

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 806**

51 Int. Cl.:

C07K 14/39 (2006.01)

C07K 14/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2008** **E 08845087 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015** **EP 2210940**

54 Título: **Método para la secreción y producción de alto nivel de proteína**

30 Prioridad:

31.10.2007 JP 2007283731

06.11.2007 JP 2007288845

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

12.06.2015

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)

3-5-1, NIHOMBASHI-HONCHO

CHUO-KU, TOKYO 103-8426, JP

72 Inventor/es:

CHIBA, YASUNORI;

JIGAMI, YOSHIFUMI;

TAKAHASHI, YOSHIE;

KURODA, KOSUKE;

KOBAYASHI, KAZUO;

ICHIKAWA, KIMIHISA;

NONAKA, KOICHI;

SUZUKI, TAKESHI y

ONO, MINAKO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 537 806 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

Método para la secreción y producción de alto nivel de proteína

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para la producción secretora de alto nivel de una proteína, principalmente en levadura.

10 **Técnica anterior**

Cuando se expresan proteínas secretoras, las secuencias señal de las mismas se reconocen por partículas de reconocimiento de señales (SRP), y las proteínas secretoras pasan entonces a través del translocón y entran en el retículo endoplásmico. Cuando las proteínas secretoras pasan a través del translocón, las estructuras de orden superior del mismo se sueltan y las proteínas se pliegan en el retículo endoplásmico (ER). El plegamiento de proteínas puede producirse espontáneamente y diversas chaperonas moleculares ayudan en tal plegamiento. Una conformación nativa formada en el retículo endoplásmico es crítica para la secreción, y las proteínas con un plegamiento erróneo no pueden entrar en la ruta secretora ubicada de manera posterior. Cuando las proteínas no se pliegan correctamente en el retículo endoplásmico, de manera desventajosa se agregan en el mismo proteínas que tienen estructuras de orden superior anómalas. Tal alteración en la modificación que tiene lugar en el retículo endoplásmico (es decir, la adición de una cadena de azúcar o un enlace disulfuro) y el transporte deteriorado desde el retículo endoplásmico provocan "estrés del retículo endoplásmico". Como medio para abordar tal estrés del retículo endoplásmico, se induce una respuesta de estrés denominada "respuesta de proteínas desplegadas (UPR)" en células eucariotas. La inducción de transcripción y la regulación de la traducción de UPR son respuestas que restablecen las proteínas anómalas acumuladas. También existe un mecanismo denominado "degradación asociada a ER (ERAD)" que degrada y elimina las proteínas anómalas, para mantener la homeostasis en el retículo endoplásmico. Además, se conocen chaperonas moleculares que sueltan las proteínas agregadas con el propósito del plegamiento, así como chaperonas moleculares que ayudan en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico. Por ejemplo, HSP104 puede realizar una reacción que no puede realizarse con la ayuda de otras chaperonas que actúan conjuntamente con HSP70 y solubiliza proteínas de los agregados (Glover JR, Lindquist S, Hsp104, Hsp70 and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins, Cell, 1998, 94:73-82).

