El aumento del número de copias de genes en la levadura metilotrófica se ha conseguido mediante transformación múltiple aumentando simultáneamente la presión de selección con un marcador de selección adecuado, por ejemplo un antibiótico tal como, por ejemplo, Zeocin® o Geneticin (G418) o un marcador de Auxotrofia, seguido a lo cual sólo

sobrevivirán aquellos clones que tienen integradas en el genoma de forma estable varias copias del vector de expresión. Para ser resistente a concentraciones superiores del antibiótico utilizado como marcador de selección, es necesario que los clones produzcan más proteína de resistencia. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante una integración múltiple del vector de expresión que contiene, además del casete de expresión para la fosfatasa alcalina altamente activa, por ejemplo, también el gen de resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección.

La tarea de fabricar de forma económica fosfatasa alcalina eucariota mediante un procedimiento de expresión estable y resistente con un alto rendimiento de expresión solamente pudo conseguirse mediante la combinación de las medidas (i) hasta (vi) del procedimiento que se da a conocer por la presente memoria. Por ejemplo, la transformación de una cepa *Pichia pastoris* X-33 con un vector de expresión que contiene el gen *blAPII*, según SEQ ID NO: 1, no tendrá el éxito deseado sin estas medidas (véase el ejemplo 1 y 2). Con este procedimiento se pudo ciertamente aumentar de forma considerable el rendimiento de expresión en comparación con la expresión de *blAPII* en células CHO (Manes y otros, 1998 J. Biol. Chem., 273 No. 36, 23353-23360), pero el procedimiento no permite la fabricación de una fosfatasa alcalina recombinante desde una perspectiva económica.

Una de las medidas necesarias para poner a disposición el procedimiento, según la invención, es la síntesis de una secuencia genética codón-optimizada. A efectos de optimizar cada codón para la expresión en levadura se necesitaba una completa síntesis "de novo" del gen de aproximadamente 1,5 kBp de longitud que codifica para la fosfatasa alcalina eucariota altamente activa. Mediante reconversión de la secuencia de aminoácidos de la fosfatasa alcalina eucariota altamente activa, según SEQ ID Nr. 4 (*blAP-II*) se pudo optimizar cada codón, siempre que fuera necesario, aprovechando el código regenerado. A tal efecto se ha dividido el gen en 28 oligonucleótidos con una longitud de 54 hasta 82 nucleótidos. Los oligonucleótidos han sido diseñados como una serie alterna de fragmentos de hebra sentido y de hebra antisentido que se solapaban con sus extremos 5' ó 3' de forma complementaria con los oligonucleótidos adyacentes. La zona de solapamiento se ha elegido de tal manera que durante la reacción de anillado (annealing) en la posterior reacción PCR se impide en gran medida un enlace no específico. Los oligonucleótidos en el extremo 5' ó 3' del gen han sido dotados corriente arriba o corriente abajo de la zona codificante de sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción que pueden ser utilizadas para una posterior inserción del gen sintético según SEQ ID Nr. 5 en vectores de expresión. Corriente arriba se incorporó un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *EcoRI* y corriente abajo un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Asp718*. Las secuencias de los oligonucleótidos están representadas en SEQ ID Nr. 6 hasta 33.

La síntesis del gen se ha llevado a cabo mediante una reacción PCR. A tal efecto se ha dividido la zona codificante primero en tres partes (oligonucleótidos 6 hasta 15, 16 hasta 23, 24 hasta 33) y estas partes se han generado en reacciones PCR separadas. En la síntesis de un gen con oligonucleótidos complementarios solapantes mediante una reacción PCR se alarga el fragmento de gen gradualmente hasta conseguir el producto de longitud completa que es amplificado a continuación en otros ciclos. La temperatura de anillado se ajusta en este caso a la zona de solapamiento con la temperatura de fusión más baja.

A continuación, las tres partes han sido analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa, se aislaron del gel los productos con la longitud esperada mediante el kit de extracción de gel de QIAquick (Qiagen) y en otra reacción PCR se sintetizó el producto génico completo. La reacción PCR se llevó a cabo en los primeros 5 ciclos sin adición de los iniciadores en el extremo 5' y en el extremo 3' del gen completo, de manera que primero se forman pocos fragmentos del producto génico con la longitud esperada a partir de las tres partes. La temperatura de anillado se ajusta en este caso a la zona de solapamiento con la temperatura de fusión más baja. A continuación se añadieron los iniciadores terminales y se aumentó la temperatura de anillado correspondientemente a la temperatura de anillado del iniciador con la temperatura de fusión más baja. En otros 25 ciclos se amplificó al alza el fragmento de gen con la longitud esperada.

La solución de PCR fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa y se aisló el fragmento de gen con el tamaño esperado (kit de extracción de gel de QIAquick/Qiagen).

La clonación del correspondiente fragmento de PCR, la transformación en *Pichia pastoris*, así como la expresión se describen en el ejemplo 3.

Con el gen codón-optimizado para la fosfatasa alcalina altamente activa se pudo incrementar el rendimiento de expresión por el factor 3 con respecto a los primeros ensayos con el gen natural.

Sin embargo, con estos clones todavía no se había conseguido un procedimiento económico para la fabricación de fosfatasa alcalina altamente activa.

Una medida para elevar el rendimiento de expresión de proteínas heterólogas y homólogas en *Pichia pastoris* consiste en el aumento del número de copias de genes en la célula mediante transformación múltiple. Esta medida puede servir para el aumento del producto de transcripción, del mRNA del gen de destino. Se consigue un aumento del número de copias de genes mediante transformación múltiple de un clon con el vector de expresión, aumentando

simultáneamente la presión de selección durante el subsiguiente crecimiento de los transformantes sobre placas de cultivo con una concentración elevada del antibiótico utilizado como marcador de selección. En este caso, se vuelve a hacer competente un clon de expresión que ya ha incorporado, como mínimo, una copia del vector de expresión del primer proceso de transformación (véase el ejemplo 1) y se transforma otra vez con el vector de expresión. Se seleccionan los transformantes que tienen integrados en el genoma varias copias del vector de expresión mediante la colocación en placas con una presión de selección más alta, es decir en placas con una mayor concentración del antibiótico utilizado como marcador de selección (por ejemplo, Zeocin®) que en el primer proceso de transformación. Primero se detecta la concentración más alta del antibiótico utilizado como marcador de selección con la que los clones del primer proceso de transformación todavía pueden crecer y se aumenta consecuentemente la concentración del antibiótico utilizado como marcador de selección en las placas de agar YPDS por encima del valor umbral detectado, una vez realizada la transformación adicional. Debido al aumento del número de copias del vector de expresión, también aumenta el número de copias del gen de resistencia que forma parte del vector de expresión y, por lo tanto, también se consigue la resistencia a concentraciones más altas del antibiótico utilizado como marcador de selección. Mediante la variación de la concentración del antibiótico utilizado como marcador de selección en las placas de cultivo (aproximadamente 100 hasta 2000 µg/ml) se pueden seleccionar también clones con diferentes números de copias del vector de expresión en el genoma (véase el ejemplo 4).

