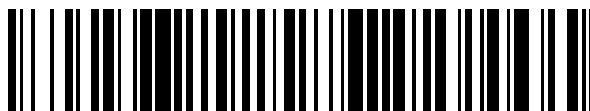


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 105**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)  
**A23L 3/36** (2006.01)  
**C07K 14/46** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 15/81** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**C12N 1/19** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.1996 E 05075582 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 1614753**

54 Título: **Expresión de péptidos anticongelantes de peces marinos en un organismo de calidad alimentaria y su aplicación en productos alimentarios**

30 Prioridad:

**05.07.1995 EP 95201842**  
**10.10.1995 EP 95202732**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.08.2013**

73 Titular/es:

**UNILEVER N.V. (100.0%)**  
**Weena 455**  
**3013 AL Rotterdam , NL**

72 Inventor/es:

**MUSTERS, WOUTER ;**  
**VAN WASSENAAR, PIETER y**  
**CHAPMAN, JOHN W.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 420 105 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

Expresión de péptidos anticongelantes de peces marinos en un organismo de calidad alimentaria y su aplicación en productos alimentarios

**1. Introducción**

5 La sangre de los peces polares está protegida de la congelación mediante la presencia de péptidos anticongelantes. Estos péptidos anticongelantes se pueden clasificar en cuatro tipos de acuerdo con sus estructuras (Davies y Hew, 1990). Los AFP de tipo I son ricos en alanina con residuos de treonina y asparagina espaciados de manera regular y tienen una conformación en hélice  $\alpha$ . Los AFP de tipo II tienen un alto contenido característico en cisteína (8 %). Los AFP de tipo III son pequeños péptidos globulares (con aproximadamente una longitud de 64 aminoácidos). El grupo final, las glicoproteínas anticongelantes, tienen un motivo repetido de tripéptido que se une a un disacárido específico. Todos estos péptidos comparten la propiedad no coligativa de la depresión del punto de congelación y la inhibición del crecimiento del cristal de hielo. Estas características pueden encontrar aplicación en la alteración del estado del cristal de hielo de los productos congelados. Como es poco probable que la purificación de estos péptidos a partir de la sangre de los peces sea un procedimiento económicamente viable, se ha buscado un procedimiento para la producción a granel de los AFP usando la moderna biotecnología.

Un primer trabajo sobre la producción de péptidos anticongelantes en microorganismos se centró sobre la expresión de los AFP de tipo I en levaduras y *Escherichia coli* (Warren y col., 1993, McKown y col., 1991). Como *E. coli* tiene la capacidad de producir toxinas, no se considera generalmente esta bacteria como segura (GRAS), lo que plantea problemas para su uso en la producción de AFP destinados a aplicación en la industria de alimentos.

20 Se conocen cepas de levaduras similares a *Saccharomyces cerevisiae* que se consideran organismos GRAS, que a diferencia de *E. coli*, tienen la capacidad de segregar proteínas heterólogas en el medio de crecimiento que facilitan el procesamiento del producto corriente abajo. La levadura es, por tanto, un organismo huésped atractivo para la producción de una variedad de proteínas heterólogas (Romanos y col., 1992).

25 Los primeros informes de producción de AFP en levaduras se refieren a la acumulación intracelular de una fusión de una AFP de tipo I sintética con una proteína A truncada de *Staphylococcus aureus* (Warren y col., 1993). Se reivindicó que este péptido protegía a la levadura frente a los efectos deletéreos de la congelación. No se describe como tal la producción extracelular de AFP de tipo I. No se menciona nada al respecto de otros tipos de AFP.

30 En este laboratorio se han construido transformantes de la levadura que llevan un vector de la expresión que contiene un gen sintético procedente de una AFP natural de tipo I de solía roja (HPLC6) (Driedonks y col., 1995); y este se describe en la solicitud PCT WO 94/03617 abandonada en la actualidad. No fue demostrable la secreción del monómero de AFP activo por estas levaduras. El único camino para obtener una inhibición significativa de la actividad de recristalización del hielo fue expresar multímeros de los AFP de tipo I diseñados para permitir su procesamiento posterior por una proteasa endógena de levadura para dar como resultado monómeros activos (Driedonks y col., 1995). Esta hipótesis, aunque permite definitivamente la producción de AFP activa de tipo I, dio como resultado la secreción de formas heterogéneas parcialmente procesadas de las AFP multiméricas. El tratamiento posterior para obtener el péptido activo en forma de monómero se consideró inaceptable a efectos de una producción industrial. Además del esfuerzo y costes extra, dicha adición podría conducir también a problemas para obtener el permiso para la aplicación en artículos alimenticios. Esto se debe en primer lugar al uso de productos químicos para obtener monómeros activos y en segundo lugar se debe a la expresión de secuencias no nativas

Parece imposible por tanto usar un organismo de calidad alimentaria para expresar y segregar la AFP monomérica activa de una manera sencilla y eficiente proporcionando un procedimiento industrialmente aceptable aplicable en la producción de alimentos

45 En un intento por resolver los problemas planteados por la expresión de los AFP de tipo I en levaduras, intentamos expresar en levaduras los AFP de tipo III procedentes de la babosa vivípara americana. Los AFP de tipo III son pequeñas proteínas globulares, y consideramos que por esta razón podrían ser más adecuadas para la expresión en levaduras que los AFP de tipo I con hélice  $\alpha$ .

50 Se encontraron AFP de tipo III en la sangre del pez polar tal como en la babosa vivípara americana (*Macrozoarces americanus*) y el perro del norte (Davies y Hew, 1990). Se ha descrito el fraccionamiento de la sangre de la babosa vivípara americana revelando la presencia de 12 variedades diferentes de AFP de tipo III (Fig. 1, Hew y col., 1984, Davies y Hew, 1990). Estos péptidos son altamente homólogos, compartiendo al menos un 60 % de la identidad de aminoácidos, y la mutagénesis *in vitro* ha demostrado un clúster de residuos superficiales comunes a todas las variantes de AFP de babosa vivípara americana que se requieren para la unión con el hielo (Chao y col., 1994). La carga negativa de ácido glutámico (Glu) en las posiciones 23 y 26 parece estar implicada en la estabilidad térmica y en la actividad histerética térmica del polipéptido (Li y col., 1991). Los tres aminoácidos conservados siguientes, la asparagina (Asn) en la posición 14, la Treonina (Thr) en la 18 y la Glutamina (Gln) en la 44, parecen ser también los residuos clave en la actividad de unión al hielo de los AFP-III (Chao y col., 1994).

Nosotros manipulamos los AFP de tipo III en levadura de la babosa vivípara americana para expresar la variante HPLC-1, pero no fuimos capaces de obtener la secreción de un monómero suficientemente activo de AFP de tipo III. Esto no resolvió obviamente los problemas anteriormente mencionados.

De manera adicional determinamos que los AFP HPLC-1 de tipo III producidos por la levadura presentaban una actividad específica inesperadamente baja cuando se la comparaba con la preparación de AFP aislada de sangre de babosa vivípara americana. Esta baja actividad podría ser debida posiblemente al incorrecto plegado del péptido o debido a una actividad específica inherentemente más baja de la variante HPLC-1. Esto, desde luego, no parece prometedor para continuar esta línea de investigación para producir más AFP activas que aquellas encontradas en la solla roja.

También hemos fraccionado los AFP derivados de la sangre de babosa vivípara americana en diversas fracciones HPLC y analizado su actividad de recristalización con el fin de determinar que otra fracción de HPLC-1 podría ser útil potencialmente para nuestra aplicación deseada. La HPLC12 mostró ser la única fracción de las 12 fracciones de los AFP de tipo III activa en la inhibición de la recristalización a las concentraciones ensayadas. De esta manera determinamos que la HPLC-12 podría ser de interés si la manipuláramos para resolver los problemas en la producción recombinante del mismo que habíamos encontrado para los AFP de tipo I y los AFP HPLC-1 de tipo III.

De manera bastante inesperada a la vista de los anteriores experimentos con los AFP de tipo I y los AFP de tipo III se encontró posteriormente que la expresión del ácido nucleico de la levadura que codificaba la secuencia de aminoácidos determinada para los AFP HPLC-12 de tipo III conduce a un producto que se expresa y secreta en forma de monómero y no presenta actividad reducida. De esta manera estaba disponible un procedimiento de producción eminentemente adecuado usando tecnología de ADN recombinante para producir AFP activa pura.

Lo que se descubrió de hecho de manera adicional fue que la HPLC-12 recombinante segregada por la levadura en forma de monómero puede presentar tal cual la elevada actividad del péptido anticongelante de una mezcla de los AFP aislados a partir de sangre de babosa vivípara americana. Esta actividad anticongelante es al menos el doble que la de los AFP de tipo I de la solla roja. De manera adicional el producto es más activo de esta manera en los ensayos de recristalización y mucho más adecuado para las aplicaciones deseadas que las otras AFP.

Se conocía ya la composición de aminoácidos, las secuencias y las secuencias de ácido nucleico de diversas AFP de tipo III que se producen en la naturaleza. Davies y Hew (1990) presentan una revisión de las mismas y hacen referencia a los artículos de Li y col. de 1985 y Hew y col., de 1988 para las secuencias de HPLC- 1, 4, 5-7, 9, 11 y 12 tal como se han determinado para la babosa vivípara americana sobre la base de clones de ADNc del ADN genómico de pescado en fagos. En Protein Science en 1994 Chao, H y col., describen cómo una isoforma de los AFP HPLC-12 de tipo III se sintetiza de manera sintética y se expresa en *E. coli* para estudios de RMN bidimensionales para ayudar a comprender las relaciones de estructura / función en proteínas anticongelantes, y para definir los motivos de la unión con el hielo. El ácido nucleico se muta a continuación con el fin de producir un polipéptido mutante de los AFP de tipo III, siendo dichos mutantes de prolina. Se comparó el valor de la histéresis térmica de la HPLC-12 recombinante no mutada con los AFP aislados de babosa vivípara americana, es decir, los AFP de tipo III. Se describieron los perfiles de actividad como siendo indistinguibles dentro de los límites de los errores estándares. No se mencionó comparación con otros tipos de AFP. No se proporcionó indicación de un valor anormalmente alto de histéresis térmica, de hecho, no se dio valor a todo. Nada se indica con respecto a cualquier efecto sobre las propiedades de recristalización. Nosotros señalamos por la presente que las actividades de histéresis térmica no se ligan a las propiedades de recristalización. Los valores de histéresis térmica son indicativos de la fuerza de la unión y no proporcionan una medida de la actividad anticongelante similar a la del ensayo de recristalización. Se conocen ejemplos de proteínas que presentan valores altos de histéresis pero no efectos sobre la recristalización y viceversa que ilustran la ausencia de correlación.

Fue completamente inesperada la elevada actividad de los AFP de la HPLC-12 recombinante a la vista de los resultados obtenidos para la HPLC-1 recombinante y a la vista de lo que se ha divulgado en publicaciones relacionadas con los AFP. Se proporcionan en la Tabla 1 los valores de histéresis térmica de las fracciones de AFP de tipo III obtenidos mediante el fraccionamiento en columna Shephadex de los AFP de tipo III procedentes de sangre de babosa vivípara americana reseñados en el artículo de Hew y col., 1984, usando los valores de los AFP de solla (= Tipo I) y los AFP del cuervo de mar (Tipo II). Estos valores se derivaron de fracciones que provienen de la sangre de especies relevantes, no a través de tecnología del ADN recombinante. Aparecieron únicamente ligeras diferencias en las actividades entre los AFP, siendo la más activa la QAE-A. QAE-A fue una de las 5 variantes distintas que se pudieron separar en una columna QAE Sephadex y mostraron posteriormente que se derivaban de HPLC-12. Sin embargo, se describen las diferencias tan ligeras que entran dentro de la desviación debida a las variaciones de medida. Las diferencias en los valores de histéresis térmica se rechazaron de manera clara por irrelevantes por Hew y col., en el mismo artículo. Manifestaron que "la mayor parte de los AFP de babosa vivípara americana presentaron histéresis térmica comparable con la encontrada para otras AFP y AFP conocidas". En la bibliografía posterior no se mencionan los valores de histéresis térmica para los diversos tipos o se dan comparaciones entre el Tipo I y el Tipo III. Nada se enseña o sugiere acerca de los efectos de la recristalización de las diversas fracciones. Por tanto, no se esperaba que ninguna AFP de tipo III única podría presentar una actividad específica más alta para la inhibición del crecimiento del cristal de hielo que los AFP de la solla roja. No se ha

descrito o sugerido también que la HPLC-12 presenta una actividad mucho más alta que cualquier tipo de péptido de AFP I u otro tipo de péptido de AFP III.

Para ensayar si fue mayor la actividad AFP de los HPLC-12 de tipo III fraccionamos la preparación de AFP de babosa vivípara americana derivada de la sangre mediante HPLC, y ensayamos los componentes péptidos individuales respecto de su capacidad para inhibir el crecimiento de cristales de hielo. Determinamos que la variante HPLC-12 tenía la actividad específica más alta. Los otros componentes no mostraron actividad detectable a una concentración equivalente de 100 mg de AFP de tipo III de pescado por ml.

De esta manera hemos encontrado un procedimiento para preparar un polipéptido puro de calidad alimentaria que presenta casi el doble de actividad AFP que la de los AFP de tipo I. Debido a que esta se puede segregar en forma de monómero en contraste con los AFP de tipo I, esto la hace ideal para la producción a gran escala, ya que requiere mucho menos procesamiento corriente abajo que los AFP de tipo I producidos mediante tecnología recombinante. De manera adicional, la expresión en forma de monómero significa que se puede producir un producto casi idéntico al péptido que se produce de manera natural en la sangre de la babosa vivípara americana. Dicho producto se puede admitir de manera más fácil para uso en artículos alimentarios debido a su semejanza cercana a los AFP que se produce de manera natural en el organismo de calidad alimentaria nativo, la babosa vivípara americana.

La presente invención nos permite producir por primera vez, a gran escala y bajo coste y con gran facilidad, AFP recombinante de tipo III de tipo HPLC-12 que tiene una actividad específica inherentemente más elevada que los AFP de tipo I de solía roja. Los péptidos anticongelantes de tipo III de acuerdo con la invención son los candidatos más prometedores para la aplicación en productos alimenticios destinados a congelación, tales como helados y masa congelada, y otros productos congelados de panadería debido a sus actividades altamente específicas inhibitorias de la recristalización.