Entre tanto, las moléculas de anticuerpo forman agregados de una conformación apropiada (H2L2) a través de la formación de un enlace disulfuro entre la cadena pesada de anticuerpo y la cadena ligera de anticuerpo o entre cadenas pesadas de anticuerpo y formando un enlace disulfuro intramolecular de la cadena pesada de anticuerpo y la cadena ligera de anticuerpo. En el caso de células eucariotas tales como células de levadura, la introducción de un enlace disulfuro a través de plegamiento oxidativo de proteínas se lleva a cabo mediante la proteína disulfuro isomerasa (PDI) oxidativa en el retículo endoplásmico (Benjamin P. Tu y Jonathan S. Weissman, Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences, J. Cell Biol., 2004, 164: 341-346). La PDI que se reduce por medio de oxidación de proteínas sustrato se reoxida mediante ERO1 oxidativa ubicada en la proximidad de la membrana (Mezghrani, A., Fassio, A., Benham, A., Simmen, T., Braakman, I. y Sitia, R., Manipulation of oxidative protein folding and PDI redox state in mammalian cells, EMBO. J., 2001, 20: 6288-6296 y Frand, A. R. y C. A. Kaiser, Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum, Mol. Cell, 1999, 4: 469-477). En el retículo endoplásmico de levaduras hay 5 tipos de familias de PDI (es decir, PDI1, EUG1, MPD1, MPD2 y EPS1) (Per Norgaard, Vibeke Westphal, Christine Tachibana, Lene Alsoe, Bjorn Holst, Jakob R. Winther, Functional Differences in Yeast Protein Disulfide Isomerases, J. Cell Biology, 2001, 152 (3): 553-562). De entre tales familias de PDI, aquellas para las que se confirma que forman un enlace disulfuro intramolecular con ERO1 se limitan a PDI1 y MPD2. También se notifica que la eficacia de plegamiento oxidativo de proteínas se mejora mediante BiP/Kar2, que funciona en cooperación con PDI (Marcus Mayer, Ursula Kies, Robert Kammermeier y Johannes Buchner, BiP and PDI Cooperate in the Oxidative Folding of Antibodies in Vitro, J. Biol. Chem., 2000, 275 (38): 29421-29425). BiP/Kar2 también está asociada con la inducción mediante la HAC1 activa de diversos genes asociados con la UPR mencionada anteriormente. La HAC1 activa se activa mediante el corte y empalme de HAC1 mediante la nucleasa/cinasa transmembrana IRE1. La IRE1 a la que se ha unido BiP/Kar2 se disocia cuando BiP/Kar2 actúa sobre una proteína que tiene una estructura anómala en el retículo endoplásmico, presenta una actividad nucleasa a través de la formación de un dímero y produce HAC1 activa mediante el corte y empalme de HAC1 (Cox JS., Shamu CE., Walter P., Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase, Cell, 1993, 73: 1197-1206 y Sidrauski C. y Walter P., The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response, Cell, 1997, 90 (6): 1031-1039). Además, Bip/Kar2 se asocia con plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico en cooperación con SCJ1 ubicada en el retículo endoplásmico (Susana Silberstein, Gabriel Schlenstedt, Pam A. Silver y Reid Gilmore, A Role for the DnaJ Homologue Scj1p in Protein Folding in the Yeast Endoplasmic Reticulum, J. Cell Biol., 1998, 143 (4): 921-933).

Por tanto, se ha demostrado que diversas chaperonas moleculares están asociadas con el plegamiento correcto de proteínas secretoras. Además, se han hecho intentos para aumentar la cantidad de proteínas secretoras producidas

con la ayuda de chaperonas moleculares. Cuando un enlace S-S produce abundante albúmina sérica humana en la levadura *K. lactis*, por ejemplo, la cantidad de producción aumenta 15 veces tras la introducción de ERO1 o PDI1 (Tiziana Lodi, Barbara Neglia y Claudia Donnini, Secretion of human serum albumin by *Kluyveromyces lactis* overexpressing KIPDI1 and KIERO1, *Applied. Environ. Microbiol.*, 2005, 71 (8): 4359-4363). Sin embargo, la introducción simultánea de ERO1 y PDI1 no conduce a una mejora adicional y simplemente adelanta el momento de producción. Además, IL-1 β sin enlace S-S no produce ningún efecto. También se ha notificado que la cantidad de producción secretora aumentó 8 veces por medio de la coexpresión de Bip y PDI de rata, cuando se producen fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) en *S. cerevisiae* (Shusta, E. V., Raines, R. T., Pluckthun, A. y Wittrup, K. D., Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments, *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16: 773-777). En este informe, se concluyó que Bip impide la agregación y se aumentó la cantidad de producción secretora de PDI mediante la actividad isomerasa en lugar de actividad chaperona. Cuando se producen fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) en *Pichia pastoris*, además, la cantidad de producción secretora aumentó 3 veces por medio de la coexpresión con Bip; sin embargo, el uso de PDI o PDI en combinación con Bip no pudo producir ningún efecto (Damasceno, Leonardo, *et al.*, Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Applied. Microbic. Biotech.* (2007) 74(2): 381-389). Además, se inspeccionaron los efectos de un nivel aumentado de PD1 sobre la secreción de IL-15 y el receptor del factor de necrosis tumoral (es decir, la proteína de fusión con Fc (TNFR:Fc)) en células CHO. Como resultado, la sobreexpresión de PDI permitió la retención de TNFR:Fc (es decir, proteínas ricas en enlaces disulfuro) en las células, pero no se retuvo IL-15 en las células (Davis R., Schooley K., Rasmussen B., Thomas J., Reddy P., Effect of PDI overexpression on recombinant protein secretion in CHO cells. *Biotechnol. Prog.*, 2000, 16: 736-743). Esto sugiere que la sobreexpresión de PDI da como resultado de manera desventajosa una disminución en la cantidad de producción secretora en células CHO.