Otra medida para incrementar el rendimiento de expresión de proteínas heterólogas y homólogas en levadura tal como, por ejemplo, *Pichia pastoris* consisten en el aumento del número de copias de genes mediante selección múltiple. Esto se consigue mediante la transformación de un clon de expresión que ya ha sido optimizado mediante una transformación múltiple con un vector de expresión que contiene el casete de expresión con el gen de destino (por ejemplo, el gen que codifica para la fosfatasa alcalina altamente activa, según SEQ ID NO: 5) y un gen de resistencia para el primer antibiótico utilizado como marcador de selección (por ejemplo, Zeocin®), con un segundo vector de expresión que contiene el gen de destino (por ejemplo, el gen que codifica para la fosfatasa alcalina altamente activa según SEQ ID NO: 5) y un gen de resistencia al segundo antibiótico utilizado como marcador de selección (por ejemplo, Geneticin (G418)). Durante la subsiguiente colocación de los transformantes sobre placas de cultivo que contienen el segundo antibiótico como marcador de selección, se seleccionan sólo clones que han integrado, además de las copias del vector de expresión con gen de resistencia para el primer antibiótico utilizado como marcador de selección, también, como mínimo, una copia del vector de expresión con gen de resistencia al segundo antibiótico utilizado como marcador de selección. Estos clones de expresión pueden ser sometidos, a su vez, a otra transformación múltiple con el vector de expresión con gen de resistencia al segundo antibiótico utilizado como marcador de selección (véase el ejemplo 5).

Mediante la combinación de las medidas de la transformación múltiple y la doble selección se pudo incrementar el rendimiento de expresión por el factor 4 con respecto al rendimiento de expresión de los clones del primer proceso de transformación con el gen codón-optimizado.

La fosfatasa alcalina recombinante puede ser extraída mediante métodos de extracción, que son conocidos en principio por el experto en la materia, por ejemplo "Protein Purification", ed. Springer-Verlag, Director. Robert Scopes (1982). Con métodos de separación cromatográficos, especialmente utilizando materiales de columnas hidrófobas y un intercambiador de cationes, se consigue un producto de bando limpio con una actividad específica de más de 7000 U/mg.

Para caracterizar la fosfatasa alcalina recombinante, altamente activa, se ha sometido el producto purificado a una secuenciación N-terminal.

Se ha determinado dominante la secuencia EAEAEFLIPA (SEQ ID NO: 36). La secuencia está claramente en correlación con la secuencia N-terminal de la AP "LIPA" (SEQ ID NO: 37) y el péptido de enlace del constructo EAEAEF (SEQ ID NO: 38) que se forma por la estrategia de clonación de la secuencia genética en el vector y por la separación del péptido señal de factor  $\alpha$  por medio de una peptidasa señal Kex2 (por ejemplo, Invitrogen).

Se ha examinado la estabilidad del producto de fosfatasa alcalina recombinante en comparación con la fosfatasa alcalina natural. Al someter la solución a una carga térmica (55°) se obtuvieron resultados comparables de las muestras.

Con la presente invención se describe, por lo tanto, por primera vez un procedimiento que hace posible una fabricación económica de una fosfatasa alcalina recombinante a partir de células de mamíferos tales como, por ejemplo, intestino bovino que posee propiedades comparables a la fosfatasa alcalina nativa, altamente activa, a partir de intestino bovino y que está glicosilada.

Asimismo, se describe con la presente invención una secuencia de ADN según SEQ ID NO: 5 como secuencia genética codón-optimizada para la expresión del gen de la fosfatasa alcalina altamente activa *Pichia pastoris*.

Con la presente invención, además, se da a conocer un vector que contiene SEQ ID NO: 5, muy preferente resulta un vector pHAP10-3, según la figura 2. pHAP10-3 es el vector pPICZ $\alpha$ A, que está disponible en el comercio

(Invitrogen) y que contiene el gen, según la invención, según SEQ ID NO: 5 que está bajo el control del promotor AOX 1.

5 Asimismo, es objeto de la invención una cepa huésped, según la invención, que ha sido transformada con los vectores, según la invención. Muy preferente es la cepa *Pichia pastoris* X-33 transformada con el vector pHAP10-3.

10 Asimismo, es preferente un vector que contiene todo el casete de expresión de pHAP 10-3 que está formado substancialmente por el promotor AOX 1, el péptido señal del factor  $\alpha$  a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen de destino codón-optimizado, clonado en el marco de lectura correcto detrás del péptido señal, según SEQ ID NO: 5, que codifica para la fosfatasa alcalina altamente activa y la región de terminación de transcripción AOX 1 (véase la figura 3). Muy preferente resulta el vector pHAP 10-3/9K que está formado por el vector pPIC9K (Invitrogen) que se obtiene en el comercio y por el casete de expresión de pHAP 10-3 incluido el gen sintético, según SEQ ID NO: 5.

15 Los vectores pHAP 10-3 y pHAP 10-3/K tienen la misma relevancia, ya que el clon de producción final contiene copias de ambos vectores.

20 También es objeto de la presente invención una cepa huésped, según la invención, que fue transformada por el vector pHAP10-3/9K. Pero también son adecuados, a efectos de la presente invención, otros vectores y cepas conocidos por el experto en la materia tales como, por ejemplo, vectores YES, pYD1, pTEF 1/ZEO (Invitrogen) y *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* y, especialmente, *Pichia pastoris* X-33. De acuerdo con la invención, resulta especialmente preferente la cepa *Pichia pastoris* X-33 transformada con el vector pHAP10-3/9K.

25 Asimismo, la invención da a conocer un procedimiento para la fabricación de una fosfatasa alcalina eucariota, altamente activa, mediante la expresión de la proteína en una cepa huésped, según la invención, que ha sido transformada con un vector o con varios vectores, según la invención, en especial con el vector pHAP10-3 ó pHAP10-3/9K. Las cepas *Pichia pastoris* que han sido transformadas con los vectores de la invención son muy preferentes para el procedimiento, según la invención. Muy preferente resulta ser la cepa *Pichia pastoris* X-33 que ha sido transformada con un vector pHAP 10-3 y con un vector pHAP 10-3/9K.

30 Figuras

Figura 1

35 Mapa de plásmido del vector de expresión pHAP-1 con el gen bIAPII en pICZ $\alpha$ A (Invitrogen).

Figura 2

40 Mapa de plásmido del vector de expresión pHAP10-3 con el gen sintético en pPIC9K (Invitrogen).

Figura 3

Mapa de plásmido del vector de expresión pHAP10-3/9K con el gen sintético en pPIC9K (Invitrogen).