Una ventaja adicional se basa en el hecho que la secreción del producto de expresión como polipéptido activo, preferentemente en forma de monómero, se puede producir ahora *in situ* en el procedimiento de producción de alimentos, eliminando por tanto el requisito de adición de los AFP tal cual. Puede llegar a ser posible ahora producir productos de fermentación usando una levadura capaz de segregar un polipéptido que corresponde de manera sustancial a los AFP HPLC-12 de tipo III en el procedimiento de fermentación, por lo cual tiene lugar la producción *in situ* del polipéptido que corresponde de manera sustancial con los AFP HPLC-12 de tipo III sin que se necesiten etapas adicionales, tales como la purificación del polipéptido y la adición posterior del mismo en el procedimiento de producción de alimentos. También es ahora posible el desarrollo de plantas, frutas o vegetales y animales transgénicos o partes de los mismos con mejores propiedades de congelación debido a la expresión *in situ* de un polipéptido que corresponde de manera sustancial con los AFP HPLC-12 de tipo III

## **2. Descripción detallada de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona una levadura que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica AFP, siendo dicha levadura capaz de expresar dicha secuencia de ácido nucleico, no estando dicha construcción de ADN presente en la levadura nativa y comprendiendo dicha construcción de ADN, en el orden siguiente:

(a) un promotor fuerte activo en la levadura,

(b) un codón de iniciación ATG,

(c) al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido AFP HPLC 12 de tipo III que tiene (i) la secuencia de aminoácidos de AFP HPLC 12 de tipo III que se muestra en la Figura 1 o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de más del 80 % con la secuencia de aminoácidos de AFP HPLC 12 de tipo III que se muestra en la Figura 1, con la condición de que un polipéptido que tiene dicha secuencia de aminoácidos exhiba una actividad de inhibición de la recristalización en hielo de al menos la de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de AFP HPLC 12 de tipo III que se muestra en la Figura 1, estando dicha secuencia de aminoácidos en el marco de lectura del codón de iniciación ATG.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para producir un polipéptido AFP HPLC 12 de tipo III, comprendiendo el procedimiento proporcionar una levadura de acuerdo con el primer aspecto de la invención y cultivar la levadura en condiciones en las que se produce o se induce la expresión del polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención se proporciona una levadura recombinante que contiene y/o secreta un polipéptido que tiene (i) la secuencia de aminoácidos del AFP HPLC 12 de tipo III que se muestra en la Figura 1 o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de más del 80 % con la secuencia de aminoácidos de AFP HPLC 12 de tipo III que se muestra en la Figura 1, con la condición de que un polipéptido que tiene dicha secuencia de aminoácidos exhiba una actividad de inhibición de la recristalización en hielo de al menos la de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de AFP HPLC 12 de tipo III que se muestra en la

Figura 1.

También se divulga en el presente documento un procedimiento para preparar un producto mejorado, residiendo la mejora en la modificación de los procedimientos de crecimiento del cristal de hielo que tienen influencia sobre las características de tamaño y forma del hielo de manera particular en el recrecimiento del mismo, por ejemplo minimizando el daño potencial por congelación, por ejemplo, para evitar o inhibir la recrystalización del hielo del producto tras congelamiento, comprendiendo dicho procedimiento la adición de un polipéptido o proteína con una secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial a la de los AFP HPLC-12 de tipo III, que presentan una actividad de los AFP mayor que los AFP de tipo I de la solla roja al producto no mejorado o a un ingrediente o mezcla normalmente usado para preparar el producto no mejorado, dicha adición de polipéptido o proteína recombinante se produce en cantidad suficiente para afectar al crecimiento del cristal de hielo. El producto puede ser un producto alimenticio o un material biológico. El material biológico puede, por ejemplo, ser un órgano o tejido animal o ser un material de planta. De manera particular se puede añadir el polipéptido recombinante. Preferentemente el polipéptido tendrá la categoría de calidad alimentaria con el fin de proporcionar el producto final con categoría de calidad alimentaria. Se prefiere un procedimiento en el que el producto es un producto alimenticio. Una forma de realización específica de un polipéptido adecuado es una levadura AFP tal como se ilustra en los Ejemplos. Un procedimiento de producción adecuado dirigido a la producción de un producto mejorado que presente propiedades de congelación mejoradas puede comprender la adición de una AFP obtenida en un procedimiento de producción de polipéptido nuevo que se elucida de cualquier forma en la descripción.

El término "un polipéptido o una proteína con una secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial a la de los AFP HPLC-12 de tipo III" comprende una secuencia de aminoácidos igual a la secuencia de aminoácidos de la HPLC-12 aislada de babosa vivípara americana y comprende también una secuencia de aminoácidos que difiere por uno o dos aminoácidos de la secuencia de aminoácidos conocida pero que sigue codificando un polipéptido con la misma actividad de AFP que la proteína nativa. Las mutaciones o diferencias pueden no estar en aminoácidos conocidos por ser esenciales para la actividad del polipéptido. Los residuos de prolina, preferentemente por tanto, no se borran o se reemplazan. Preferentemente, cualquier diferencia en la secuencia de aminoácidos son mutaciones silenciosas, por lo que las sustituciones son sustituciones conservativas que no alteran el perfil hidropático del polipéptido y de esta manera presumiblemente no influyen de manera grave la estructura y actividad del polipéptido, es decir un aminoácido con una cadena secundaria hidrófoba se intercambia únicamente preferentemente por otro aminoácido con una cadena secundaria hidrófoba y un aminoácido con una cadena secundaria hidrófila se reemplaza únicamente por otro aminoácido con una cadena secundaria hidrófila. La homología del aminoácido entre HPLC-12 y HPLC-1 es inferior al 60 %. Se puede esperar que una secuencia de aminoácidos que presente homología por encima del 80 % sea representativa de un polipéptido que presente propiedades similares a la HPLC-12, y de esta manera se considera también que corresponde de manera sustancial a la HPLC-12. De manera adicional, el polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos presentaría al menos la actividad de los AFP de los AFP de tipo I de la solla roja, y preferentemente al menos la actividad de los AFP de la HPLC-12 nativa. La actividad de los AFP se puede determinar llevando a cabo comparaciones con ensayos de recrystalización usando una serie de diluciones del polipéptido que se va a determinar y cantidades y diluciones iguales de los AFP de tipo I y/o la HPLC-12 nativa, tal como las que se obtienen de la sangre de la babosa vivípara americana. En los Ejemplos se ilustra la manera en la que se puede llevar a cabo y evaluar dicho ensayo de recrystalización. Se puede considerar que un polipéptido que presenta alguna o numerosas de las características mencionadas anteriormente corresponde de manera sustancial a la HPLC-12.

Un procedimiento para preparar un producto mejorado, residiendo la mejora en propiedades mejoradas debidas a la modificación de los procedimientos de crecimiento del cristal de hielo que tienen influencia sobre las características de tamaño y forma del hielo, en particular el recrecimiento del mismo, minimizando por ejemplo el daño potencial por congelación, evitando o inhibiendo por ejemplo la recrystalización del hielo del producto tras congelamiento, comprendiendo dicho procedimiento la adición de un organismo huésped capaz de la expresión de un polipéptido o proteína recombinante de calidad alimentaria con una secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial a la de los AFP HPLC-12 de tipo III en un producto no mejorado como tal o en un ingrediente o mezcla usados normalmente para preparar el producto no mejorado y someter posteriormente el organismo huésped a condiciones tales que la secuencia de ácido nucleico que codifica los AFP de tipo III de tipo HPLC 12 se expresa en el producto o ingrediente o mezcla llevando a cabo un procedimiento de producción de un polipéptido como se divulga en otra parte de la descripción y se divulga también en el presente documento de manera adicional a las etapas que se toman normalmente para preparar el producto no mejorado. El producto puede ser de manera adecuada un producto alimenticio o un material biológico. El material biológico puede ser, por ejemplo, un órgano o tejido animal o ser un material de planta. De manera particular se puede añadir el polipéptido recombinante. Preferentemente el polipéptido será de categoría de calidad alimentaria con el fin de proporcionar el producto final con categoría de calidad alimentaria. Se prefiere un procedimiento en el que el producto que se va a mejorar es un producto alimenticio. Tal como se ilustra en los Ejemplos, una forma de realización específica de un polipéptido adecuado para un procedimiento de acuerdo con la invención es una AFP de levadura. El organismo huésped se puede o bien destruir o dañar durante o después del procedimiento de producción con el fin de liberar los AFP del polipéptido o proteína en la mezcla o ingrediente del producto o en el producto per se. Dicha destrucción o daño se puede producir de numerosas maneras conocidas por una persona experta en la técnica, por lo cual se deberá tener cuidado en no llevar el procedimiento bajo condiciones demasiado drásticas para evitar pérdidas de actividad de los

AFP del polipéptido o proteína. De manera alternativa se puede usar como tal en el procedimiento de producción un organismo huésped capaz de segregar el polipéptido o proteína de los AFP en el ingrediente o mezcla. Por ejemplo, el organismo huésped puede ser una levadura de panadería en un procedimiento para producir un producto alimentario tal como un producto de panadería. El procedimiento de producción se puede llevar a cabo como el usual siendo la única diferencia la adición de una levadura diferente, es decir, una levadura que comprende un constructo de ADN que permita la expresión y secreción de un polipéptido o proteína que corresponde de manera sustancial a los AFP HPLC-12 de tipo III en la masa previa a o durante la cocción permitiendo de esta manera la producción de producto amasado o cocido con propiedades de congelamiento mejoradas. De manera análoga se divulgan los procedimientos en los que se usan bacterias tales como bacterias de ácido láctico. Se divulgan también el procedimiento de fabricación de queso y de fabricación de yogurt u otros procedimientos de producción de alimentos que requieren fermentación.

De manera ventajosa, se puede llevar a cabo un procedimiento de producción para mejorar productos, como se divulga en el presente documento, sin requerir la adición de proteasas o productos químicos tras el polipéptido o proteína recombinante con la secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial con los AFP HPLC-12 de tipo III que se ha expresado o segregado para obtener el polipéptido o proteína de AFP en forma de producto monomérico.

Se divulga en el presente documento el uso de un polipéptido o proteína correspondiendo la secuencia de aminoácidos de manera sustancial con los AFP HPLC-12 de tipo III, como se ha divulgado anteriormente, como aditivo en un producto para la mejora de dicho producto, residiendo dicha mejora en propiedades mejoradas de modificación de los procedimientos de crecimiento del cristal de hielo que tienen influencia en las características de tamaño y forma o hielo, en particular en el recrecimiento del mismo minimizando, por ejemplo, el daño potencial por congelamiento, evitando o inhibiendo por ejemplo la recrystalización del hielo del producto tras el congelamiento, produciéndose dicho uso de una manera conocida per se para los AFP para obtener mayor actividad específica anticongelante que se puede obtener con los AFP de la solla roja. Preferentemente el producto será un producto alimenticio. El producto puede ser de manera adecuada un material biológico. La proteína o polipéptido puede ser una proteína o polipéptido recombinante.

Se prefiere que en el procedimiento o uso para la mejora de productos el producto sea un producto destinado a ser congelado. Para los productos alimenticios el helado es un ejemplo adecuado. Tal como se ha indicado anteriormente un producto amasado o de panadería son también de interés.

Los productos alimenticios que comprenden polipéptidos o proteínas recombinantes de calidad alimentaria, correspondiendo la secuencia de aminoácidos de manera sustancial con los AFP de tipo II de tipo HPLC 12, como se divulgó anteriormente, como aditivos en un producto alimenticio para la mejora de dicho producto, residiendo dicha mejora en propiedades mejoradas de modificación de los procedimientos de crecimiento del cristal de hielo que tienen influencia sobre las características de tamaño y forma del hielo, en particular en el recrecimiento del mismo, minimizando por ejemplo el daño potencial por congelamiento, evitando o inhibiendo por ejemplo la recrystalización del hielo del producto, como se divulga en el presente documento. Dicho producto alimenticio no comprende organismos comestibles presentes en la naturaleza como la babosa vivípara americana que comprende meramente secuencias que codifican un polipéptido o proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la secuencia de aminoácidos de la HPLC-12 de la babosa vivípara americana en la forma y número en la que aparecen de forma natural en la babosa vivípara americana. Una categoría deseable de productos, divulgada en el presente documento, no son productos animales. Otra categoría adecuada es la categoría de productos manufacturados. Los productos de plantas son también ejemplos adecuados de los productos divulgados en el presente documento. Los productos alimenticios divulgados en el presente documento se pueden obtener mediante un procedimiento o uso para la mejora de un producto, como se han descrito anteriormente.

De manera particular se divulga también un producto alimenticio que comprende un organismo huésped recombinante de calidad alimentaria, que tiene una tolerancia mejorada al congelamiento, residiendo dicha mejora en propiedades mejoradas de modificación de los procedimientos de crecimiento del cristal de hielo, que tienen influencia sobre las características de tamaño y forma del hielo, en particular el recrecimiento del mismo, minimizando por ejemplo el daño potencial por congelamiento evitando o inhibiendo por ejemplo la recrystalización del hielo del producto tras congelamiento, conteniendo dicho organismo huésped de calidad alimentaria y/o siendo rodeado por un polipéptido o proteína recombinante de calidad alimentaria con una secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial con los AFP HPLC-12 de tipo III, como se divulgó anteriormente, y/o capaces de expresar y/o segregar dicho polipéptido o proteína antes del congelamiento.

Dicho organismo huésped recombinante de calidad alimentaria también se divulga. También se divulga un organismo huésped recombinante de calidad alimentaria capaz de la expresión de al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica los AFP, estando comprendida dicha secuencia de ácido nucleico en un constructo de ADN, no estando presente dicho constructo de ADN en el organismo huésped nativo y comprendiendo dicho constructo de ADN en el orden dado

(a) un promotor activo, fuerte, opcionalmente inducible, en el organismo huésped,

(b) un códon de inicio ATG, que puede estar presente en una secuencia señal de ADN opcional capaz de segregar la proteína producida mediante el organismo huésped durante la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica los AFP de (c) a continuación, cuya secuencia señal puede ser homóloga o heteróloga con la secuencia de ácido nucleico que codifica los AFP y está en el marco de lectura con el códon de inicio ATG,

5 c) al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial con la de la AFP de tipo III-proteína HPLC-12, dicha secuencia de ácido nucleico en el marco de lectura con el códon de inicio ATG, y de manera opcional

(d) un códon de detención enlazado con el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica los AFP.

10 También se divulga un procedimiento para producir polipéptidos o proteínas recombinantes que exhiben crecimiento de cristales en hielo y actividad modificadora de la forma, los denominados péptidos anticongelantes (AFP) recombinantes, que exhiben una actividad anticongelación específica superior a la de la AFP de la solla roja, mediante

15 1) cultivo de un organismo huésped de calidad alimentaria en las condiciones en las que se produce o se induce la expresión de al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica AFP, estando comprendida dicha secuencia de ácido nucleico en una construcción de ADN, no estando dicha construcción de ADN presente en el organismo huésped nativo y comprendiendo dicha construcción de ADN en el orden dado

(a) un promotor fuerte, opcionalmente inducible, activo en el organismo huésped,

20 (b) un codón de iniciación ATG que puede estar presente en una secuencia señal de ADN opcional capaz de secretar la proteína producida por el organismo huésped durante la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica AFP de (c) a continuación, cuya secuencia señal puede ser homóloga o heteróloga con la secuencia de ácido nucleico que codifica AFP y está en el marco de lectura con el codón de iniciación ATG,

(c) al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de ácido nucleico correspondiente sustancialmente a la de la proteína AFP HPLC 12 de tipo III, estando dicha secuencia de ácido nucleico en el marco de lectura con el codón de iniciación ATG, y, opcionalmente,

25 (d) un codón de terminación unido al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica AFP.

El procedimiento puede comprender adicionalmente de manera opcional recoger el producto expresado de la secuencia de ácido nucleico que codifica los AFP obtenidos del mismo mediante procesamiento adicional de una manera conocida per se. Con el fin de obtener la secreción del producto de expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial con la de los Proteína AFP HPLC-12 de tipo III del constructo de ADN puede comprender de manera adicional una secuencia señal para el organismo huésped que permite la secreción por el huésped durante el cultivo del huésped. El organismo huésped es de manera adecuada un microorganismo. Los microorganismos de calidad alimentaria adecuados son hongos tales como levaduras y bacterias tales como bacterias de ácido láctico. Las células de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fragilis* y *Saccharomyces lactis* son ejemplos de una célula huésped de levadura adecuada. Una persona experta en la técnica de los procedimientos de fermentación en la producción de alimentos conocerá que células de levadura son adecuadas y que sistemas de transformación y expresión están disponibles (Romanos y col., Campbell y Duffus). Las bacterias de ácido láctico *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* son también ejemplos de organismos huéspedes bacterianos adecuados de los que se conocen muchas cepas y para los que existen sistemas adecuados de transformación y expresión como conoce cualquier persona experta en la técnica de trabajar con ADN recombinante de las bacterias asociadas con productos lácteos (Gasson, 1993). La FDA tiene una lista de organismos de calidad alimentaria que está disponible al público. Una persona experta en la técnica está enterada de los organismos que se consideran de calidad alimentaria, es decir, que tienen categoría de GRAS (reconocidos de manera general como útiles). De manera particular son adecuados los organismos asociados con la fermentación de productos alimenticios y la producción de productos lácteos.