Tal como se describió anteriormente, se han hecho intentos para mejorar la producción secretora de proteínas tales como anticuerpos por medio de la coexpresión de chaperonas moleculares que ayudan en el plegamiento de proteínas. Sin embargo, no siempre pueden obtenerse efectos debido a los tipos o las combinaciones de células huésped o chaperonas moleculares. En un ejemplo de producción de anticuerpo, simplemente se producen anticuerpos de cadena sencilla, y aún no se ha descubierto un método para producir de manera eficaz proteínas de alto peso molecular o proteínas agregadas, incluyendo anticuerpos completos.

El documento US20060148039 da a conocer una cepa recombinante de levadura *O. minuta* transformada con el gen PDI de *S. cerevisiae* que codifica para la chaperona proteína disulfuro isomerasa y el uso un sistema de expresión de este tipo para mejorar la secreción de glicoproteínas que contienen cadenas de azúcar de tipo mamífero, como los anticuerpos humanos.

Descripción de la invención

En su sentido más amplio, la invención se refiere al contenido definido en las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, la presente invención pretende proporcionar un medio para la producción secretora de alto nivel de proteínas y, más particularmente, proteínas que tienen estructuras complicadas, tales como anticuerpos, en levadura u otras células huésped.

Los presentes inventores han realizado estudios concentrados con el fin de alcanzar el objeto anterior. Como resultado, descubrieron que la coexpresión de uno o más tipos de genes de chaperonas moleculares con las dianas de expresión (es decir, genes de proteínas foráneas) en levadura u otras células huésped daba como resultado un aumento en la cantidad de producción secretora de proteínas foráneas. Además, descubrieron que la actividad de la proteína O-manosiltransferasa (PMT) asociada con la adición de cadena de O-azúcar a una proteína específica de levadura, que inhibe la agregación de heteromultímeros tales como anticuerpos, puede inhibirse para mejorar adicionalmente la productividad aproximadamente de 2 a 45 veces. La presente invención se ha completado basándose en tales hallazgos.

Específicamente, la presente descripción incluye lo siguiente.

(1) Una célula huésped transformada en la que se han introducido uno o una combinación de dos o más de los genes de chaperonas (a) a (c) a continuación:

(a) un gen que comprende ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 ó 13;

(b) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 ó 13 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas; y

(c) un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 80% con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 ó 13 y que codifica para una proteína que tiene

una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas.

(2) Una célula huésped transformada en la que se han introducido uno o una combinación de dos o más de los genes que codifican para las proteínas chaperonas (d) a (f) a continuación:

(d) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14;

(e) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 80% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14 y que tiene una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas; y

(f) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y que tiene una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas.

(3) Una célula huésped transformada en la que se han introducido uno o una combinación de dos o más de los genes de chaperonas (g) o (h) a continuación;

(g) un gen que codifica para PDI1, MPD1, SCJ1, ERO1, FKB2, JEM1, LHS1, MPD2, ERJ5 o EUG1 derivado de *S. cerevisiae* o un gen homólogo del mismo; o

(h) un gen que codifica para PDI, ERO1-L α , ERO1-L β o GRP78 derivado de ser humano, un gen homólogo del mismo o un gen con codones modificados del mismo.