45 Abreviaciones

YPD: Yeast Peptone Dextrose o levadura-peptona-dextrosa

YPDS: Yeast Peptone Dextrose Sorbitol o peptona-dextrosa-sorbitol de levadura

BMGY: Buffered Glycerol-complex médium o medio de complejo de glicerol tamponado

50 BMMY: Buffered Methanol-complex médium o medio de complejo de metanol tamponado

Ejemplo 1:

55 Clonación del gen bIAPII

El gen bIAPII según SEQ ID N° 1 (EP 0 955 369; Manes y otros, 1998, J. Biol. Chem. 273 N° 36, 23353-23360) se ha dotado primero mediante PCR y la elección de un iniciador apropiado según SEQ ID NO: 2 y 3 corriente arriba y corriente abajo con interfaces de endonucleasa de restricción adecuadas para la clonación en vectores de expresión para *Pichia pastoris*. De manera que se ha añadido corriente arriba la interfaz de endonucleasa de restricción para EcoRI y corriente abajo la interfaz de endonucleasa de restricción Asp718 I.

60 El fragmento de PCR ha sido recortado con EcoRI y Asp718 I (Roche Diagnostics GmbH), aislado nuevamente (kit de extracción de gel de QIAquick/Qiagen) y seguidamente ligado en un fragmento de vector linearizado con EcoRI y Asp718 I (Roche Diagnostics GmbH) y aislado (kit de extracción de gel de QIAquick/Qiagen) del vector de expresión pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen). En este vector el gen bIAPII está bajo el control del promotor AOX 1 (promotor para la oxidasa de alcohol 1 a partir de *Pichia pastoris*, que puede ser inducida por metanol, y es clonado en el marco de lectura

correcto detrás del péptido señal del factor  $\alpha$  a partir de *Saccharomyces cerevisiae*. El fragmento de gen insertado de esta manera fue examinado, a continuación, mediante un análisis de restricción y secuenciación en cuanto a una secuencia de base sin errores. El vector de expresión generado de esta manera que contiene el gen bIAPII que codifica para la fosfatasa alcalina eucariota altamente activa ha recibido la denominación pHAP-1 (véase la figura 1).

5

#### La transformación de pHAP-1 en *Pichia pastoris*

Para transformar pHAP-1 en *Pichia pastoris* X-33 e integrarlo a continuación en el genoma, primero se ha linearizado el vector con ScaI (Roche Diagnostics GmbH). La transformación se llevó a cabo mediante electroporación con el gen Pulser II (Biorad).

10

A tal efecto se ha inoculado una colonia de la cepa natural de *Pichia pastoris* en 5 ml de medio YPD (Invitrogen) y se ha incubado durante la noche a 30° C con agitación. El cultivo de una noche ha sido inoculado, a continuación 1:2000 en 200 ml de medio YPD fresco (Invitrogen) y ha sido incubado durante la noche a 30° C con agitación, hasta que se haya conseguido una OD<sub>600</sub> de 1,3-1,5. Las células fueron centrifugadas (1500 x g / 5 minutos) y el pellet fue resuspendido en 200 ml de agua estéril helada (0°C). Las células fueron centrifugadas otra vez (1500 x g/5 minutos) y resuspendidas en 100 ml de agua estéril y helada (0°C). Las células fueron centrifugadas otra vez, resuspendidas en 10 ml de sorbitol 1 M (ICN) helado (0°C). Las células fueron centrifugadas otra vez, resuspendidas en 0,5 ml de sorbitol 1 M (ICN) helado (0°C). Las células obtenidas de esta manera se han mantenido sobre hielo y se utilizaron inmediatamente para la transformación.

15

20

80 µl de las células fueron mezcladas con aproximadamente 1 µg de ADN de vector pHAP-1 linearizado y toda la solución fue transferida a una cubeta de electroporación helada (0°C) e incubada otros 5 minutos sobre hielo. A continuación la cubeta fue transferida al pulsador de genes "Gene Pulser II" (Biorad) y se llevó a cabo la transformación con 1 kV, 1 kΩ y 25 µF. Tras la electroporación se mezcló la solución con 1 ml de sorbitol 1M (ICN) y, a continuación, se colocaron 100 a 150 µl sobre una placa de agar YPDS (Invitrogen) con 100 µg/ml de Zeocin® (Invitrogen). Las placas fueron incubadas a continuación durante 2-4 días a 30°C.

25

Los clones fueron inoculados sobre una placa de rejilla MD (= dextrosa mínima) y se siguió con el análisis. Los clones crecidos fueron recogidos, resuspendidos en 20 µl de agua estéril, disgregados con 17,5 U de Lyticase (Roche Diagnostics GmbH) (1 hora, 37°C) y examinados directamente mediante PCR en cuanto a la integración correcta del casete de expresión bIAPII.

30

Los clones que tienen incorporados en el genoma el casete de expresión completo durante la transformación han sido utilizados después en ensayos de expresión.

35

#### Expresión de la fosfatasa alcalina altamente activa

Los clones positivos fueron inoculados en 3 ml de medio BMGY (Invitrogen) e incubados durante la noche a 30° C con agitación. A continuación, se determinó la OD (= densidad óptica) a 600 nm y se inocularon en 10 ml de medio BMMY (Invitrogen) de tal manera que resulte una OD<sub>600</sub> de 1. El medio de BMMY (Invitrogen) contiene metanol (Mallinckrodt Baker B.V.), que induce la expresión de la fosfatasa alcalina altamente activa a través del promotor AOX 1.

40

Los matraces de agitación fueron incubados a 30° C con agitación, cada 24 horas se tomaron muestras, se determinó la OD<sub>600</sub>, se llevó a cabo un ensayo de actividad sobre la expresión de la fosfatasa alcalina altamente activa y se realimentó con el 0,5% de metanol (Mallinckrodt Baker B.V.) para su posterior inducción. Los ensayos de expresión se desarrollaron durante más de 96 horas.

45

#### Ejemplo 2:

50

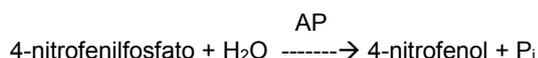
#### Ensayo de la actividad de la fosfatasa alcalina altamente activa

Se extrajeron 500 µl de cultivo de expresión, según el ejemplo 1, se determinó la OD<sub>600</sub> y se centrifugaron las células. El excedente se conservó y el pellet de células fue resuspendido en una cantidad adecuada de OD<sub>600</sub> de Y-PER™ (50 hasta 300 µl/Pierce) y agitado durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, el lisado fue centrifugado para separar los restos de las células (15000 x g / 5 minutos) y el excedente se trasladó a recipientes de reacción nuevos. 5 µl del lisado fueron añadidos después en el ensayo de actividad.

55

Después, la prueba de actividad funciona según el siguiente principio:

60



Se mide el aumento de absorción a 405 nm.

65

3 ml de tampón de dietanolamina (1 mol/L dietanolamin (Merck) pH 9,8, 0,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (Riedel de Haen)) fueron mezclados con 50 µl de una solución de 4-nitrofenilfosfato (0,67 Mol/L 4-nitrofenilfosfato, sal de sodio (Roche Diagnostics GmbH)) y atemperados a 37° C. A continuación, se inició la reacción mediante la adición de 5 µl de lisado y se determinó la modificación de la absorción a 37°C durante 3 minutos y, a partir de ello, se calculó el ΔE/min.