45 La frase "una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial con la de los Proteína AFP HPLC-12 de tipo III" comprende cualquier ácido nucleico que codifica de manera exacta la secuencia de aminoácidos de la HPLC-12 nativa de babosa vivípara americana. Dicha secuencia de ácidos nucleicos puede diferir debido a la degeneración del código genético, es decir, el hecho que diferentes codones de ácido nucleicos codifican el mismo aminoácido. De manera adicional se divulga también una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos, que difiere por uno o dos aminoácidos de la secuencia conocida de aminoácidos, pero codifica además un polipéptido con la misma actividad de los AFP tal como la proteína nativa. Las mutaciones o diferencias pueden no estar en aminoácidos conocidos por ser esenciales para la actividad del polipéptido. Los residuos de prolina son por tanto preferentemente no borrados o reemplazados. Preferentemente, cualquier diferencia en la secuencia de aminoácidos son mutaciones silenciosas, por lo que las sustituciones son sustituciones conservativas que no alteran el perfil hidropático del polipéptido y de esta manera presumiblemente no influyen de manera grave la estructura y actividad del polipéptido, es decir, un aminoácido con una cadena secundaria hidrófoba únicamente se intercambia preferentemente por otro aminoácido con una

cadena secundaria hidrófoba y un aminoácido con una cadena secundaria hidrófila únicamente se reemplaza por otro aminoácido con una cadena secundaria hidrófila. La homología del aminoácido entre HPLC-12 y HPLC-1 es inferior al 60 %. Se puede esperar que una secuencia de aminoácidos que presenta una homología por encima del 80 % sea representativa de un polipéptido que presente propiedades similares con HPLC-12 y de esta manera se considera que corresponde de manera sustancial con HPLC-12. La frase “que corresponde de manera sustancial con” incluye de esta manera las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos que presentan más de un 80 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la HPLC-12 nativa. De manera adicional el polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos deberá presentar al menos la actividad de los AFP de tipo I de solla roja y preferentemente al menos la actividad de los AFP de la HPLC-12 nativa. La actividad de los AFP se puede determinar llevando a cabo comparaciones con los ensayos de recristalización usando una serie de diluciones del polipéptido que se va a determinar y los AFP de tipo I y/o HPLC-12 nativos obtenidos de la sangre de babosa vivípara americana obtenidos en las mismas diluciones tal como el polipéptido que se va a ensayar, es decir, la comparación del mismo p/v de polipéptido o proteína. Se ilustra en los Ejemplos la manera en la que dicho ensayo de recristalización se puede llevar a cabo y evaluar. Se puede considerar que un polipéptido que presenta cualquiera o numerosas de las características anteriormente mencionadas corresponde de manera sustancial con la HPLC-12.

Se prefiere que el constructo de ADN y las condiciones de cultivo del huésped sean tales que este segregue un polipéptido monomérico con una secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial con la proteína AFP HPLC-12 de tipo III. El constructo de ADN no expresara de esta forma preferentemente en tándem un dímero o multímero de una secuencia de aminoácidos que corresponda de manera sustancial con la de la proteína AFP HPLC-12 de tipo III. la producción de dímeros o multímeros requerirá etapas de procesamiento corriente abajo adicionales o puede impedir la secreción de un polipéptido activo. Preferentemente el constructo de ADN comprenderá por tanto una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial con la de la proteína AFP HPLC-12 de tipo III en forma monomérica. De manera natural, el constructo de ADN puede comprender múltiples copias de la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial con la de la proteína AFP HPLC-12 de tipo III en forma monomérica en tándem.

También se prefiere que un constructo de ADN en el que la secuencia de ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial con los AFP HPLC-12 de tipo III comprenda los codones preferentes del organismo huésped del procedimiento. Esto se prefiere con respecto al hecho que la eficiencia de la translación se incrementa evitando ciertos codones, de manera particular en los organismos huéspedes. Los usos de los codones preferentes difieren en los procariotas, en levaduras y plantas del uso del códon encontrado en solla roja. Por ejemplo, los codones GCA, GCG, y GCT se cuentan en conjunto para más del 65 % de los codones de alanina de genes conocidos de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *Z. mays*, por cuanto cuentan menos del 25 % de los codones de alanina de un pescado tal como la solla roja. De manera similar este es el caso para los codones de treonina ACA, ACG y ACT (PCT/US90/02626). Se puede derivar el uso del códon tal como se prefiere por la bacteria del ácido láctico y las levaduras a partir de la bibliografía específica para estos grupos de microorganismos. Una persona experta en la técnica de la tecnología del ADN recombinante con estos organismos de expresión particular, conocerá que codones se prefieren.

Cuando el organismo huésped de la invención es una levadura, una forma de realización preferente del constructo de ADN comprenderá la presecuencia de ADN del factor de acoplamiento  $\alpha$  de *S. cerevisiae* como secuencia señal. Esto puede comprender también en una forma de realización adicional la presecuencia del factor de acoplamiento  $\alpha$  de *S. cerevisiae* entre la presecuencia y la secuencia de ácido nucleico que codifica los AFP, por lo que la presecuencia, la presecuencia y la secuencia de ácido nucleico que codifica los AFP están en el mismo marco de lectura. De manera alternativa, cuando el organismo huésped es una levadura, una forma de realización preferente del constructo de ADN comprenderá la secuencia señal invertida de *S. cerevisiae* precediendo la secuencia de ácido nucleico que codifica los AFP.

Cuando el organismo huésped de la invención es una levadura, una forma de realización preferente del constructo de ADN comprenderá el promotor GAL7 inducible o un promotor GAPDH constitutivo de *Saccharomyces cerevisiae*. Las siguientes referencias se citan como ejemplos que proporcionan sistemas de transformación posibles o elementos de los mismos: para las levaduras Campbell y Duffus, para plantas el PCT/US90/0626 y van den Elzen y col., (1985) y para animales Hanahan, (1988).

Antes del asunto de la invención se había producido un polipéptido o proteína recombinante de calidad alimentaria no aislado y purificado de manera sustancial, sustancialmente equivalente a los AFP HPLC-12 de tipo III que presenta dicha actividad alta de los AFP. Por vez primera se ha producido un polipéptido o proteína recombinante de calidad alimentaria sustancialmente aislado sustancialmente equivalente a los AFP HPLC-12 de tipo III que presentan mayor actividad que la de la solla roja. Se divulga en el presente documento la provisión de polipéptidos o proteínas de calidad alimentaria recombinantes sustancialmente puros y aislados que presentan propiedades mejoradas de modificación de los procedimientos de crecimiento del cristal de hielo que tienen influencia sobre las características de tamaño y forma del hielo, en particular en el recrecimiento del mismo, minimizando por ejemplo el daño potencial por congelamiento, evitando o inhibiendo por ejemplo la recristalización del hielo tras congelamiento,



denominados péptidos anticongelantes recombinantes (AFP) que presentan una actividad de los AFP mayor que la de una cantidad igual de AFP de tipo I de solía roja, teniendo dicho polipéptido o proteína una secuencia de aminoácidos que corresponde de manera sustancial con la de la proteína AFP HPLC-12 de tipo III. También se divulgan dichos polipéptidos recombinantes, y en particular los polipéptidos o proteínas recombinantes presentan la actividad anterior modificada tal como la actividad de inhibición del cristal de hielo, los denominados péptidos anticongelantes recombinantes (AFP) que presentan una actividad anticongelante específica mayor que la de los AFP de la solía roja se pueden preparar mediante un procedimiento tal como se describió anteriormente.

## 2. Materiales y Procedimientos

### 2.1 Cepas y condiciones de crecimiento

Se usó la cepa JM109 de *E. coli* (*endA1, recA1, syrA96, thi, hsdR17, rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup> relA1 supE44*, Yanish-perron, y col., 1985) para la amplificación de los plásmidos. Se usó la cepa SU50 de *S. cerevisiae* (*MAT<sup>+</sup>, cir<sup>+</sup>, leu2, his4, can1*; Verbakel, 1991) para la transformación de los plásmidos de integración multicopia. Se seleccionaron transformante de *E. coli* sobre placas de agar Luria que contenían 100 µg de ampicilina ml<sup>-1</sup> Sambrook y col. (1989). Las cepas de levadura se mantuvieron sobre placas de YNB selectivo (Difco Yeast Nitrogen Base al 0,67 % sin aminoácidos, glucosa al 2 %, agar al 2 %) suplementadas con los aminoácidos esenciales (histidina 20 µg/ml, uracilo 20 µg/ml). Se usó el mismo medio líquido para los precultivos, que crecieron durante 48 horas a 30 °C y se diluyeron 1:10 en medio YP (extracto de levadura Difco al 1 %, peptona Difco al 2 %) conteniendo galactosa al 5 % para la inducción del promotor *GAL7*.

### Plásmidos

Se proporcionan en la tabla 1 los detalles relevantes de la AFP-III que contiene plásmidos.

### Transformación

Se llevó a cabo la transformación de JM109 por Chung y col., (1989). Se llevó a cabo la transformación de las cepas de levadura mediante electroporación, principalmente como han descrito Becker y col., (1991). Se recuperaron los transformantes sobre placas de YNB selectivo. Una persona experta en la técnica autentificará que son posibles diversos procedimientos de transformación. Las alternativas dependen del organismo que se va a transformar y están bien documentadas en diversos manuales tales como Sambrook y col., (1989) y Campbell y Duffus (1988).

### Procedimientos de biología molecular

Se aplicaron enzimas de restricción y enzimas de modificación del ADN tal como recomendó el suministrador.

Se sintetizaron los oligonucleótidos en un sintetizador de ADN Applied Biosystems 380A y se purificaron mediante procedimientos normalizados.

### Purificación de la AFP-III

Se purificaron los AFP III de babosa vivípara americana, *Macrozoarces americanus* a partir de la sangre del pescado capturado en las aguas marinas costeras de Newfoundland. Se preparó la muestra de AFP III mediante centrifugación a partir del suero coagulado del pescado tal como se ha descrito por Hew y col., (1984).

### Cromatografía de intercambio catiónico

Se llevó a cabo la cromatografía de intercambio catiónico sobre una columna Mono S (HR5/5, Pharmacia Biotech) en el sistema SMART (Pharmacia Biotech). La muestra tampón fue Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM (Merck) y se llevó a cabo la elusión con un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M (Merck), con un flujo de 100 µl/min. Se detectaron los péptidos usando el µ Peak Monitor (Pharmacia Biotech) a 214 y 280 nm. Se recogieron las fracciones monitorizando la señal de 214 nm usando el recolector de fracciones del sistema SMART integrado, se ajustó la temperatura del sistema a 15 °C

### Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

Se llevó a cabo la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) usando una columna µRPC C4/C18 SC2.1/10 (Pharmacia Biotech) sobre el sistema SMART (Pharmacia Biotech). Se aplicó la muestra a la columna en ácido trifluoroacético al 0,06 % (TFA, Merck) en agua Milli Q (Solvente A) y se eluyó usando acetonitrilo al 80 % (Merck), TFA en agua Milli Q al 0,054 % (Solvente B). Se programó el gradiente normalizado usado como sigue: 0 min. solvente A al 100 %, 5 min. solvente A al 100 %, 10 min. solvente A al 65 %, 50 min solvente A al 40 %, 55 min. solvente A al 0 %, 57,5 min. solvente A al 0 % y a 58 min. solvente A al 100 % a un flujo de 100 µl/min. Se detectaron los péptidos con el µ Peak Monitor (Pharmacia Biotech) a tres longitudes de onda 214, 256, y 280 nm. Se recogieron los picos monitorizando la señal de 214 nm usando el recolector de fracciones del sistema SMART

integrado, se ajustó la temperatura del sistema a 20 °C.

Se separaron las isoformas 1, 2 y 3 de los AFP-III por medio de un gradiente modificado: 0 min. solvente A al 100 %, 10 min. solvente A al 60 %, 35 min. solvente A al 55 %, 36 min solvente A al 45 %, 45 min. solvente A al 45 %, 46 min solvente A al 0 %, 50 min solvente A al 0 %, 50,1 min solvente A al 100 % y 60 min solvente A al 100 %. Los tampones y todos los detalles del sistema SMART son los mismos que aquellos usados con el gradiente normalizado.

#### **Electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil-sulfato de sodio**

Se hicieron correr geles de poliacrilamida Tricine al 16 % (Novex) sobre una celda de electroforesis Xcell (Novex) de acuerdo con el protocolo de los suministradores. La muestra tampón fue de Novex y estuvo constituida por 3 ml de TRIS-HCl 3,0 M, 2,4 ml de Glicerol, 0,8 g de SDS, 1,5 ml de Azul G de Coomassie al 0,1 %, 0,5 ml de Rojo fenol al 0,1 % y β-mercaptoetanol al 5 %, se ajustó el volumen final a 10 ml con agua destilada, pH = 8,45). El tampón que se hizo correr fue también de Novex y contuvo 12,1 gramos de TRIS, 17,9 gramos de Tricine y 1 gramo de SDS en un volumen total de 1 litro de agua destilada, el valor del pH fue aproximadamente pH 8,3. Se coloreó el gel usando Azul Brillante de Coomassie R250 al 10 % (Bio-RAD), se disolvió en una solución de Etanol al 40 % (Merck), Ácido Acético al 10 % (Merck) y agua destilada al 50 %, se calentó esta solución en un microondas durante 45 segundos, a continuación se tñeron los geles durante 15 minutos en un sacudidor rotatorio. Se destñeron los geles con una solución de Etanol al 10 % (Merck), Ácido Acético al 7,5 % (Merck) y agua destilada al 82,5 %. En el caso de la determinación del peso molecular se usaron marcadores preteñidos MMARK 12 (Novex)

#### **Inmunotransferencia Western**

Se hibridaron geles de Novex Tricine usando medio de inmunotransferencia trans-blot (Bio-Rad) sobre el módulo de inmunotransferencia Western (Novex) de acuerdo con el protocolo del suministrador. Tras las transferencia se bloqueó la membrana con leche desnatada al 5 % en NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM pH 7,4 y más tarde se incubó en leche desnatada a 1 % en NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM, Tween 20 al 0,1 %, pH 7,4 y un antisuero monoclonal frente a los péptidos anticongelantes de babosa vivípara americana. Se obtuvieron dos anticuerpos diferentes (obsequio de M. MM Gani, Unilever Research, Colworth House Laboratory), uno para la determinación de los grupos S y el otro para la determinación del grupo Q. La incubación se llevó a cabo durante la noche a temperatura ambiente bajo agitación suave. Se eliminaron los anticuerpos no adsorbidos mediante lavado con el tampón de incubación (3 x 5 min). Se incubó la membrana con el segundo anticuerpo (anti cabra – IgG de ratón (H + L), Alkaline Phosphatase Conjugate; BioRoad, Richmond) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se desarrolló el enzima usando BCIP/NBT (Biorad).