(4) Una célula huésped transformada en la que se ha introducido un gen seleccionado del grupo que consiste en uno o una combinación de dos o más de los genes de chaperonas (i) a (xii) a continuación, un gen homólogo del mismo o un gen con codones modificados del mismo:

(i) un gen que codifica para PDI1 derivado de *O. minuta*;

(ii) un gen que codifica para PDI1 derivado de *S. cerevisiae*;

(iii) un gen que codifica para PDI derivado de ser humano;

(iv) un gen que codifica para ERO1 derivado de *O. minuta*;

(v) un gen que codifica para ERO1 derivado de ser humano;

(vi) un gen que codifica para Kar2 derivado de *O. minuta*;

(vii) un gen que codifica para PDI1 y un gen que codifica para ERO1 derivados de *O. minuta*;

(viii) un gen que codifica para PDI1 y un gen que codifica para Kar2 derivados de *O. minuta*;

(ix) un gen que codifica para PDI derivado de ser humano y un gen que codifica para ERO1 derivado de *O. minuta*;

(x) un gen que codifica para PDI1, un gen que codifica para ERO1 y un gen que codifica para Kar2 derivados de *O. minuta*;

(xi) un gen que codifica para PDI1, un gen que codifica para ERO1-L β y un gen que codifica para GRP78 derivados de ser humano; y

(xii) un gen que codifica para PDI derivado de ser humano, un gen que codifica para ERO1 derivado de *O. minuta* y un gen que codifica para GRP78 derivado de ser humano.

(5) La célula huésped transformada según cualquiera de (1) a (4), en la que la célula huésped es una célula eucariota.

(6) La célula huésped transformada según (5), en la que la célula eucariota es una célula de levadura.

(7) La célula huésped transformada según (6), en la que la levadura es una levadura asimiladora de metanol.

(8) La célula huésped transformada según (7), en la que la levadura asimiladora de metanol es *Ogataea minuta*.

(9) La célula huésped transformada según (6), en la que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

(10) La célula huésped transformada según cualquiera de (1) o (9), en la que se ha introducido un gen que codifica para una proteína foránea.

(11) La célula huésped transformada según (10), en la que la proteína foránea es una proteína multimérica.

(12) La célula huésped transformada según (11), en la que la proteína multimérica es un heteromultímero.

(13) La célula huésped transformada según (12), en la que el heteromultímero es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

(14) La célula huésped transformada según (10), en la que la proteína foránea es glicosiltransferasa.

(15) Un método para producir una proteína que comprende cultivar la célula huésped transformada según cualquiera de (10) a (14) en un medio y tomar una muestra de una proteína diana del producto de cultivo.

(16) El método para producir una proteína según (15), en la que cultivo se lleva a cabo en condiciones en las que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT).

(17) El método para producir una proteína según (16), en la que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) con la adición de un inhibidor de la actividad PMT al medio.

(18) El método para producir una proteína según (17), en la que el inhibidor de la actividad PMT es ácido 5-[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metil]-4-oxo-2-tio-3-tiazolidinacético.

(19) El método para producir una proteína según (16), en la que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) por medio de la destrucción del gen PMT.

(20) El método para producir una proteína según (16), en la que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) por medio de la destrucción del gen PMT y con la adición de un inhibidor de la actividad PMT al medio.

(21) El método para producir una proteína según (20), en la que el inhibidor de la actividad PMT es ácido 5-[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metil]-4-oxo-2-tio-3-tiazolidinacético.

(22) El método para producir una proteína según cualquiera de (19) a (21), en la que destrucción del gen PMT es una destrucción simple del gen PMT5 o el gen PMT6 o una destrucción doble del gen PMT5 y el gen PMT6.

(23) Cualquiera de los genes de chaperonas (a) a (c) a continuación derivados de *Ogataea minuta*:

(a) un gen que comprende ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 ó 13;

(b) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 ó 13 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas; y

(c) un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 80% con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 ó 13 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas.

(24) Un gen que codifica para cualquiera de las proteínas chaperonas (d) a (f) a continuación:

(d) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14;

(e) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 80% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14 y que tiene una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas; y

(f) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos y que tiene una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas.

(25) Un vector de expresión que comprende el gen según (23) o (24).