La actividad se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = \frac{3,10}{\epsilon \times 0,005 \times 1} \times \Delta E/\text{min} \times \frac{1}{\text{Factor } x} \text{ [U/ml solución de muestra]}$$

$$\epsilon = 18,2 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

Factor x = Factor de concentración después de la desintegración de la célula

De forma análoga se ha determinado la actividad a partir del excedente del medio de los cultivos de expresión. También en este caso se ha iniciado la reacción con 5 µl del excedente, pero adicionalmente se ha añadido 0,5 mM ZnCl<sub>2</sub>, respectivamente. El cálculo se realizó sin el factor x.

### Ejemplo 3:

#### Clonación del fragmento PCR a partir de la síntesis del gen

El fragmento PCR fue recortado con EcoRI y Asp718 (Roche Diagnostics GmbH), aislado otra vez (kit de extracción de gel de QIAquick/Qiagen) y, seguidamente, ligado en un fragmento de vector linearizado con EcoRI y Asp718 (Roche Diagnostics GmbH) y aislado (kit de extracción de gel de QIAquick/Qiagen) del vector de expresión pPIC3A (Invitrogen). En este vector, el gen sintético está bajo el control del promotor AOX 1 (promotor para la oxidasa de alcohol 1 a partir de Pichia pastoris, que puede ser inducido por metanol (Mallinckrodt Baker B.V.)) y es clonado en el marco de lectura correcto detrás del péptido señal del *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación, el fragmento de gen insertado de esta manera ha sido examinado mediante análisis de restricción y secuenciación en cuanto a una secuencia de base sin errores. El vector de expresión generado de esta manera que contiene un gen sintético que codifica para la fosfatasa alcalina eucariota altamente activa, ha recibido la denominación pHAP10-3 (véase la figura 2).

#### Transformación de pHAP10-3 en Pichia pastoris

Para la transformación de pHAP10-3 en Pichia pastoris X-33 con subsiguiente integración en el genoma, se ha linearizado primero el vector con SacI (Roche Diagnostics GmbH). La transformación se ha llevado a cabo mediante electroporación con el pulsador de genes "Gene Pulser II" (Biorad). A tal efecto se ha inoculado una colonia de Pichia pastoris en 5 ml de medio YPD (Invitrogen) y se ha incubado durante la noche a 30° C con agitación. El cultivo de una noche ha sido inoculado a continuación 1:2000 en 200 ml de medio YPD fresco (Invitrogen) y ha sido incubado durante la noche a 30° C con agitación, hasta que se haya conseguido una OD<sub>600</sub> de 1,3-1,5. Las células fueron centrifugadas (1500 x g / 5 minutos) y el pellet fue resuspendido en 200 ml de agua estéril helada (0°C). Las células fueron centrifugadas otra vez (1500 x g/5 minutos) y resuspendidas en 100 ml de agua estéril y helada (0°C). Las células fueron centrifugadas otra vez, resuspendidas en 10 ml de sorbitol 1 M (ICN) helado (0°C). Las células fueron centrifugadas otra vez, resuspendidas en 0,5 ml de sorbitol 1 M (ICN) helado (0°C). Las células obtenidas de esta manera se han mantenido sobre hielo y se utilizaron inmediatamente para la transformación.

80 µl de las células fueron mezcladas con aproximadamente 1 µg de ADN de vector pHAP10-3 linearizado y toda la solución fue transferida a una cubeta de electroporación helada (0°C) e incubada otros 5 minutos sobre hielo. A continuación, la cubeta fue transferida al pulsador de genes "Gene Pulser II" (Biorad) y se llevó a cabo la transformación con 1 kV, 1 kΩ y 25 µF. Tras la electroporación, se mezcló la solución con 1 ml de sorbitol 1M (ICN) y, a continuación, se colocaron 100 a 150 µl sobre una placa de agar YPDS (Invitrogen) con 100 µg/ml de Zeocin® (Invitrogen). Las placas fueron incubadas a continuación durante 2-4 días a 30°C.

Los clones fueron inoculados sobre una placa de rejilla MD (= dextrosa mínima) y se siguió con el análisis. Los clones crecidos fueron recogidos, resuspendidos en 20 µl de agua estéril, disgregados con 17,5 U de Lyticase (Roche Diagnostics GmbH) (1 hora, 37°C) y examinados directamente mediante PCR en cuanto a la integración correcta del casete de expresión de AP sintética.

Los clones que tienen incorporados en el genoma el casete de expresión completo durante la transformación han sido utilizados después en ensayos de expresión.

Expresión de la fosfatasa alcalina altamente activa

5 Los clones positivos fueron inoculados en 3 ml de medio BMGY (Invitrogen) e incubados durante la noche a 30° C con agitación. A continuación, se determinó la OD (= densidad óptica) a 600 nm y se inocularon en 10 ml de medio BMMY (Invitrogen) de tal manera que resultase una OD<sub>600</sub> de 1. El medio de BMMY (Invitrogen) contiene metanol (Mallinckrodt Baker B.V.), que induce la expresión de la fosfatasa alcalina altamente activa a través del promotor AOX 1.

10 Los matraces de agitación fueron incubados a 30° C con agitación, cada 24 horas se tomaron muestras, se determinó la OD<sub>600</sub>, se llevó a cabo una prueba de actividad sobre la expresión de la fosfatasa alcalina altamente activa y se realimentó con el 0,5% de metanol (Mallinckrodt Baker B.V.) para su posterior inducción. Los ensayos de expresión se desarrollaron durante más de 96 horas.

Ensayo acerca de la actividad de la fosfatasa alcalina altamente activa

15 Se extrajeron 500 µl del cultivo de expresión, se determinó la OD<sub>600</sub> y se centrifugaron las células. El excedente se conservó y el pellet de destino fue resuspendido en una cantidad adecuada de Y-PER™ (50 hasta 300 µl/Pierce) y agitado durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, el lisado fue centrifugado para separar los restos de la célula (15000 x g / 5 minutos) y el excedente se trasladó a recipientes de reacción nuevos. 5 µl del lisado fueron añadidos después en la prueba de actividad.

La prueba de actividad se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 4:

25

Aumento del rendimiento de expresión mediante transformación múltiple

30 Los mejores clones de los ensayos de expresión fueron preparados para la electroporación, tal como se ha descrito anteriormente y transformados otra vez con 1 µg de ADN de vector pHAP10-3 linealizado y la solución de la transformación fue colocada en placas de agar YPDS (Invitrogen) con 1000 hasta 2000 µg/ml de Zeocin® (Invitrogen). Debido a ello, se aumenta la presión de selección de tal manera que sólo pueden crecer clones que tienen integradas en el genoma varias copias del vector de expresión pHAP10-3 y, por lo tanto, también varias copias del correspondiente gen de resistencia (en este caso, Zeocin®). La proteína de resistencia Zeocin® es el producto del *Bleomycingens* de *Streptoaloteichus hindustanus* (Chalemls, T. y otros, *Curr. Genet.* 20 (1991), 309-314; Drocourt, D. y otros, *Nucleic Acid Research* 18 (1990), 4009), que liga el Zeocin® en una relación estequiométrica de concentración y confiere, por lo tanto, a la célula resistencia con respecto a Zeocin®. Cuanto más elevada es la concentración en Zeocin® en las placas de agar YPDS, tanta más proteína de resistencia ha de generar la célula para ligar el Zeocin® cuantitativamente y, de esta manera, hacer posible el crecimiento. Esto es posible, entre otras cosas, cuando se integran múltiples copias del gen de resistencia en el genoma. Los clones han sido inoculados sobre placas de rejilla MD tal como se ha descrito anteriormente y han sido examinados, asimismo tal como se ha descrito anteriormente, mediante un análisis PCR en cuanto a la correcta integración del casete de expresión haAP (fosfatasa alcalina altamente activa). A continuación, se han sometido estos clones asimismo a un ensayo acerca de su actividad haAP, tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 5:Incremento del rendimiento de expresión mediante la utilización de una segunda presión de selección