#### **Digestión triptica**

Para la digestión con tripsina se disolvió la muestra en tampón de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M pH 8,3. Se añadió tripsina (TPCK tratada, Worthington, Millipore Corporation) en una relación enzima : sustrato de 1:100. Tras 30 minutos se verificó el pH y se añadió una vez más la misma cantidad de tripsina. Se llevó a cabo la incubación durante la noche a 37 °C. Se paró la digestión mediante la adición de TFA para dar como resultado un valor de pH de pH 2. Se separaron los péptidos por medio de RP-HPLC sobre el sistema SMART (Pharmacia)

#### **Análisis de la secuencia del aminoácido N-terminal**

Se llevó a cabo el análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal sobre un LF 3000 Protein Sequencer (Beckman) de acuerdo con el protocolo de los suministradores. Se analizaron los derivados PTH de los aminoácidos sobre un sistema RP-HPLC automatizado, el sistema Gold (Beckman)

#### **Determinación de la proteína mediante análisis de aminoácidos**

Se hidrolizaron las muestras de AFP-III en HCl 6 M que contenía Fenol al 1 % bajo vacío a 110 °C durante 24 horas y a continuación se secaron. Los análisis se llevaron a cabo sobre un analizador de aminoácidos Alpha plus de la serie 2 (Pharmacia Biotech) usando el protocolo de los suministradores.

#### **Ensayo de recristalización**

Las muestras que se iban a ensayar para la actividad de los AFP-III se mezclaron con sacarosa en polvo para dar un 30 % en volumen de solución de sacarosa. Una proporción de esta solución se colocó sobre el porta de un microscopio, se recubrió con un cubre para evitar la evaporación y se ajustó en una etapa de frío Linkam THMS, se conectó con un sistema de enfriamiento Linkam CS 196 y se controló mediante un controlador Linkam TMS 91. Se enfrió por crash esta solución a -40 °C (δ 99 °C/min.) y se calentó a continuación a -6 °C- Se examinó el crecimiento de los cristales de hielo microscópicamente durante el transcurso de los 30 minutos de incubación a -6 °C.

Para el ensayo de los péptidos purificados mediante HPLC, se secaron las muestras de la columna de RP-HPLC que contenían isoformas de AFP-III en un Speed Vac Concentrator (Savant) tras una etapa de rehidratación en agua Milli Q. Tras la segunda etapa de secado se solubilizaron las muestras en 100 µl de agua Milli Q y se verificó el pH

para tener la seguridad que se habían eliminado todos los TFA del sistema tampón de la RP-HPLC. Se diluyeron las muestras hasta un valor de absorbancia de 0,700 a  $\lambda = 214$  nm, esto es equivalente aproximadamente a 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de solución de AFP-III de pescado. Para tener la seguridad de que las muestras contienen una cantidad igual de AFP-III, se verificó posteriormente mediante el análisis de los aminoácidos. Cuando se purificaron las muestras, se usaron isoformas de AFP-III, se verificó su pureza mediante el análisis de la secuencia de aminoácido N-terminal.

#### Fermentación con alimentación discontinua

Procedimiento de inoculación: se hizo crecer un cultivo del transformante apropiado en 25 ml de medio mínimo y se cultivó durante la noche a 30 °C y 300 rpm. El cultivo se transfirió posteriormente a un matraz de 1000 ml con agitación que contenía 500 ml de YP que contenía glucosa al 2 % y se cultivó durante la noche a 30 °C y 300 rpm. Se usó este cultivo como inóculo para el experimento de alimentación discontinua.

Se usó el siguiente medio discontinuo: 110 g de glucosa. 1 H<sub>2</sub>O compuesto hasta 500 g con agua desmineralizada. 25 g de Trusoy, 50 g de extracto de levadura (Ohly), 10,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 ml 1 000 x solución de vitamina Egli, 50 ml 100 x trazador de metales Egli (Egli, 1980), 0,25 g de L-Histidina-HCl (Sigma), 3 g de MgSO<sub>4</sub>, 2 g de antiespumante hasta 4500 g con agua desmineralizada. Se esterilizó térmicamente la solución de glucosa y la solución de vitamina se esterilizó mediante filtración de manera separada. Todos los demás componentes se esterilizaron térmicamente en el fermentador. Se reguló la temperatura a 30 °C y el pH hasta un valor de 5,0. Se inoculó el fermentador y se cultivaron las células en un caudal de aire de 2 l/min y a una velocidad de agitación de 600 rpm. Tras 18 horas se comenzó la fase de alimentación.

Se usó el siguiente medio de alimentación: 1100 g de glucosa. 1 H<sub>2</sub>O compuesto hasta 1750 g con agua desmineralizada. 62,5 g de extracto de levadura (Ohly), 30 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 ml 1000 x solución de vitamina Egli, 50 ml 100 x trazador de metales Egli (Egli, 1980), 6,25 g de L-Histidina.HCl (Sigma), 6,25 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2 g de antiespumante hasta 850 g con agua desmineralizada.

Se reguló la bomba del alimento hasta un valor RQ constante (relación de moles de CO<sub>2</sub> producidos y moles de O<sub>2</sub> consumidos) de 1,05, basándose en la herramientas de software tal como ha descrito Keulers (1993). Se cosechó el cultivo tras 37 horas.

#### Ejemplo de referencia 1 Construcción de un gen sintético que codifica un AFP de tipo III

Se construyó una secuencia de nucleótido que codificaba el péptido anticongelante HPLC I, optimizado para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* como sigue: se sintetizó una serie de 12 oligonucleótidos (inva1p1, inva1p2, inva1p3, inva1p4, inva1p5, inva1p6, inva1p7, inva1p8, inva1p9, inva1p10, inva1p11 e inva1p12), que comprendía principalmente la secuencia de ADN del AFP maduro expresado en codones de *S. cerevisiae* usados de manera preferencial. Se diseñó el gen sintético para contener regiones de filamentos únicos 5' compatibles con *Pst*I y *Hind*III que generaron extremos pegajosos (Fig. 2)

Para el montaje del gen de AFP sintético, se disolvieron 50 pmol de cada uno de los oligonucleótidos en 12  $\mu\text{l}$  de agua, se incubaron durante 2 min. a 95 °C, y se colocaron directamente sobre el hielo. Tras esta etapa de desnaturalización, se fosforilaron los oligonucleótidos en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , que contenían 2,5 mM de ATP, 5 mM de DDT y aproximadamente 10 U de polinucleótido quinasa, durante 40 min. a 37 °C, seguido por 2 min de desnaturalización a 95 °C y colocación sobre hielo. Se mezclaron 10  $\mu\text{l}$  de cada oligonucleótido fosforilado con su ADN de oligonucleótido más complementario para obtener una formación dúplex. Tras 2 min de incubación a 95 °C para la desnaturalización se enfrió lentamente cada dúplex a 30 °C. De nuevo se vertieron 10  $\mu\text{l}$  de todas las seis mezclas dúplex y se incubaron en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ , que contenía Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, DTT 8 mM, y 40  $\mu\text{g/ml}$  de gelatina y 10 U de ADN ligasa, durante dos horas a 20 °C. A continuación se precipitó la mezcla de ligamiento, y se redisolvió en 30  $\mu\text{l}$  de tampón TE. Se colocaron 15  $\mu\text{l}$  de la mezcla sobre un gel de agarosa al 2 % y se extrajo del gel la banda de ADN del tamaño esperado (aproximadamente 224 pares de bases) y finalmente se purificó mediante el procedimiento Gene Clean II, como recomendaba el suministrador.

A continuación se ligó el fragmento de ADN obtenido en el vector pTZ19R linealizado *Pst*I/*Hind*III (Pharmacia) y se transformó en la *E. coli* JM 109 mediante procedimientos normalizados. Se aisló el ADN del plásmido de diversos transformantes mediante el procedimiento de mini preparación de lisis alcalina ligeramente modificado y se analizó mediante análisis de restricción con diversos enzimas. Se confirmó la secuencia del contenido inserto en cada uno de los plásmidos mediante el dideoxi secuenciamento de Sanger del plásmido de filamento doble (Sanger y col., 1977). Este constructo intermedio, que contenía la región de codificación del casete de AFP-III sintético se denominó pUR7700 (Fig. 3).

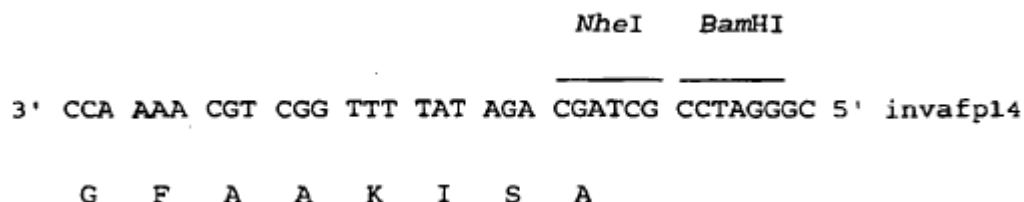
#### Ejemplo de referencia 2 Construcción de vectores de expresión de la levadura que contienen un gen sintético que codifica un AFP-III HPLC-1

El gen de AFP-III sintético llevado por pUR7700 no contiene ninguna información necesaria para la expresión de este péptido en la levadura. Para obtener la expresión y secreción de este gen, deberán fabricarse los constructos que contienen las fusiones translacionales del gen de AFP-III con una secuencia señal de secreción adecuada y

estas secuencias de fusión se producen bajo el control de un promotor del gen de la levadura.

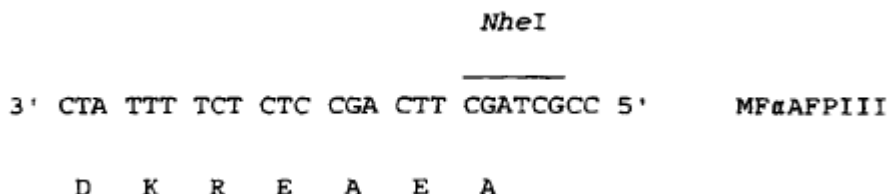
Las secuencias señal de secreción adecuadas se pueden seleccionar a partir de una variedad de genes que codifican proteínas secretadas de manera eficiente por la levadura. Por ejemplo, la invertasa codificada por *SUC2* o el factor de acoplamiento  $\alpha$  codificado por *MF $\alpha$ 1* y *MF $\alpha$ 2*. Para obtener una fusión adecuada con la secuencia señal de la invertasa, se generó un fragmento PCR que contenía la secuencia señal de la invertasa, parte del promotor *GAL7* y un enzima de restricción adecuado localizado para asegurar un marco de fusión de la secuencia señal de la invertasa con el gen de AFP-III sintético.

Para obtener este fragmento se diseñó un cebador de PCR, invafp14, con la siguiente secuencia



Este cebador se usó como el cebador 3' en una reacción PCR en combinación con el cebador PG7 05 AF 5' (Verbakel, 1991) que híbrida con la secuencia encontrada en el promotor *GAL7*. Usando el ADN del plásmido pUR2778 como molde (Fig. 4, van Gorcom y col., 1991) la reacción generó un fragmento 243 bp aproximadamente. Este fragmento se eluyó a partir de un gel de agarosa y se purificó mediante el procedimiento Gene Clean de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. El fragmento purificado se digirió posteriormente con *SacI* y *BamHI* y el fragmento de aproximadamente 88 bp resultante se ligó en los emplazamientos apropiados del plásmido pTZ19R. La mezcla de ligamiento se introdujo en la *E. coli* JM109 mediante transformación y se aisló el ADN del plásmido a partir de un transformante y se secuenció para confirmar la identidad del inserto clonado. Este plásmido se designó pUR7701 (Fig. 5).

Para obtener un marco de fusión de la secuencia señal de la invertasa con el gen de AFP-III sintético pUR7701 se digirió con *NheI* y *HindI* y se aisló el fragmento de aproximadamente 196 bp y se ligó con el fragmento de aproximadamente 2911 bp formado por digestión de pUR7701 con *NheI* y *HindI*. El plásmido resultante se nombró pUR7702 (Fig. 6). De una manera similar, un fragmento PCR que contenía el factor de acoplamiento  $\alpha$  generó la secuencia señal pre-pro usando el cebador MF $\alpha$ AFPIII como cebador 3':



Se generó un fragmento PCR que contenía parte del promotor *GAL7* y toda la secuencia que codifica el factor de acoplamiento  $\alpha$  pre-pro a partir de un molde de ADN de pUR2660 (Documento WO 94/03617) usando MF $\alpha$ AFPIII y PG7 05 AF como cebadores. PUR2660 contiene la secuencia del factor de acoplamiento  $\alpha$  pre-pro bajo el control del promotor *GAL7*. El fragmento resultante de aproximadamente 462 bp se purificó tal como se ha descrito anteriormente y se digirió con *SacI* y *NheI*. El fragmento de aproximadamente 292 bp obtenido de tal manera se ligó en el fragmento de aproximadamente 3025 bp obtenido mediante digestión de pUR7702 con *SacI* y *NheI*. Se secuenció el ADN del plásmido de diversos transformantes de *E. coli* JM109 obtenidos de este ligamiento para confirmar que se había clonado el fragmento correcto. Uno de estos plásmidos se designó pUR7703 (Fig. 7).

Se introdujeron los plásmidos del constructo capaces de expresar las fusiones de la secuencia señal del gen sintético del casete de AFP-III en levadura en una variedad de vectores de expresión de la levadura como sigue:

El fragmento *SacI* / *HindIII* de aproximadamente 278 bp de pUR7702 y el fragmento *SacI* / *HindIII* de aproximadamente 488 bp de pUR7703, que transportan la invertasa y el factor de acoplamiento  $\alpha$  y se fusionan de manera respectiva con los AFP-III, se clonaron de manera independiente usando técnicas normalizadas en los vectores de expresión también digeridos con *SacI* y *HindIII*. Estos vectores de expresión transportan el promotor de *S. cerevisiae* de tal manera que la inserción de los genes en el emplazamiento *SacI* permite la transcripción dirigida de *GAL7* de los genes insertados.

Se fabricó pUR7704 (Fig. 8) mediante inserción de la casete de AFP-III de la secuencia señal de la invertasa a partir de pUR7702 en el vector de integración del ADN ribosómico multicopia pUR2778 y PUR7706 (Fig 9) es pUR2778

que contenía el factor de acoplamiento  $\alpha$  de la casete de AFP-III, derivada de pUR7703, insertada entre los emplazamientos *SacI* y *HindIII*.

### Ejemplo de referencia 3 Expresión de AFP-III en *S. cerevisiae*

Los plásmidos pUR7704 y pUR7706 se linealizaron por digestión con *HpaI* cuyo objetivo es la integración de los plásmidos en la región del ADNr de la levadura, a continuación se introducen de forma independiente en la cepa SU50 de *S. cerevisiae* mediante electroporación. Se seleccionaron los transformantes por su capacidad para crecer en ausencia de leucina. Para conseguir la expresión de los genes AFP-III clonados, los transformantes que llevan pUR7704 o pUR7706 se hicieron crecer en primer lugar durante 40 horas en medio mínimo líquido a 30 °C, a continuación se diluyó a 1:10 en medio de inducción recientemente preparado (extracto de levadura al 1 %, peptona Difco al 2 %, galactosa al 5 %), y se incubó a 30 °C durante 48 horas más. Al final de este período se ensayaron muestras del sobrenadante del cultivo respecto de su capacidad para inhibir el crecimiento de cristales de hielo.

Se examinó al microscopio el crecimiento de los cristales de hielo a lo largo de una incubación de 30 minutos a -6 °C. Se pudo demostrar claramente que las muestras de sobrenadante derivadas de levaduras que llevan el gen sintético AFP-III tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de cristales de hielo cuando se compararon con muestras de control similares preparadas a partir de sobrenadantes de levaduras no transformadas o levaduras que transportan el vector de expresión pero que carecen del gen sintético AFP-III. Sin embargo, la actividad inhibitoria de recristalización del material producido por la levadura fue significativamente inferior al de una cantidad equivalente de una preparación de AFP de pescado.

Para un análisis posterior del péptido anticongelante producido se centrifugaron durante 5 min a 4000 rpm muestras de 10 ml procedentes del cultivo inducido de los transformantes pUR7704 y pUR7706. Las células y sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -20 °C. Se usó electroforesis en gel de poliacrilamida SDS desnaturalizante para separar las proteínas y se detectó el AFP mediante hibridaciones de Western usando un anticuerpo monoclonal anti AFP específico.

La presencia de una banda con un peso molecular aparente de 6,5 kD en las muestras de sobrenadante procedente del transformante de levadura que transporta pUR7704 y pUR7706 muestra claramente que estos transformantes son capaces de producir AFP-III. Se purificó el péptido mediante HPLC en fase reversa, y se determinó la secuencia del N terminal. Esta secuencia demostró que el péptido HPLC-1 se procesó y secretó correctamente por la levadura.

### Ejemplo de referencia 4 Identificación del subtipo de péptido anticongelante de babosa vivípara americana más activo

Se purificaron las isoformas de AFP-III usando un procedimiento en dos etapas. En primer lugar se cargó la muestra sobre una columna Mono S de intercambio catiónico y se eluyó usando el gradiente descrito. En la Fig. 10 se muestra el modelo de elución. Se aislaron un pico no retardado (el pico Q) y cuatro picos eluidos (S1 a S4) a partir de la columna. S1 representa la proteína con la capacidad de enlace más baja en la columna de intercambio catiónico Mono S bajo estas condiciones y S4 contiene la proteína con la capacidad de enlace más alta en la columna. Los picos se recogieron y cargaron sobre una columna RP-HPLC usando el gradiente descrito. En la Fig. 11 se muestra el cromatograma del material total. Los picos son de las isoformas de AFP-III y se numeran desde 1 a 12 de acuerdo con su comportamiento sobre esta columna usando las condiciones especificadas. Todas las isoformas de AFP-III eluyen entre 25 y 45 minutos. En las Fig. 12 a 16 se muestran los cromatogramas de la RP-HPLC de las fracciones Q y S1 a S4. Cada fracción da como resultado diferentes isoformas de AFP-III y cada isoforma AFP contenida en cada pico se resume en la tabla 2. Se ensayaron las fracciones recogidas a partir de las columnas Mono S y RP-HPLC con antisuero anti-AFP-III de ratón y todas las isoformas de S1 a S4 dieron una reacción positiva al antisuero de tipo S, la isoforma 12 del grupo Q reaccionó positivamente a la del antisuero de tipo Q. Se determinó la secuencia de aminoácidos N-terminal de cinco de las isoformas (Tabla 3) El pico del AFP-III de tipo HPLC 7 se contaminó con lisozima de pescado pero las otras secuencias de aminoácidos identificadas se podrían relacionar con las secuencias conocidas de las isoformas de AFP-III. Se ensayaron cantidades iguales de las proteínas purificadas para la actividad anticongelante.

Como se evidenció mediante el ensayo de inhibición de la recristalización únicamente la isoforma de HPLC-12 de AFP-III mostró actividad anticongelante significativa. Para confirmar este hallazgo se reconstituyeron las isoformas de los AFP-III de la babosa vivípara americana en presencia y ausencia de la isoforma de HPLC-12. La preparación del péptido completamente reconstituido mantuvo la actividad de la preparación del pescado crudo mientras que la preparación que carece de la isoforma de HPLC-12 mostró una actividad anticongelante muy reducida como se evidenció mediante el ensayo de recristalización.

Usando una digestión trípica de la isoforma 12 se determinó la secuencia total de aminoácidos de esta isoforma. Se encontró que la secuencia era idéntica a la descrita en la bibliografía. (Davies y Chow, 1990).

### Ejemplo 1

#### Construcción de un gen sintético que codifica la variante HPLC-12 del AFP de tipo-III

Se construyó como sigue una secuencia de nucleótido que codifica el péptido anticongelante HPLC-12 enlazado con la secuencia señal de invertasa y con el uso del códon optimizado para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Se sintetizó un conjunto de 15 oligonucleótidos (HPLC12.1, HPLC12.2, HPLC12.3, HPLC12.4, HPLC12.5, HPLC12.6, HPLC12.7, HPLC12.8, HPLC12.9, HPLC12.10, HPLC12.11, HPLC12.12, HPLC12.13, HPLC12.14 y HPLC12.15), comprendiendo principalmente la secuencia de ADN del AFP maduro expresado en codones de *S. cerevisiae* usados de manera preferencial. Se diseñó el gen sintético para contener regiones filamentosas únicas compatibles con *SacI* y *HindIII* que generaron extremos pegajosos. (Fig. 17).

Para el ensamblaje del gen HPLC-12 sintético, se disolvieron 50 pmol de cada uno de los oligonucleótidos en 12 µl de agua, se incubaron durante 2 min. a 95 °C, y se colocaron directamente sobre hielo. Tras esta etapa de desnaturalización, se fosforilaron los oligonucleótidos en un volumen final de 20 µl, que contenía 2,5 mM de ATP, 5 mM de DDT y aproximadamente 10 U de polinucleótido quinasa, durante 40 min. a 37 °C, seguido por 2 min de desnaturalización a 95 °C y colocación sobre hielo. Se mezclaron 10 µl de cada oligonucleótido fosforilado con su oligonucleótido de ADN más complementario para obtener la formación dúplex. Tras 2 min de incubación a 95 °C para la desnaturalización, se enfrió lentamente cada dúplex a 30 °C. De nuevo, se vertieron 10 µl de todas las mezclas dúplex y se incubaron en un volumen final de 100 µl, que contenía 50 mM de Tris/HCl, pH 7,5, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM de DTT, y 40 µg/ml de gelatina y 10 U de ADN ligasa, durante dos horas a 20 °C. A continuación se precipitó la mezcla de ligamiento, y se redisolvió en 30 µl de tampón TE, y se extrajo del gel la banda de ADN del tamaño esperado (aproximadamente 291 pares de bases) y se purificó finalmente mediante el procedimiento Gene Clean II, como recomendaba el suministrador.

Se ligó el fragmento con un fragmento vector derivado del vector de integración multicopia pUR2778 mediante digestión con *SacI* y *HindIII*. Se confirmó la secuencia del inserto y el plásmido resultante se nombró pUR7718 (Fig. 18).

Se linealizó el plásmido pUR7718 mediante digestión con *HpaI* cuyos objetivos son la integración del plásmido en la región del ADNr de la levadura, y a continuación se introdujo posteriormente en la cepa SU50 de *S. cerevisiae* mediante electroporación. Se seleccionaron los transformantes resultantes mediante su capacidad para crecer en ausencia de leucina.

Para conseguir la expresión del gen HPLC-12 clonado, los transformantes que transportaban pUR7718 se hicieron crecer en primer lugar durante 40 horas en medio líquido animal a 30 °C y a continuación se diluyeron posteriormente 1:10 en un medio de inducción preparado de nuevo (extracto de levadura al 1 %, peptona Difco al 2 %, galactosa al 5 %) y se incubaron a 30 °C durante 48 horas más. Al final de este periodo se ensayaron las muestras del cultivo sobrenadante para su capacidad de inhibir el crecimiento de los cristales de hielo.

Los resultados (ensayo de recristalización) muestran claramente que los sobrenadantes del cultivo tenían niveles altos de actividad anticongelante. La comparación de estos resultados con aquellos obtenidos para la expresión de la variante de HPLC-1 de la levadura mostraron que el sobrenadante procedente del transformante que producía el nivel más bajo de actividad anticongelante del HPLC-12 excedía al del mejor transformante de HPLC-1

Se llevó a cabo una fermentación con alimentación discontinua con un transformante SU50 que transportaba pUR7718. al final de la fase de alimentación se cosecharon las células mediante centrifugación en una centrífuga Jouan LR 5.22 usando cubetas de 1 l, durante 30 min a 4650 rpm (7200 g). Se ensayó el sobrenadante para la actividad anticongelante mediante el ensayo de inhibición de la recristalización del hielo. El sobrenadante sin diluir evita con claridad el crecimiento del cristal, lo que demuestra la presencia de niveles altos de péptido anticongelante activo en el sobrenadante del cultivo.

Una técnica hibridación western del sobrenadante procedente de esta fermentación mostró que se secretó material de AFPIII-HPLC12. El peso molecular aparente del HPLC12 producido de levadura fue equivalente al del HPLC12 producido de pescado. La purificación y el secuenciamiento de aminoácidos del péptido producido de levadura confirmaron que este material era indistinguible del péptido HPLC12 producido por la babosa vivípara americana.

## Referencias

**Campbell, I y Duffus, J.H.** (1988) Yeast, a practical approach. IRL press, Oxford.

**Chao, H., Davies, P.L., Sykes, B.D. y Sonnichsen,** (1993) Use of proline mutants to help solve the NMR solution structure of Type III antifreeze protein. Protein Science 2 1411-1428.

**Chao, H., Sonnichsen, F.D., DeLuca, C.I., Sykes, B.D. y Davies, P.L.** (1994) Structure-function relationships in the globular type III antifreeze protein: identification of a cluster of surface residues required for binding to ice. Protein Science 3 1760-1769.

**Chung, C.T., Niemela, S.L., Miller, R.H.,** (1989), One-step preparation of competent *E. coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86; 2172-2175.

**Davis, P. L. and Chow, H. L.,** (1990), Biochemistry of fish antifreeze proteins, The FASEB. Journal 4 R2460-2468.

**Driedonks, R.A., Toschka, H.Y. van Almkerk, J.W., Schaffers y Verbakel, J.M.A.** (1995) Expression and secretion of antifreeze peptides in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Yeast 11.

**Egli, T.** (1980), Wachstum von methanol assimilerende Hefen, PhD Thesis, Zurich no 6538.

**van den Elzen y col.** (1985) Plant Mol Biol., 5: 149-154.

**Erhart, E., Hollenberg, C.P.,** (1981), Curing of *Saccharomyces cerevisiae* 2 $\mu$ m DNA by transformation. Curr. Genet., 3, 83-89.

**Fletcher, G.L. Hew, C.L. Joshi, S.B. y Wu, Y.** (1994) Antifreeze polypeptide-expressing microorganisms useful in fermentation and frozen storage of foods. US Patent application.

**Gasson, M.J.,** (1993), progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria F.E.M.S. microbiology Reviews 12 3-20.

**Hanahan,** (1988) Ann. Rev. Genetics 22: 479-519.

**Hew, C.L. Slaughter, D., Shashikant, B.J., Fletcher G.L. y Ananthanarayanan V.S.** (1984) Antifreeze peptides from the Newfoundland Ocean Punt *Macrozoarces americanus*: presence of multiple and compositionally diverse components. J. Comp Physiol B. 155, 81-88.

**Hew, C. L., Wang, N-C., Joshi, S., Fletcher, G. L., Scott, G. K., Hayes, P. H., Buettner, B. y Davies, P. L.,** (1988), Multiple genes provide the basis for antifreeze protein diversity and dosage in Ocean Punt. J. Biol. Chem. 263, 12049-12055.

**Keulers, M.,** (1993) PhD thesis technical university of Eindhoven

**Li, X., Trinh, K. Y. y Hew, C. L.** (1992), Expression and characterization of an active and thermally more stable recombinant antifreeze polypeptide from Ocean Punt, *Macrozoarces americanus*, in *Escherichia coli*: improved expression by modification of the secondary structure of the mRNA. Protein Engineering 4 995-1002.

**McKown, R.L. y Warren G.J.** (1991) Enhanced survival of yeast expressing an antifreeze gene analogue after freezing. Cryobiology 28, 474-482.

**Romanos, M. A., Scorer, C. A. y Clare, J. J.,** (1992), Foreign Gene expression in yeast: a review, Yeast 8 423-488.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.,** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

**Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R.** (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.

**Sonnichsen, F. D., Sykes, B. D., Chao, H. y Davies, P.L.,** (1993), The non-helical structure of antifreeze protein type III, Science 259, 1154-1157.

**Toschka H. Y., Verbakel, J.M., Almkerk J.W.** (1992), PCT Patent Application WO94/03617 with priority of 29 July 1992 from Dutch patent Application 92202338.7 Process for producing Antifreeze Peptides (AFP's).

**Van Gorcom, R. F. M., Hessing, J. G. M., Maat, J. y Verbakel, J. M. A.,** (1991) Xylanase Production. International Patent WO 91/19782.

**Verbakel, J. M. A.,** (1991), Heterologous gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. PhD. Thesis, University of Utrecht.

**Warren, G.J., Hague, C.M., Corroto, L.V. y Mueller, G.M.** (1993) Properties of engineered antifreeze peptides. FEBS Letters 321, 116-120.

**Yanisch-Perron, C., Viera, J., Messing, J.,** (1985), Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequence of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene 33; 103-119.

### Descripción de las figuras

Figura 1. Isoformas de AFP de tipo III. Las regiones encuadradas representan regiones de identidad y los aminoácidos sombreados son aquellos identificados como importantes para las propiedades anticongelantes de

los péptidos.

Figura 2. Gen sintético que codifica el AFP de tipo III de tipo HPLC1.

Figura 3. Representación esquemática de la construcción de pUR7700, un plásmido que transporta el gen AFP-III sintético.

5 Figura 4. Mapa de restricción del vector pUR2778 de expresión de la levadura.

Figura 5. Representación esquemática de la construcción de pUR7701, un plásmido que transporta la secuencia señal de la invertasa.

Figura 6. Representación esquemática de la construcción de pUR7702, un plásmido que transporta el gen AFP-III sintético ligado en marco con la secuencia señal de la invertasa.

10 Figura 7. Representación esquemática de la construcción de pUR7703, un plásmido que transporta el gen AFP-III sintético fusionado en marco con el factor de acoplamiento pre-pro de la secuencia señal de secreción.

Figura 8. Representación esquemática de la construcción del plásmido pUR7704, un vector de integración del ADN<sub>r</sub> multicopia que transporta el gen AFP-III sintético ligado en marco con la secuencia señal de la invertasa.

15 Figura 9. Representación esquemática de la construcción del plásmido pUR7706, un vector de integración del ADN<sub>r</sub> multicopia que transporta el gen AFP-III sintético ligado en marco con la secuencia señal del factor de acoplamiento pre-pro.

Figura 10. Modelo de elución de los péptidos anticongelantes de la babosa vivípara americana a partir de una columna Mono S.

Figura 11. Cromatograma de péptidos anticongelantes separados mediante HPLC en fase reversa.

20 Figura 12. Cromatograma de péptidos anticongelantes Mono S S1 separados mediante HPLC en fase reversa.

Figura 13. Cromatograma de péptidos anticongelantes Mono S S2 separados mediante HPLC en fase reversa.

Figura 14. Cromatograma de péptidos anticongelantes Mono S S3 separados mediante HPLC en fase reversa.

Figura 15. Cromatograma de péptidos anticongelante Mono S S4 separados mediante HPLC en fase reversa.

Figura 16. Cromatograma de péptidos anticongelantes Mono S S1 separados mediante HPLC en fase reversa.

25 Figura 17. Gen sintético que codifica la proteína de fusión de la secuencia señal de la invertasa del AFP HPLC12 de tipo III.