50 Aumentando la concentración de Zeocin® por encima de 2000 µg/ml no se consiguió un mejor rendimiento de expresión de la fosfatasa alcalina altamente activa. Para aumentar más el número de copias del gen según SEQ ID NO: 5, que codifica para la fosfatasa alcalina altamente activa y está codón-optimizado para la expresión en levadura, en los clones de expresión se ha seleccionado a través de la segunda presión de selección, preferentemente G418 (Roche Diagnostics GmbH) la integración de vectores de expresión adicionales en el genoma de los clones de expresión con el más alto rendimiento de expresión, los cuales se han obtenido en los ejemplos 3 y 4. Con tal fin, todo el casete de expresión de pHAP10-3, formado por el promotor AOX 1, el péptido señal del factor α a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen codón-optimizado para la fosfatasa alcalina altamente activa según SEQ ID NO: 5 y la región de terminación de transcripción AOX 1, ha sido aislado mediante PCR por iniciadores adecuadamente elegidos y clonado en el vector pPIC9K, tal como se describe más adelante, cuya integración en el genoma de *Pichia pastoris* es seleccionada a través de G418 (Roche Diagnostics GmbH). Los iniciadores están representados en SEQ ID NO: 34 y 35.

65 Se analizó la solución de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, se aisló el fragmento de gen con el tamaño esperado (kit de extracción de gel de QIAquick/Qiagen), se recortó con *SacI* y *NotI* (Roche Diagnostics GmbH), seguidamente se volvió a aislar a partir del gel de agarosa (kit de extracción de gel de QIAquick/Qiagen) y se ligó en un fragmento de vector de pPIC9K, linealizado y aislado asimismo con *SacI*/*NotI* (Roche Diagnostics

GmbH). De esta manera se había garantizado que todo el casete de expresión de pHAP10-3 estaría presente en pPIC9K de forma idéntica. El fragmento insertado fue examinado mediante análisis de restricción y secuenciación con las regiones adyacentes. El vector de expresión generado de esta manera fue denominado pHAP10-3/9K (véase la figura 3).

5 Los clones con el mayor rendimiento de expresión haAP de la transformación múltiple con pHAP10-3 (resistencia a Zeocin) fueron preparados para la electroporación tal como se ha descrito anteriormente y transformados, tal como se ha descrito anteriormente, con 1 µg de fragmento de vector de pHAP10-3/9K) linearizado con SacI (Roche Diagnostics GmbH). La solución de transformación fue conservada, a continuación, entre 1 y 3 días a 4°C en 1 M de sorbitol (ICN) (para formar la resistencia a G418) y luego se colocaron 100 hasta 200 µl en placas YPD (Invitrogen) con 1,2 ó 4 mg/ml G418 (Roche Diagnostics GmbH), respectivamente, y se incubaron durante 3 a 5 días a 30°C. Los clones resultantes de ello fueron examinados otra vez, tal como se ha descrito, a través de la prueba de actividad en cuanto a una expresión superior de la fosfatasa alcalina eucariota, altamente activa.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH  
 <120> Expresión de fosfatasa alcalina en residuo  
 <130> 5387/00/  
 20 <140>  
 <141>  
 <160> 38  
 <170> Patente v. 2.1  
 <210> 1  
 25 <211> 1476  
 <212> ADN  
 <213> Bovino  
 <400> 1

```

gaattcctca tcccagctga ggaggaaaac cccgccttct ggaaccgcca ggcagcccag 60
gcccttgatg tagccaagaa gttgcagccg atccagacag ctgccaagaa tgtcatcctc 120
ttcttggggg atgggatggg ggtgcctacg gtgacagcca ctcggatcct aaaggggcag 180
atgaatggca aactgggacc tgagacaccc ctggccatgg accagttccc atacgtggct 240
ctgtccaaga catacaacgt ggacagacag gtgccagaca gcgcaggcac tgccactgcc 300
tacctgtgtg gggcacaagg cactacaga accatcgggt taagtgcagc cgccccgtac 360
aatcagtgca acacgacacg tgggaatgag gtcacgtctg tgatcaaccg ggccaagaaa 420
gcaggggaag cctgaggagt ggtgaccacc accaggggtgc agcatgcctc cccagccggg 480
gcctacgcgc acacggtgaa ccgaaactgg tactcagacg ccgacctgcc tgctgatgca 540
cagaagaatg gctgccagga catcgccgca cagctggtct acaacatgga tattgacgtg 600
atcctgggtg gaggccgaat gtacatgttt cctgagggga ccccagacct tgaataccca 660
gatgatgcca gtgtgaatgg agtccggaag gacaagcaga acctggtgca ggaatggcag 720
gccaagcacc agggagccca gtatgtgtgg aaccgcaact cgctccttca ggcggccgat 780
gactccagtg taacacacct catgggcctc tttgagccgg cagacatgaa gtataatgtt 840
cagcaagacc acaccaagga cccgaccctg gcgagatgaa cggaggcggc cctgcaagtg 900
ctgagcagga acccccgggg cttctacctc ttcgtggagg gaggccgcat tgaccacggt 960
caccatgacg gcaaagctta tatggcaact actgaggcga tcatgtttga caatgccatc 1020
gccaaggcta acgagctcac tagcgaactg gacacgctga tccttgctac tgcaagccac 1080
tcccatgtct tctcttttgg tggctacaca ctgctgggga cctccatttt cggctctggcc 1140
cccgcaagg ccttagacag caagtectac acctccatcc tctatggcaa tggcccaggc 1200
tatgcgcttg gcgggggctc gaggcccgat gttaatggca gcacaagcga ggaaccctca 1260
taccggcagc agggggccgt gccctggct agcgagaccc acgggggcca agacgtggcg 1320
gtgttcgcgc gaggcccgca ggcgcaactg gtgcaaggcg tgcaggagga gacctctgtg 1380
gcgcacatca tggcctttgc gggctgcgtg gagccctaca ccgactgcaa tctgccagcc 1440
cccgccaccg ccaccagcat ccccgactag ggtacc 1476
    
```

30 <210> 2  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
 <400> 2  
 gcgcaattc ctcatccag ctgaggagga aaaccccgcc 40  
 <210> 3  
 40 <211> 36

ES 2 384 108 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
 <400> 3  
 cgcggtacc ctagtctggg atgctggtgg cggtgg 36  
 <210> 4  
 <211> 487  
 <212> PRT  
 <213> Bovino  
 <400> 4