Figura 18. Representación esquemática del plásmido pUR7718

Tabla 1

Plásmidos que contienen AFP-III	
Nombre del plásmido	Características relevantes
pUR7700	pTZ19 que transporta el gen sintético HPLC-1
pUR7701	pTZ19 que transporta la secuencia señal de la invertasa
pUR7702	pTZ19 que transporta el gen de fusión HPLC-1 de la secuencia señal de la invertasa
pUR7703	pTZ19 el gen de fusión HPLC1 de la secuencia señal del factor de acoplamiento $\alpha$
pUR7704	Vector de expresión de la levadura que transporta el gen de fusión HPLC-1 de la secuencia señal de la invertasa
pUR7706	Vector de expresión de la levadura que transporta el gen de fusión HPLC-1 de la secuencia señal del factor de acoplamiento $\alpha$
pUR7718	Vector de expresión de la levadura que transporta el gen de fusión HPLC-12 de la secuencia señal de la invertasa



5

Tabla 2: fracciones Mono S que contienen isoformas de AFP-III 3

Fracción Mono S	Isoforma 3 de AFP
Q	12
S1	4
	5
	6
S2	1
	2
	3
	11
S3	7
S4	7
	9

10

## REIVINDICACIONES

1. Una levadura que comprende una construcción de ADN que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica AFP, siendo dicha levadura capaz de expresar dicha secuencia de ácido nucleico, no estando presente dicha construcción de ADN en la levadura nativa y comprendiendo dicha construcción de ADN, en el orden siguiente:
  - (a) un promotor fuerte activo en la levadura,
  - (b) un codón de iniciación ATG,
  - (c) al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido AFP HPLC12 de tipo III que tiene (i) la secuencia de aminoácidos de AFP HPLC12 de tipo III que se muestra en la Figura 1 o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de más del 80 % con la secuencia de aminoácidos de AFP HPLC12 de tipo III que se muestra en la Figura 1, con la condición de que un polipéptido que tiene dicha secuencia de aminoácidos exhiba una actividad de inhibición de la recristalización en hielo de al menos la de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de AFP HPLC12 de tipo III que se muestra en la Figura 1, estando dicha secuencia de ácido nucleico en el marco de lectura con el codón de iniciación ATG.
2. Un procedimiento para producir un polipéptido AFP HPLC12 de tipo III, comprendiendo el procedimiento proporcionar una levadura de acuerdo con la reivindicación 1 y cultivar la levadura en las condiciones en las que se produce o se induce la expresión del polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.
3. Una levadura de acuerdo con la reivindicación 1 o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la construcción de ADN comprende una secuencia señal para la levadura que permite la secreción del polipéptido, codificado por la secuencia de ácido nucleico por la levadura, durante el cultivo de la levadura.
4. Una levadura o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el codón de iniciación ATG está presente en la secuencia señal.
5. Una levadura o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde la secuencia señal es heteróloga con respecto a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido AFP HPLC12 de tipo III.
6. Una levadura o un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la construcción de ADN comprende además un codón de terminación unido al extremo 3' del ácido nucleico que codifica el polipéptido AFP HPLC12 de tipo III.
7. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que comprende además la etapa de recoger mediante un procesamiento adicional el producto expresado por la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido AFP HPLC12 de tipo III obtenido de la levadura.
8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 - 7, en el que el organismo levadura se cultiva en unas condiciones tales que secreta un polipéptido monomérico con una secuencia de aminoácidos sustancialmente correspondiente a la de la proteína AFP HPLC12 de tipo III mostrada en la Figura 1.
9. Una levadura o un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido AFP HPLC12 de tipo III comprende los codones preferidos de la levadura.
10. Una levadura o un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde la secuencia señal es la pre-secuencia de ADN del factor de acoplamiento  $\alpha$  de *S. cerevisiae*.
11. Una levadura o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la construcción de ADN también comprende la pro-secuencia del factor de acoplamiento  $\alpha$  de *S. cerevisiae* entre la pre-secuencia y la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido AFP HPLC12 de tipo III, en donde la pre-secuencia, la pro-secuencia y la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido AFP HPLC12 de tipo III están en el mismo marco de lectura.
12. Una levadura o un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la construcción de ADN contiene la secuencia señal de invertasa de *S. cerevisiae* precedente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido AFP HPLC12 de tipo III.
13. Una levadura o un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el promotor es un promotor GAL7 inducible o un promotor GAPDH constitutivo de *S. cerevisiae*.
14. Una levadura o un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o dos aminoácidos de la secuencia de

aminoácidos de AFP HPLC12 de tipo III mostrada en la Figura 1.

- 5 15. Una levadura recombinante que contiene y/o secreta un polipéptido que tiene (i) la secuencia de aminoácidos de AFP HPLC12 de tipo III mostrada en la Figura 1 o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de más del 80 % con la secuencia de aminoácidos de AFP HPLC12 de tipo III mostrada en la Figura 1, con la condición de que un polipéptido que tiene dicha secuencia de aminoácidos exhiba una actividad de inhibición de la recristalización en hielo de al menos la de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de AFP HPLC12 de tipo III mostrada en la Figura 1.

Fig.1.

SQ	SVVATQLI	IPNIPAL	IVVMEGRVTN	IGIIEAE	YSQIVGNQ	NTPVRKQ	TFIMORIMUKIYAA	HPLC 1
-	-	-	A	-	-	-	-	HPLC 4
-	-	-	A	-	-	-	-	HPLC 5
-	R	-	A	-	RI	-	-	HPLC 7
-	-	-	A	-	RI	-	-	HPLC 9
-	-	-	A	-	RI	-	-	HPLC 11
-	-	S	-	-	-	-	-	ADMc C10
-	-	-	-	-	-	-	-	ADMc C7
-	-	-	-	-	-	-	-	L. polaris
-	-	I-K-Q-V	-	-	PA	DE-L	-R-A	WOOLFFISH 1.5
-	-	I-K-Q-V	-	-	R	DE-L	-R-A	WOOLFFISH 1.9
DI-D	N	-	RSE-VT-V	-	DIPRL-SM	PA-PL-T-L	-G-PPA	HPLC 12
N	N	-	TTR-IY-T	-	DIPRL-SM	PA-PM-T-L	-D-F-CUCAPLN	GENOMIC 3
NKA	N	-	RAE-VT-P	-	DIPRL-L	PA-LI-T-L	-G-PQ	GENOMIC 5
NKA	N	-	LI-KAE-VT-N	-	DIPRL-I-N	PA-PL-T-L	-N-E	R. diarthorni
TK	S	-	KAE-VS-K	-	E-K-N	PA-NELE-L	-T-Q	A. brachycephalus
TK	N	-	KAEVS-K	-	EIPRL-M	PA-YLDE-L	-N-E	A. brachycephalus

Fig.2.

```

                    invafp1          invafp2
5'      GCCAAAATATCTGCTAGCCAAATCTGTTGTTGCTACTCAATTGATTCCAATGAATAC
3' ACGTCGGTTTATAGACGATCGGTTAGACAACCAACGATGAGTTAACTAAGGTTACTTATG
                    invaf7          invafp8

TGCTTTGACTCCAGTTATGATGGAAGGTAAAGTTACTAATCCAATTGGTATTCATTGTC
ACGAAACTGAGGTCAATACTACCTTCCATTTCATGATGATTAGGTTAACCATAGGTAACCG
                    invafp9          invafp5

TGAAATGTCCTCAAATTGTTGGTAAACAAGTTAATACTCCAGTTGCTAAAGGTCAAACATAT
ACTTACAGAGTTTAACAACCATTTGTTCAATTATGAGGTCAACGATTTCCAGTTTGATA
                    invafp10          invafp11

TATGCCAAATATGTTAAACATATGCTGCTTAAGCTTG      3'
ATACGGTTTATACCAATTTTGTATACGACGAATTTCGAACCTAG 5'
                    invafp12

```

Fig.3.

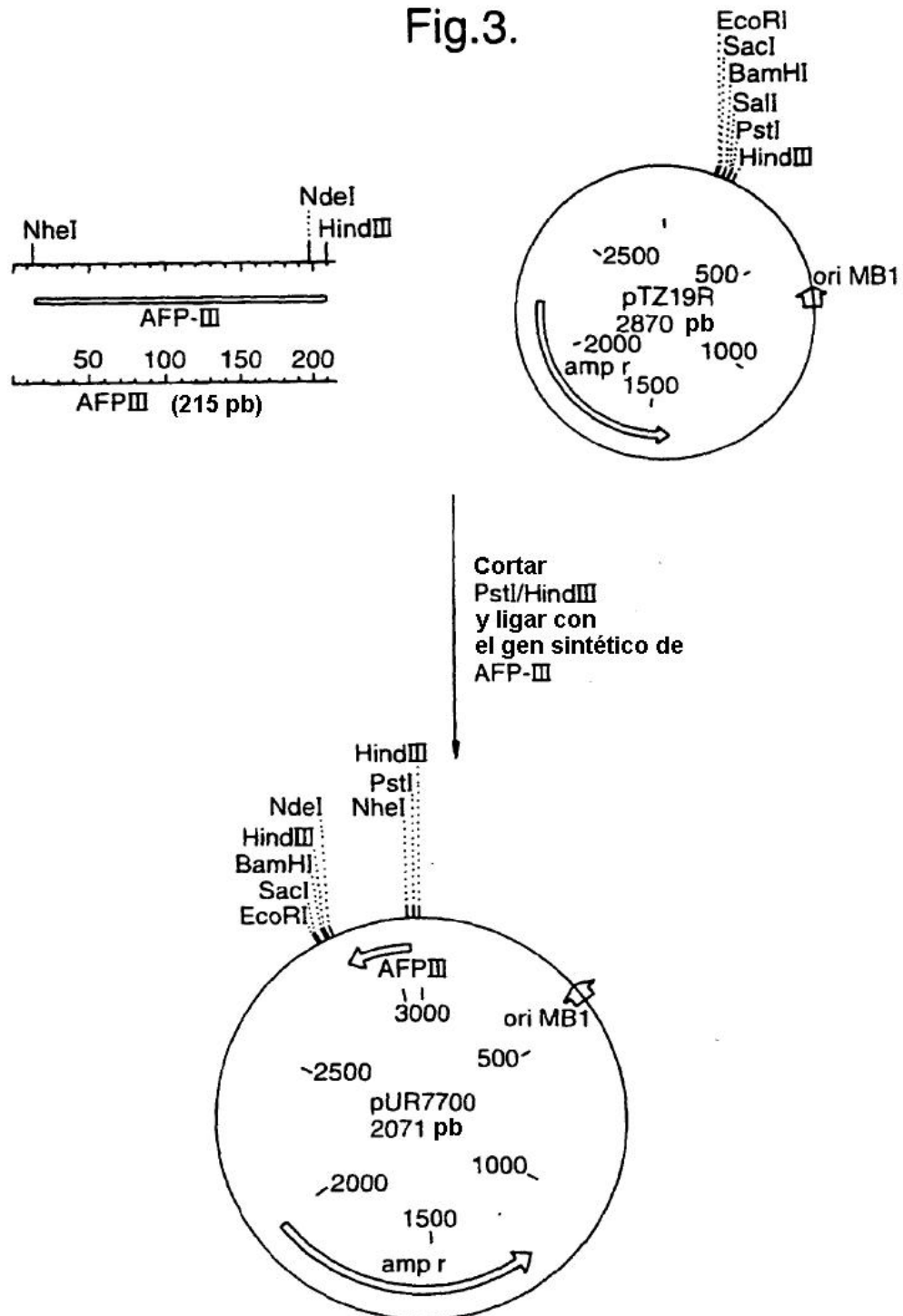


Fig.4.

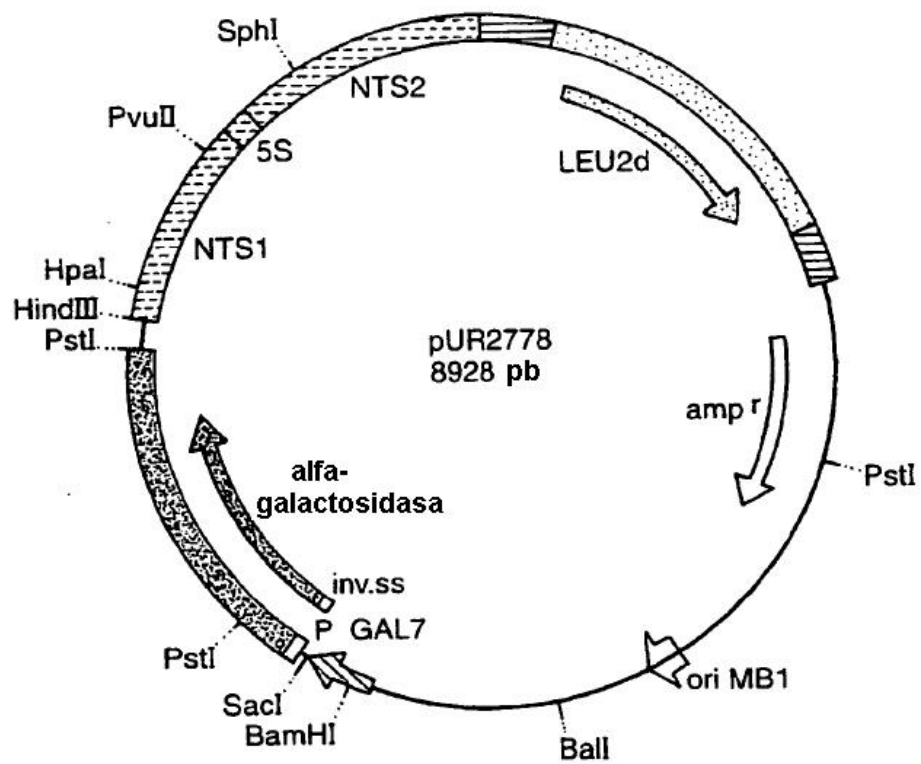
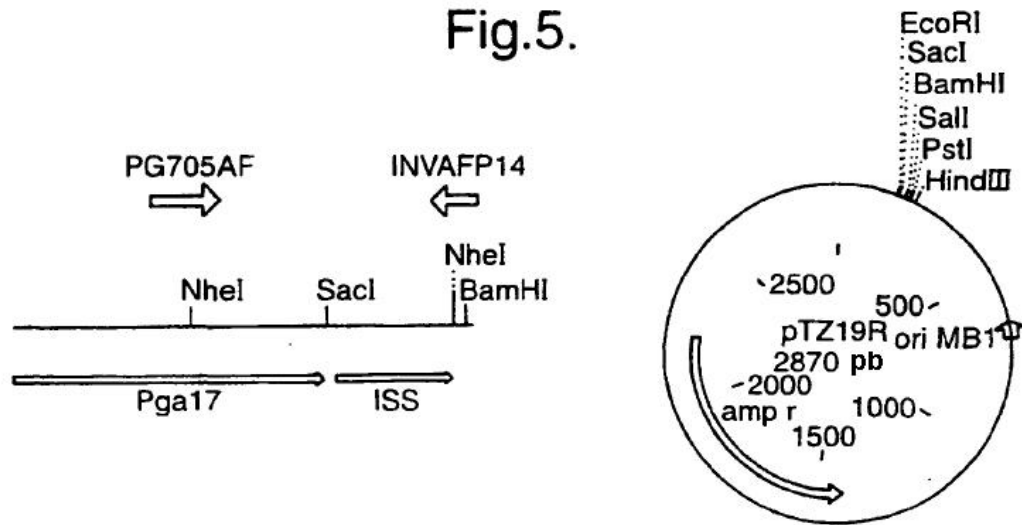


Fig.5.