5

10

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

His Gln Gly Ala Gln Tyr Val Trp Asn Arg Thr Ala Leu Leu Gln Ala  
 245 250 255  
 Ala Asp Asp Ser Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Ala  
 260 265 270  
 Asp Met Lys Tyr Asn Val Gln Gln Asp His Thr Lys Asp Pro Thr Leu  
 275 280 285  
 Ala Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Arg  
 290 295 300  
 Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His  
 305 310 315 320  
 Asp Gly Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Ile Met Phe Asp Asn  
 325 330 335  
 Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile  
 340 345 350  
 Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr  
 355 360 365  
 Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp  
 370 375 380  
 Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala  
 385 390 395 400  
 Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu  
 405 410 415  
 Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His  
 420 425 430  
 Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu  
 435 440 445  
 Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe  
 450 455 460  
 Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala  
 465 470 475 480  
 Thr Ala Thr Ser Ile Pro Asp  
 485

<210> 5  
 <211> 1476  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
 <400> 5

ES 2 384 108 T3

```

gaattccttga ttccagctga agaagaaaat ccagcttttt ggaatagaca agctgctcaa 60
gctttggatg ttgctaagaa gttgcaacca attcaaactg ctgctaagaa tgttattttg 120
tttttgggtg atgggatggg tgttccaact gttactgcta ctagaatttt gaagggctcaa 180
atgaatggta agttgggtcc agaaactcca ttggctatgg atcaatttcc atacgttgct 240
ttgtctaaga cttacaatgt tgatagacaa gttccagatt ctgctggtac tgctactgct 300
tacttggtg gtgttaagg taattacaga actattggtg tttctgctgc tgctagatac 360
aatcaatgta atactactag aggtaatgaa gttacttctg ttattaatag agctaagaag 420
gctggtaagg ctgttggtgt tgttactact actagagttc aacatgcttc tccagctggt 480
gcttacgctc atactgttaa tagaaattgg tactctgatg ctgatttgcc agctgatgct 540
caaaagaatg gttgtcaaga tattgctgct caattggttt acaatatgga tattgatggt 600
atthttgggtg gtggtagaat gtacatgttt ccagaaggta ctccagatcc agaataccca 660
gatgatgctt ctgttaatgg tgttagaaag gataagcaaa atthtggttca agaatggcaa 720
gctaagcatc aagggtgctca atatgtttgg aatagaactg cthttgthtca agctgctgat 780
gattctagtg ttactcattt gatgggtttg tttgaaccag ctgatatgaa gtataatggt 840
caacaagatc atactaagga tccaactttg gctgaaatga ctgaagctgc tttgcaagtt 900
ttgtctagaa atccaagagg tttttacttg tttgttgaag gtggtagaat tgatcatggt 960
catcatgatg gtaaggctta tatggctttg actgaagcta ttatgtttga taatgctatt 1020
gctaaggcta atgaattgac ttctgaattg gatactttga ttttggttac tgctgatcat 1080
agtcatgttt tttctttttg tggttacact ttgagaggta cttctatttt tggtttggct 1140
ccaggtaagg cthttggatag taagtcttac acttctattt tgtatggtaa tggthccagg 1200
tatgctttgg gtgggtggtc tagaccagat gthaatggta gtactagtga agaaccatct 1260
tacagacaac aagctgctgt tccattggct agtgaaactc atggthgtga agatgthtgc 1320
gthttttgcta gaggtccaca agctcatttg gthcatggtg thcaagaaga aactthttgt 1380
gctcatatta tggctthttg tggthgtgtt gaaccataca ctgattgthaa tthtggcagct 1440
ccagctactg ctactagtat tccagattaa ggtacc 1476

```

<210> 6  
 <211> 78  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
 <400> 6

```

gctgcaattc ttgattccag ctgaagaaga aaatccagct ttttggata gacaagctgc 60
tcaagctttg gatgthtgc 78

```

<210> 7  
 <211> 70  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
 <400> 7

```

ccaaaaacaa aataacattc ttagcagcag tttgaattgg ttgcaacttc ttagcaacat 60
ccaaagcttg 70

```

<210> 8  
 <211> 69  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
 <400> 8

ES 2 384 108 T3

gaatgttatt ttgtttttgg gtgatggtat ggggtttcca actgttactg ctactagaat 60

tttgaaggg 69

- 5 <210> 9
- <211> 70
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial
- 10 <400> 9

ggaaattgat ccatagccaa tggagtttct ggacccaact taccattcat ttgacccttc 60  
aaaattctag 70

- 15 <210> 10
- <211> 71
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial
- 20 <400> 10

gctatggatc aatttccata cgttgcttg tctaagactt acaatggtga tagacaagtt 60  
ccagattctg c 71

- 25 <210> 11
- <211> 71
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial
- 30 <400> 11

ccaatagttc tgtaattacc cttaacacca cacaagtaag cagtagcagt accagcagaa 60  
tctggaactt g 71

- 35 <210> 12
- <211> 72
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial
- 40 <400> 12

gtaattacag aactattggt gtttctgctg ctgctagata caatcaatgt aataactacta 60  
gaggtaatga ag 72

<210> 13

ES 2 384 108 T3

<211> 74  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 13  
  
    **agtaacaaca ccaacagcct taccagcctt cttagctcta ttaataacag aagtaacttc 60**  
    **attacctcta gtag 74**

10 <210> 14  
<211> 74  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 14  
  
    **gctgttggtg ttgttactac tactagagtt caacatgctt ctccagctgg tgcttacgct 60**  
    **catactgtta atag 74**

20 <210> 15  
<211> 68  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 15  
  
    **caaccattct tttgagcatc agctggcaaa tcagcatcag agtaccaatt tctattaaca 60**  
    **gtatgagc 68**

30 <210> 16  
<211> 55  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 16 gatgctcaaa agaatggtg tcaagatatt gctgctcaat tggttacaa tatgg 55  
<210> 17  
<211> 72  
<212> ADN  
40 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 17  
  
    **ccttctggaa acatgtacat tctaccacca cccaaaataa catcaatatac catattgtaa 60**  
    **accaattgag ca 72**

45  
  
<210> 18  
<211> 71  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia Artificial



ES 2 384 108 T3

cctcttgat ttctagacaa aacttgcaaa gcagcttcag tcatttcagc caaagttgga 60  
tccttag 67

- <210> 24
- <211> 69
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial
- <400> 24

gtctagaaat ccaagagggt ttacttgggt tggtaagggt ggtagaattg atcatgggtca 60  
tcatgatgg 69

- <210> 25
- <211> 73
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial
- <400> 25

ccttagcaat agcattatca aacataatag cttcagtcaa agccatataa gccttacat 60  
catgatgacc atg 73

- <210> 26
- <211> 74
- <212> ADN
- 25 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial
- <400> 26

gataatgcta ttgctaaggc taatgaattg acttctgaat tggatacttt gattttgggt 60  
actgctgac atag 74