Cortar con SacI/BamHI y ligar el fragmento de 88 pb  
del producto de PCR con el  
fragmento del vector de pTZ19

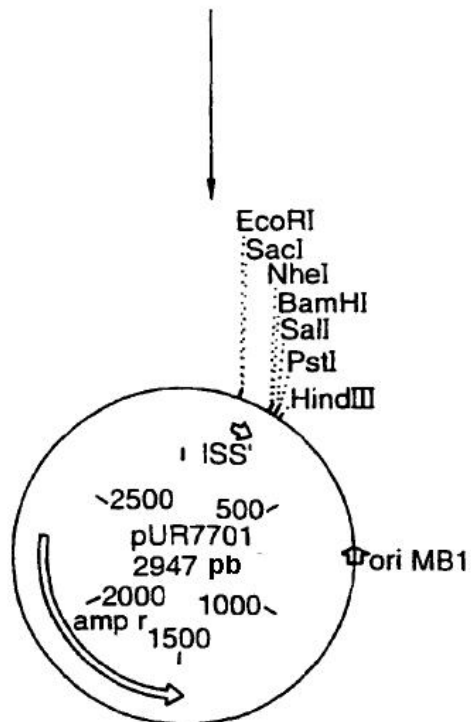
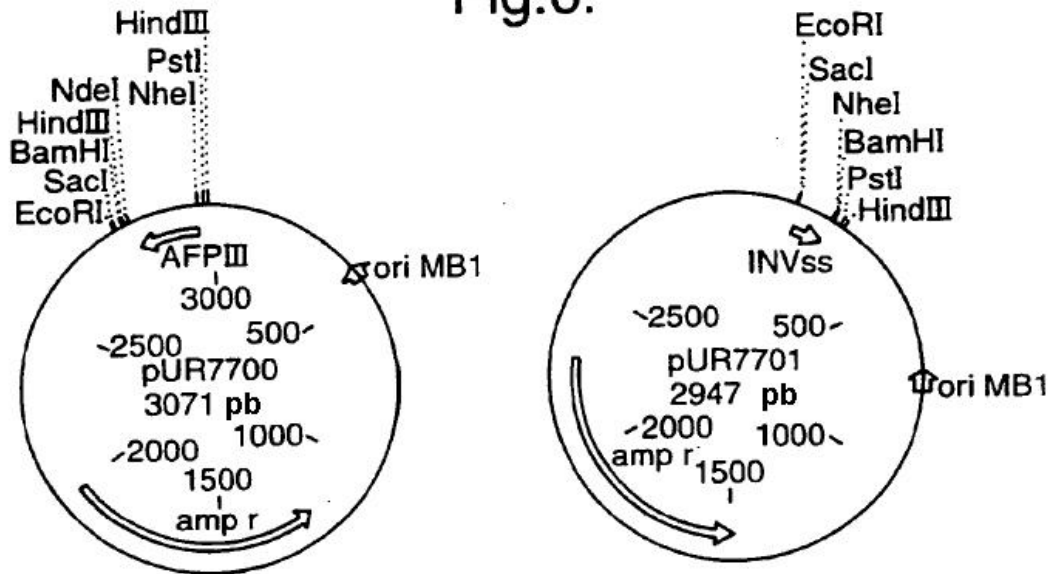




Fig.6.



Cortar con HindIII/NheI y ligar el fragmento de 196 pb  
de pUR7700 con el  
fragmento de 2991 pb de pUR7701

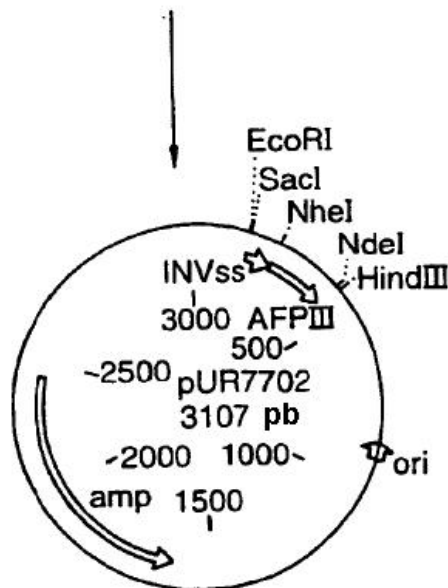
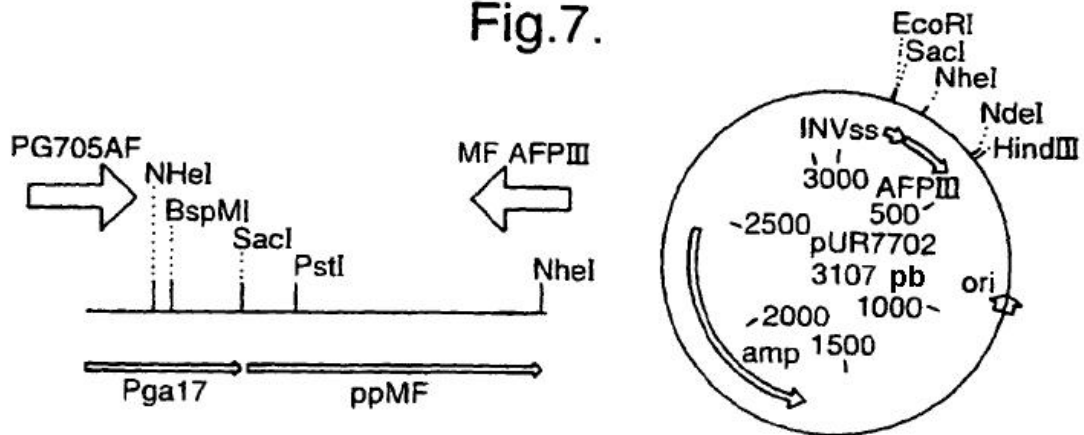


Fig.7.



Cortar con NheI/SacI y ligar el fragmento de 292 pb  
del fragmento de PCR con el  
fragmento de 3205 pb de pUR7702

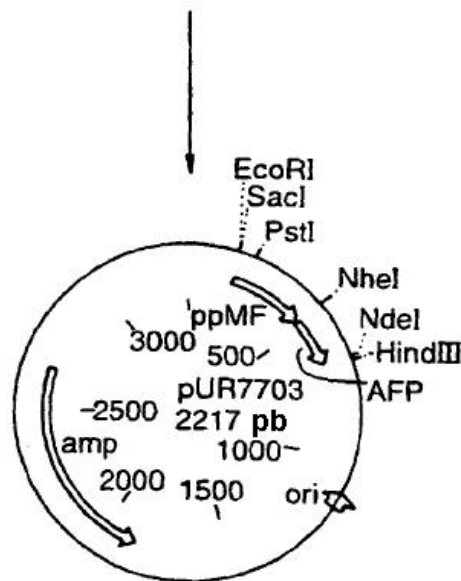
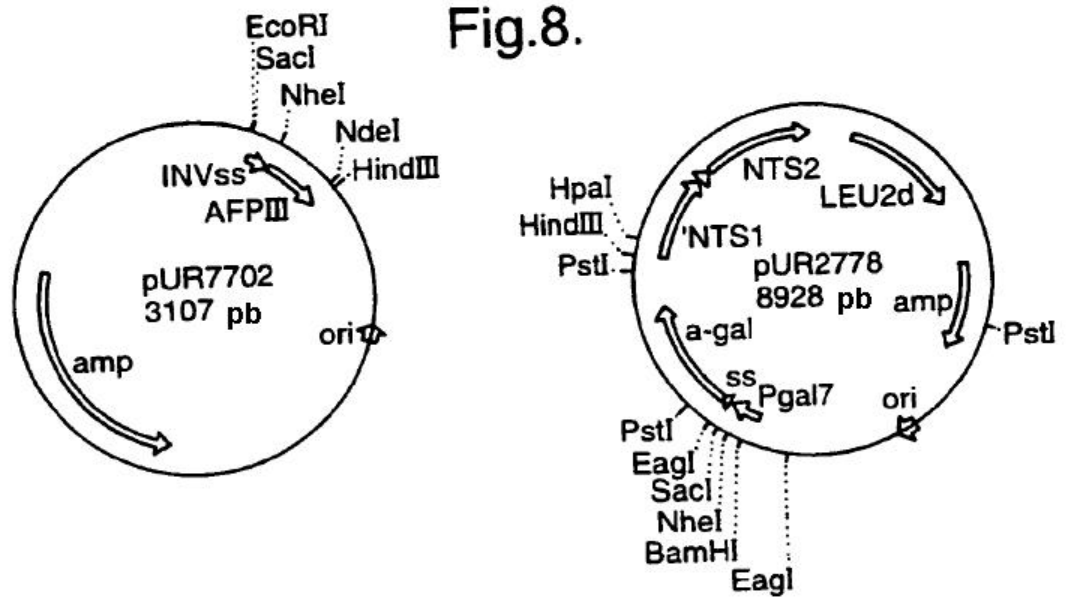


Fig.8.



Cortar con *SacI*/*HindIII*

Ligar el fragmento de *SacI*/*HindIII* de 278 pb de pUR7702

con el fragmento de 7295 pb de pUR2778<sup>3</sup>

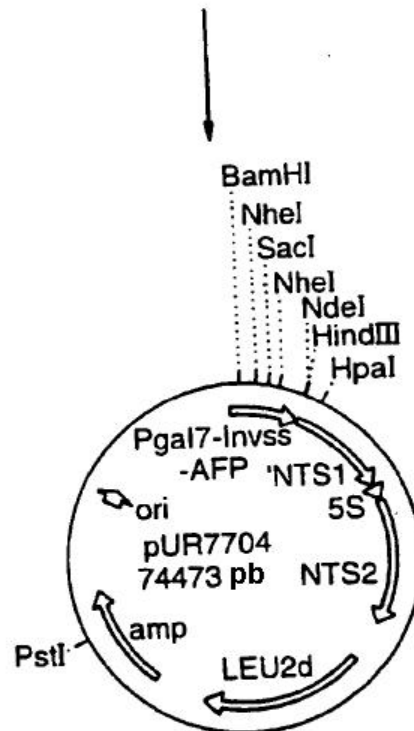
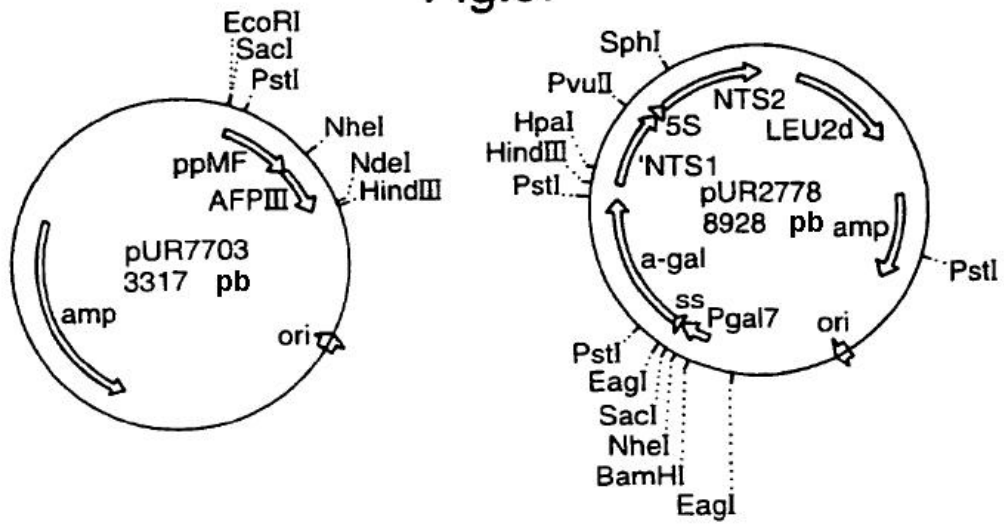


Fig.9.



Cortar con SacI/HindIII y ligar el fragmento de 488 pb  
de pUR7703 con el fragmento de 7295 pb  
de pUR2778

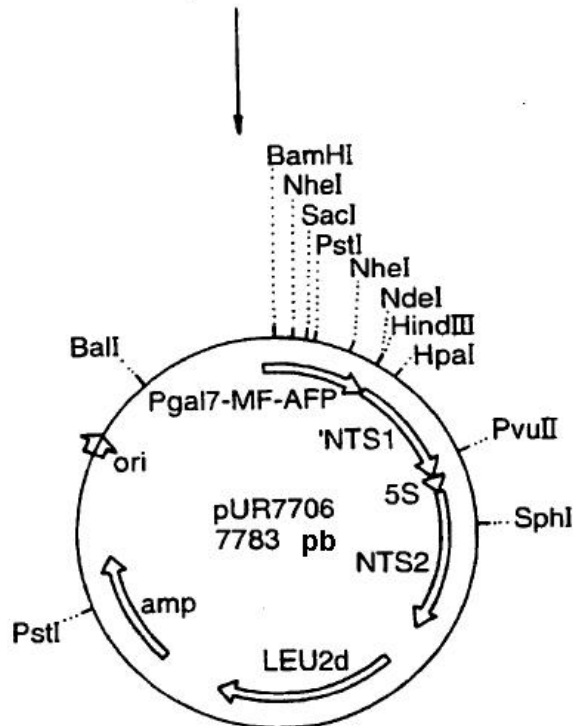


Fig.10.

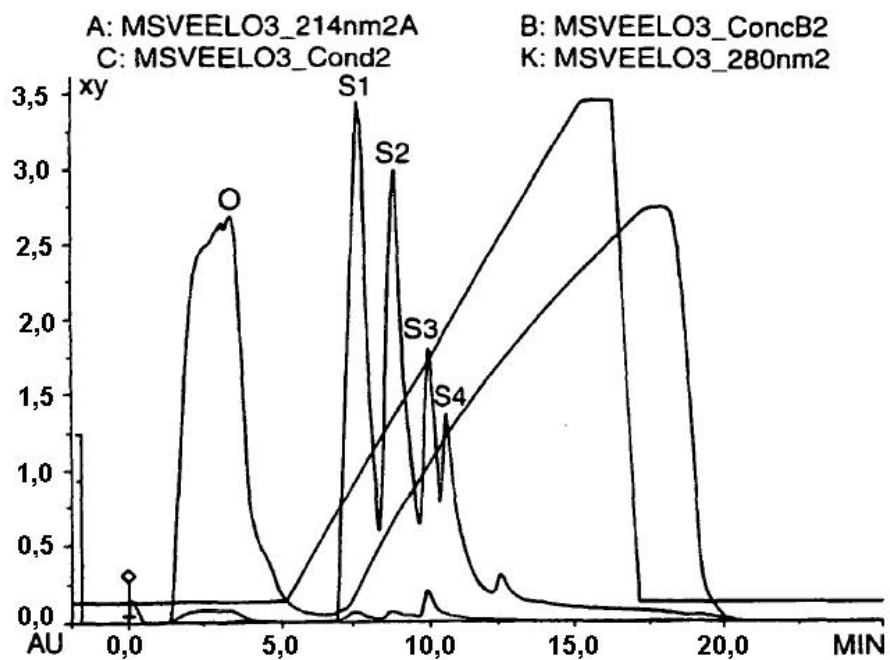


Fig.11.