- <210> 27
- <211> 73
- <212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial
- <400> 27

ccaacccaaa aatagaagta cctctcaaag tgtaaccacc aaaagaaaa acatgactat 60  
gatcagcagt aac 73

- <210> 28
- <211> 73
- <212> ADN
- 45 <213> Secuencia Artificial
- <220>

ES 2 384 108 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 28

cttctatddd tggttggct ccaggtaagg ctttggatag taagtcttac acttctatddd 60  
tgtatggtaa tgg 73

5 <210> 29  
<211> 76  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 29

ctagtactac cattaacatc tggctagaa ccaccaccca aagcataacc tggaccatta 60  
ccatacaaaa tagaag 76

15 <210> 30  
<211> 77  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 30

gatgttaatg gtagtactag tgaagaacca tcttacagac aacaagctgc tgttccattg 60  
gctagtgaaa ctcatgg 77

25 <210> 31  
<211> 73  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 31

caccatgaac caaatgagct tgtggacctc tagcaaaaac agcaacatct tcaccaccat 60  
gagtttccact agc 73

35 <210> 32  
<211> 74  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 32

gctcatttgg ttcattggtg tcaagaagaa acttttggttg ctcatattat ggcttttggct 60  
ggttgtggtg aacc 74

45 <210> 33  
<211> 82

ES 2 384 108 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
5 <400> 33

**gcgcggtacc ttaatctgga atactagtag cagtagctgg agctggcaaa ttacaatcag 60**  
**tgtatggttc aacacaacca gc 82**

<210> 34  
<211> 31  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 34

15 **gcgcgctag gagatctaac atccaaagac g 31**

<210> 35  
<211> 29  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Artificial  
<400> 35

**cgcgcgctag cggatccgca caaacgaag 29**

<210> 36  
25 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Saccharomyces cerevisiae  
<400> 36

**Glu Ala Glu Ala Glu Phe Leu Ile Pro Ala**  
**1 5 10**

30 <210> 37  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Saccharomyces cerevisiae  
35 <400> 37

**Leu Ile Pro Ala**  
**1**

<210> 38  
<211> 6  
40 <212> PRT  
<213> Saccharomyces cerevisiae  
<400> 38

**Glu Ala Glu Ala Glu Phe**  
**1 5**

## REIVINDICACIONES

1. Cepa huésped transformada que se obtiene al llevar a cabo las etapas

- 5 (a) clonación de una secuencia genética codón-optimizada que codifica para una fosfatasa alcalina eucariota en un primer vector de expresión con un gen de resistencia a un primer antibiótico, y en un segundo vector de expresión con un gen de resistencia a un segundo antibiótico; seguido de
- 10 (b) transformación de un huésped de levadura con un primer vector de expresión y la selección de transformantes que tienen integrados en el genoma, por lo menos, una copia del primer vector de expresión con una secuencia genética y el gen de resistencia al primer antibiótico, por medio de su crecimiento sobre un medio de cultivo con una baja concentración del primer antibiótico; seguido de
- 15 (c) aumento del número de copias de genes del primer vector de expresión mediante transformación múltiple con el primer vector de expresión, en el que la selección se realiza por medio del crecimiento sobre un medio de cultivo con una concentración más elevada del primer antibiótico comparada con la etapa (b); seguido de
- 20 (d) transformación de clones transformados del huésped con el máximo rendimiento de expresión en fosfatasa alcalina con el segundo vector de expresión y la selección de transformantes que, además de las copias del primer vector de expresión han incluido las copias del segundo vector de expresión con la secuencia genética y el gen resistente al segundo antibiótico, por medio del crecimiento en un medio de cultivo con el segundo antibiótico; seguido de
- 25 (e) aumento del número de copias de los genes del segundo vector de expresión por medio de la transformación múltiple con el segundo vector de expresión, en el que la selección se realiza por medio del crecimiento sobre un medio de cultivo con una concentración más elevada del segundo antibiótico comparada con la etapa (d); seguido de
- (f) selección de los clones que tienen integrados de forma estable en el genoma varias copias de la secuencia genética y de los genes de resistencia a los marcadores de selección; y
- (g) examinación de los clones obtenidos en la etapa (f) en cuanto a su expresión elevada por medio de una prueba de actividad de la fosfatasa alcalina;

30 siendo el rendimiento de expresión de los clones obtenidos en la etapa (f) aumentado por el factor 4 con respecto a la expresión de los clones obtenidos en la etapa (b).

35 2. Cepa huésped transformada, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** la secuencia genética codón-optimizada SEQ ID NO: 1, que se ha obtenido a partir del primer y del segundo vectores de expresión, es de mutación silenciosa.

3. Cepa huésped transformada, según la reivindicación 2, **caracterizada porque** la secuencia genética codón-optimizada que se ha obtenido a partir del primer y del segundo vectores de expresión es SEQ ID NO: 5.

40 4. Cepa huésped transformada, según la reivindicación 3, **caracterizada porque** la secuencia genética codón-optimizada es proporcionada por una síntesis "de novo".

5. Cepa huésped transformada, según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** el huésped de levadura es *Pichia pastoris* o *Hansenula polymorpha*.

45 6. Cepa huésped transformada, según la reivindicación 5, **caracterizada porque** el huésped de levadura es la cepa *Pichia pastoris* X33.

50 7. Cepa huésped transformada, según una de las reivindicaciones 5 y 6, **caracterizada porque** el producto del *Bleomycingens* de *Streptoalloteichus hindustanus* es el producto del gen de resistencia al primer vector de expresión.

8. Cepa huésped transformada, según la reivindicación 7, **caracterizada porque** el primer antibiótico es Zeocin®.

55 9. Cepa huésped transformada, según una de las reivindicaciones 5 a 8, **caracterizada porque** el segundo antibiótico es G418.

60 10. Cepa huésped transformada, según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** la secuencia genética está presente en un casete de expresión en el marco de lectura correcto detrás de la secuencia codificando el péptido señal del factor alfa a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.

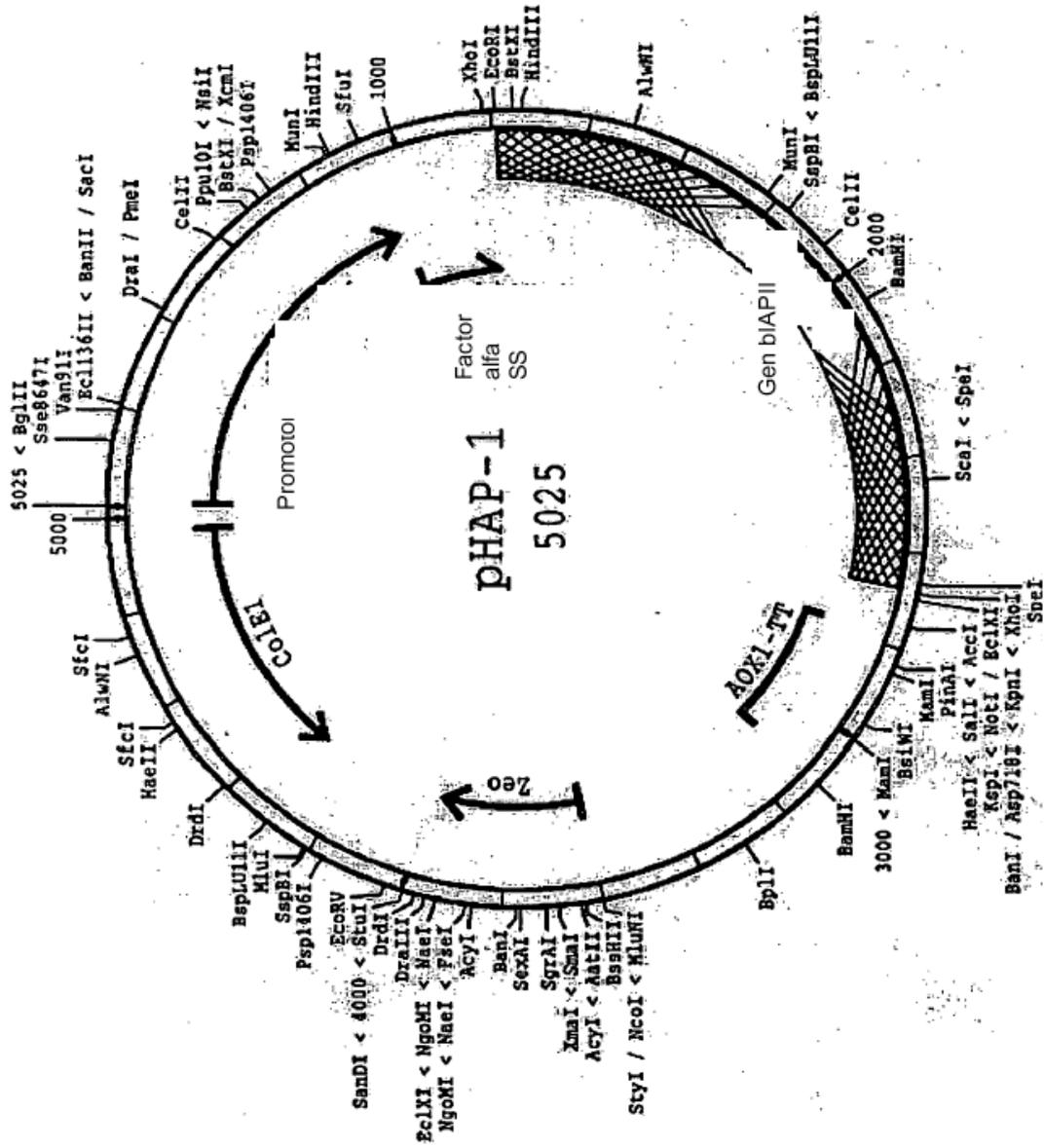
11. Cepa huésped transformada, según la reivindicación 10, **caracterizada porque** el casete de expresión contiene el promotor AOX 1 y la región de terminación de transcripción AOX 1.

65 12. Cepa huésped transformada, según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizada porque** la cepa huésped expresa y glicosila fosfatasa alcalina altamente activa.

13. Cultivo líquido en un recipiente de cultivo que contiene un medio de cultivo, metanol y una cepa huésped transformada, según la reivindicación 11.

14. Biomasa que contiene una cepa huésped transformada, según la reivindicación 12.

5



Gen biAPII para AP de alta actividad por medio de EcoRI/Asp718 en pPICZapifaA

Fig.1

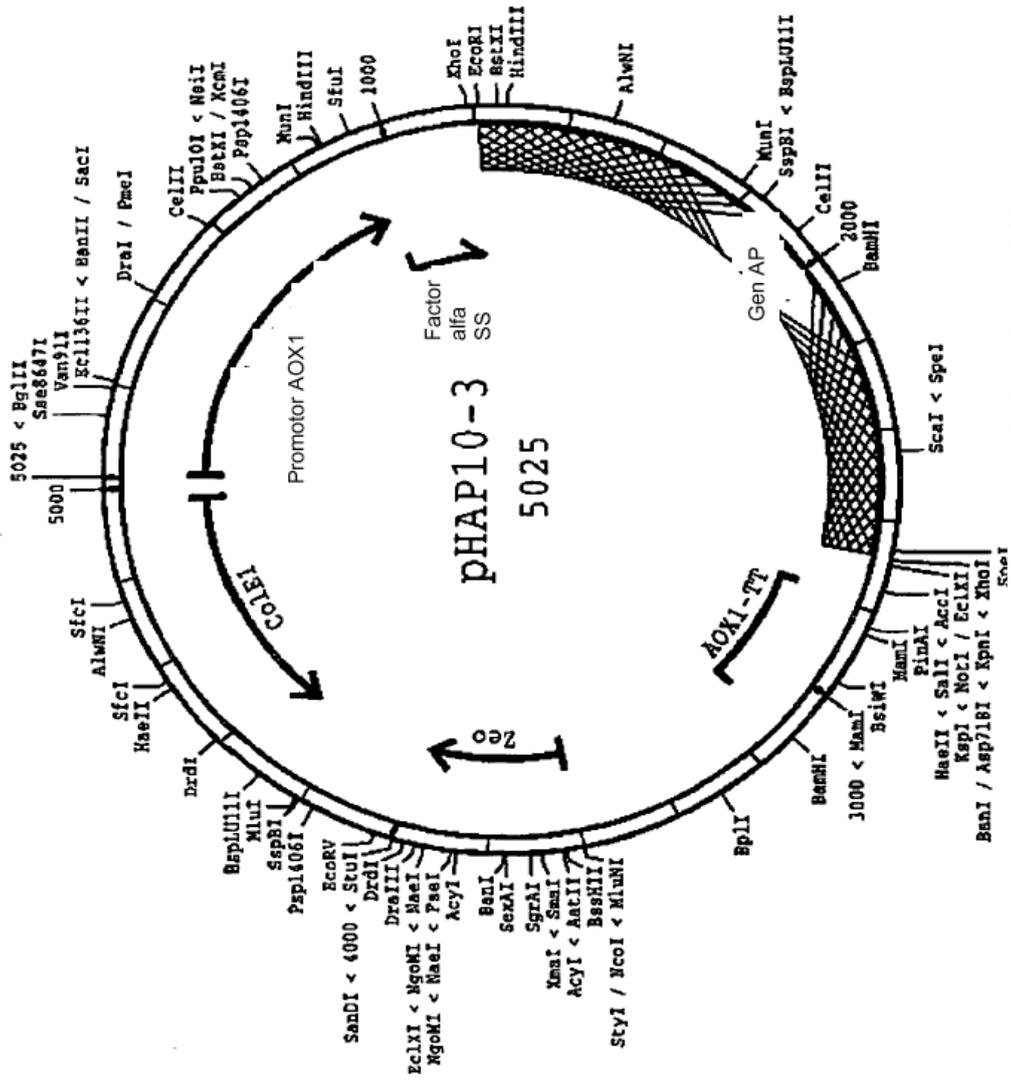


Fig. 2

Gen sintético para AP de alta actividad por medio de EcoRI/Asp718 en pPICZalfaA  
2 Febrero, 19100 14:05