A: RPAFP317\_214nm2A@A.CUT C: RPAFP317\_280nm2B@K.CUT  
B: RPAFP317\_ConcB2@B.CUT

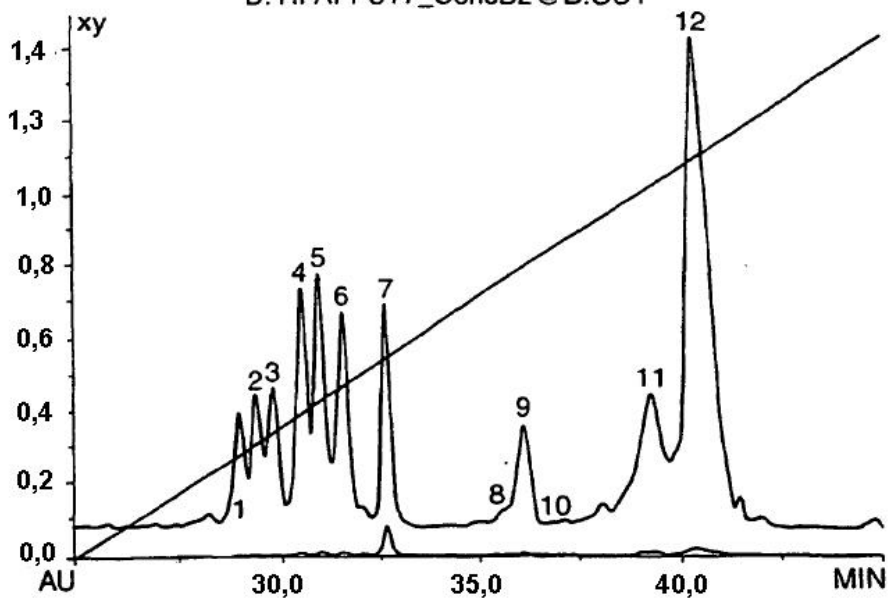


Fig.12.

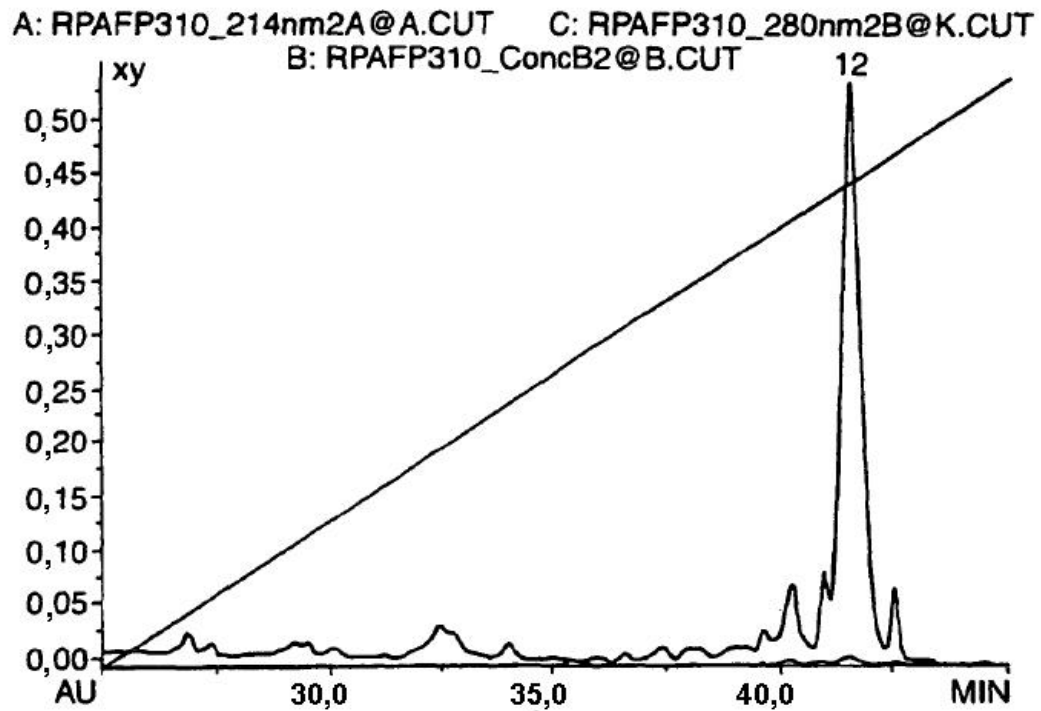


Fig.13.

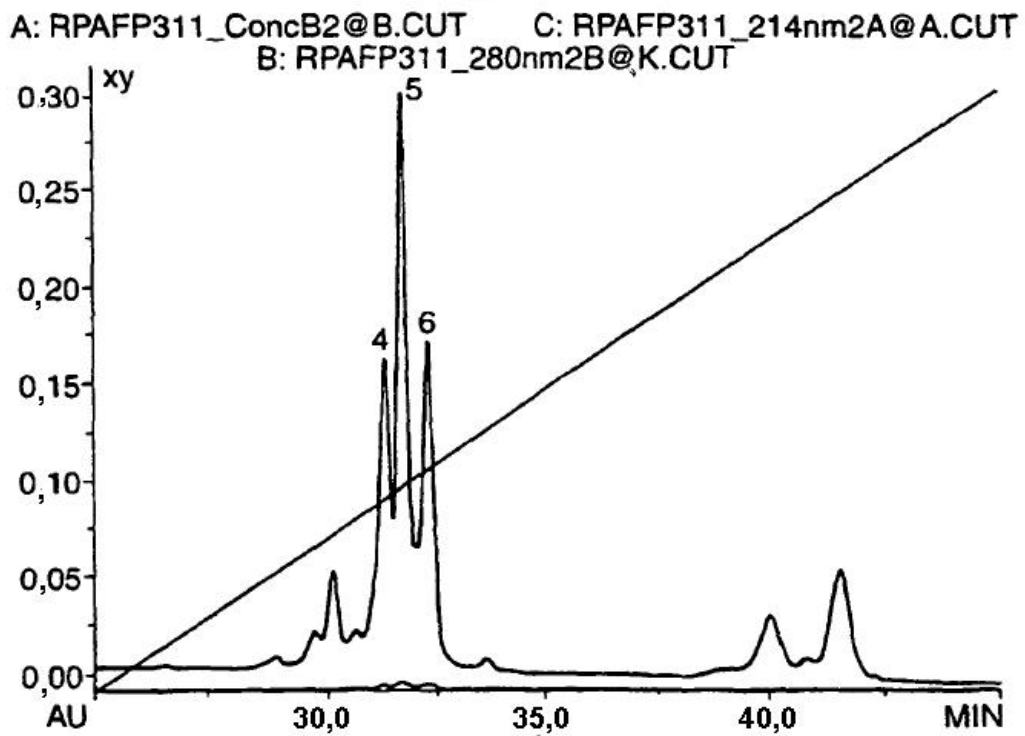


Fig.14.

D: RPAFP338\_280nm 2A@A.CUT H: RPAFP338\_214nm2B@K.CUT  
F: RPAFP338\_ConcB2@B.CUT

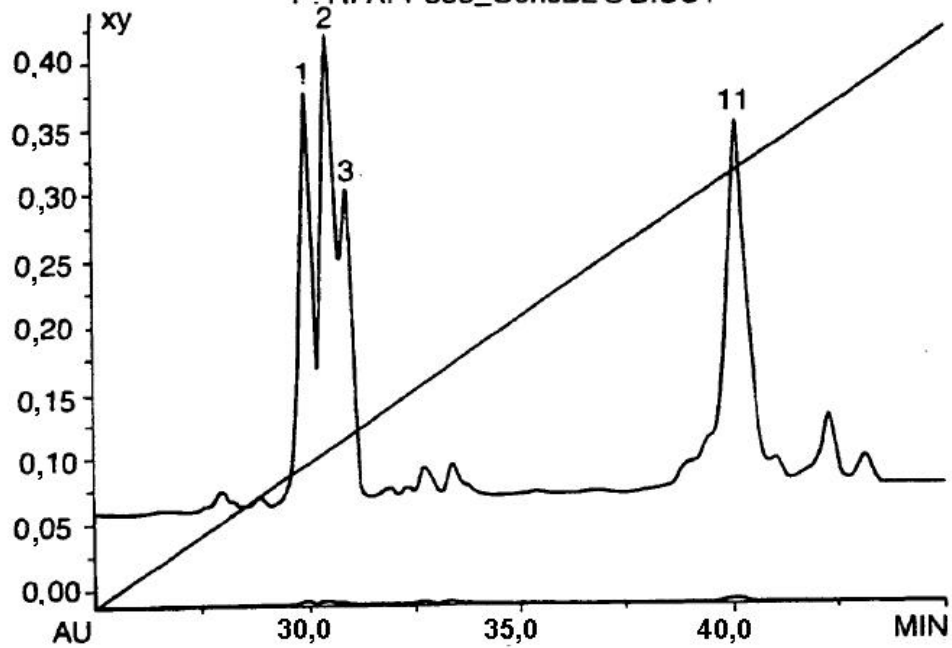
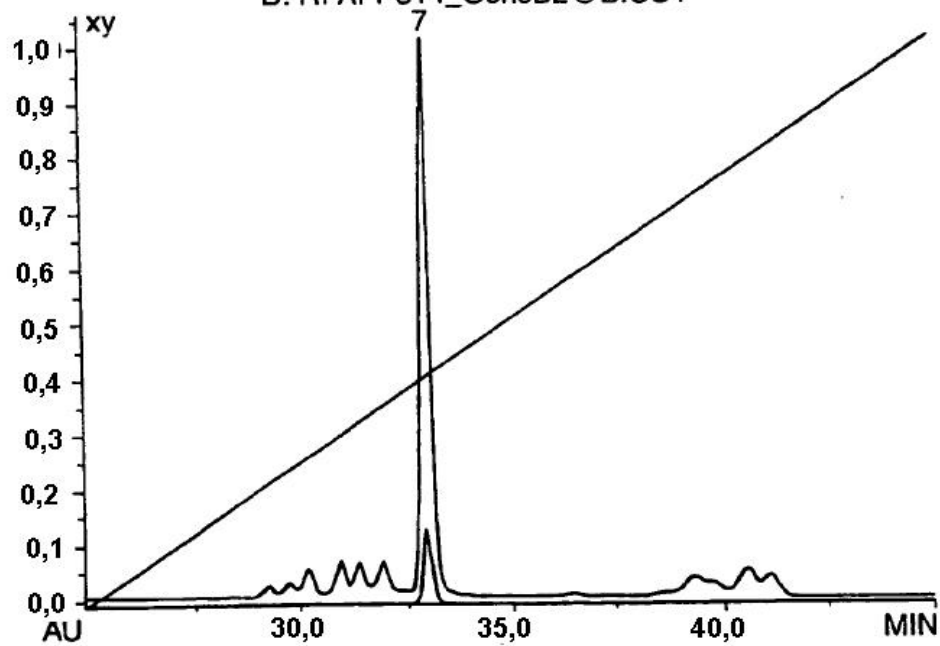


Fig.15.

A: RPAFP314\_214nm2A@A.CUT C: RPAFP314\_280nm2B@K.CUT  
B: RPAFP314\_ConcB2@B.CUT



**Fig.16.**

A: RPAFP315\_214nm2A@A.CUT      C: RPAFP315\_280nm2B@K.CUT  
 B :RPAFP315\_ConcB2@B.CUT

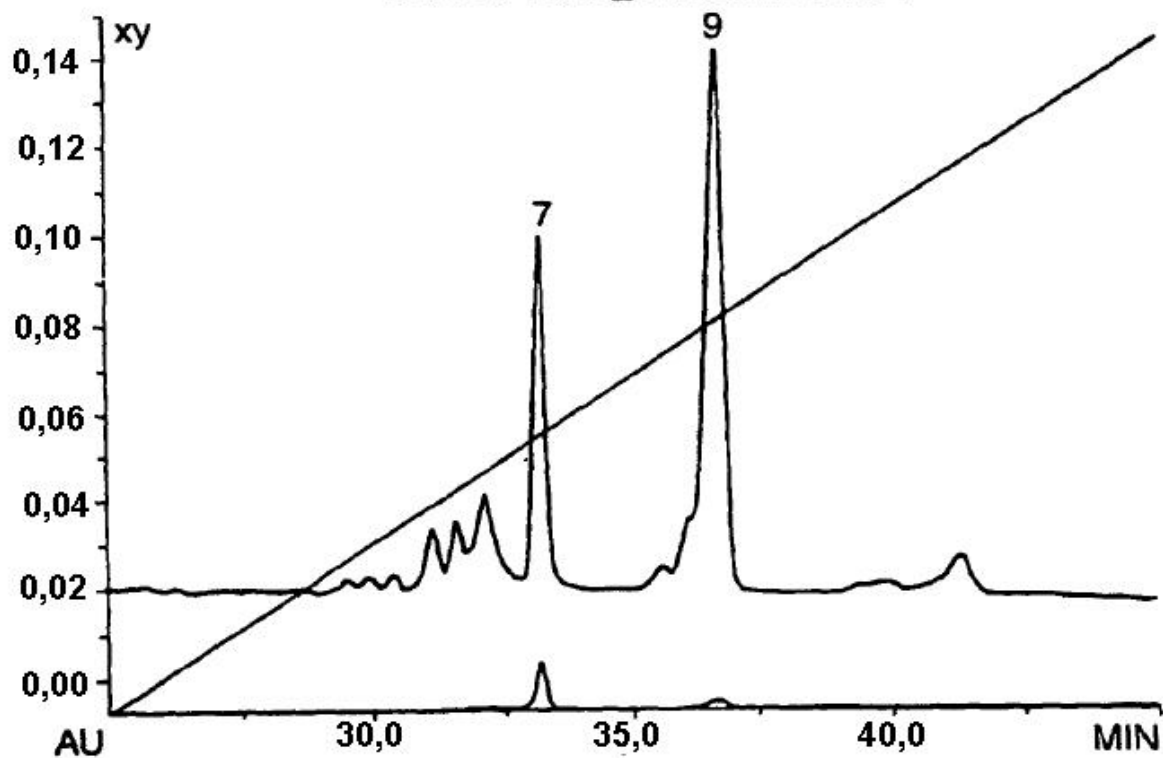




Fig.17.

```

SacI  <      HPLC12.1      ><      HPLC12.2      ><
1  CATCACACAACAACAACAATGATGCTTTTGCAGCCCTTCCTTTTGGCTGGTTTGCAGCCAAATATCTGCTA  90
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  90
   TCGAGTAGTGTTGTTGTTGTTGTTTACTACGAACGTTTCGGAAGGAAGAAACCGAACCGTTCGGTTTATAGACGAT
   H H T N K Q N K M M L L Q A F L F L L A G F A A K I S A
   < HPLC12.8      >< HPLC12.9      >< HPLC12.10     ><

HPLC12.3      ><      HPLC12.4      ><
91 ATCAAGCCTCTGTTGTTGCTAATCAATGATTCCAATAACTGCTTTGACTCTAGTTATGATGAGAAGTGAAGTTGTACTCCAGTTG  180
91 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  180
   TAGTTCGGAGACAACAACGATTAGTTAACTAAGGTTATTATGACGAACCTGAGATCAATACIACCTCTTCACTTCAACAATGAGGTCAAC
   N Q A S V V A N Q L I P I N T A L T L V M M R S E V V T P V
   >< HPLC12.11     >< HPLC12.12     ><

HPLC12.5      ><      HPLC12.6      ><
181 GTATTCCAGCTGAAGATATCCCTAGACTTGTGTAGTATGCAAGTTAATAGAGCAGTTCCTTTGGGTACCACICTTATGCCAGATATGGTTA  270
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  270
   CATAAGGTGCGACTTCTATAGGGATCTGAACAAATCATACGTTCAATTATCTCGTCAAGGAACCCCATGGTGAGAAATACGGTCTATACCAAT
   G I P A E D I P R L V S M Q V N R A V P L G T I L M P D M V
   >< HPLC12.13     >< HPLC12.14     ><

HPLC12.7      >
271 AAGGTTATCCTCTGCTTAGTCTTCA      303
271 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  303
   TTCCAATAGGAGGACGAATCAGAAGTTCGA
   K G Y P P A * S S
   >< HPLC12.15     > HindIII

```

Fig.18.