(26) Un vector de expresión que comprende el gen (g) o (h) a continuación:

(g) un gen que codifica para PDI1, MPD1, SCJ1, ERO1, FKB2, JEM1, LHS1, MPD2, ERJ5 o EUG1 derivado de *S.*

cerevisiae o un gen homólogo del mismo; o

(h) un gen que codifica para PDI, ERO1-L α , ERO1-L β o GRP78 derivado de ser humano, un gen homólogo del mismo o un gen con codones modificados del mismo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la construcción de vectores de expresión para diversas proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (onaP03606, onaP09407, onaP09507, onaP09607 y onaP09707).

La figura 2 muestra la construcción del vector de coexpresión (onaP11107) para una proteína chaperona derivada de ser humano (PDI humana con codones modificados) y para una proteína chaperona derivada de *O. minuta* (OmERO1).

La figura 3 muestra la construcción del vector de expresión de OmKar2 (pOU1/Kar2-Ppt) por medio de la regulación del promotor de PGK.

La figura 4 muestra la construcción del vector de coexpresión (onaP11007) para tres tipos de proteínas chaperonas (OmPDI1, OmERO1 y OmKar2) derivadas de *O. minuta*.

La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de medir la cantidad de anticuerpos secretados de una cepa de levadura productora de anticuerpo (es decir, la cepa ona02306) cultivada con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c) (1: sin adición de 1c; 2: se añadieron 100 μ l de medio que contenía 1c 20 μ M el día 3; 3: se añadieron 100 μ l de medio que contenía 1c 20 μ M el día 2 y el día 3).

La figura 6 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western de anticuerpos secretados en el sobrenadante de cultivo de una cepa de levadura productora de anticuerpo (es decir, la cepa ona02306) cultivada con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c) (1: sin adición de 1c; 2: se añadieron 100 μ l de medio que contenía 1c 20 μ M el día 3; 3: se añadieron 100 μ l de medio que contenía 1c 20 μ M el día 2 y el día 3).

La figura 7 es un gráfico que muestra los resultados de medir la cantidad de anticuerpos secretados de una cepa de levadura productora de anticuerpo (cultivada con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c)) en la que se había introducido un gen de una única proteína chaperona (SCJ1, EUG1, ERO1, Kar2, MPD1, PDI1 y HSP104) derivada de una cepa de *O. minuta*.

La figura 8 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western de anticuerpos secretados en el sobrenadante de cultivo de una cepa de levadura productora de anticuerpo (cultivada con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c)) en la que se había introducido un gen de una única proteína chaperona (SCJ1, EUG1, ERO1, Kar2, MPD1, PDI1 y HSP104) derivada de una cepa de *O. minuta* (parte superior: SDS-PAGE/WB en condiciones reductoras; se detectan simultáneamente Hc de anticuerpo y Lc de anticuerpo; parte inferior: SDS-PAGE/WB en condiciones no reductoras; se detecta Lc de anticuerpo).

La figura 9 es un gráfico que muestra los resultados de medir la cantidad de anticuerpos secretados de una cepa de levadura productora de anticuerpo (cultivada con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c)) en la que se habían introducido genes de una pluralidad de proteínas chaperonas (2xPDI1, PDI1/HSP104, PDI1/Kar2 y PDI1/ERO1) derivadas de una cepa de *O. minuta*.

La figura 10 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western de anticuerpos secretados en el sobrenadante de cultivo de una cepa de levadura productora de anticuerpo (cultivada con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c)) en la que se habían introducido genes de una pluralidad de proteínas chaperonas (2xPDI1, PDI1/HSP104, PDI1/Kar2 y PDI1/ERO1) derivadas de una cepa de *O. minuta* (parte superior: SDS-PAGE/WB en condiciones reductoras; se detectan simultáneamente Hc de anticuerpo y Lc de anticuerpo; parte inferior: SDS-PAGE/WB en condiciones no reductoras; se detecta Lc de anticuerpo).

La figura 11 es un gráfico que muestra los resultados de medir la cantidad de anticuerpos secretados de una cepa de levadura productora de anticuerpo (cultivada con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c)) en la que se habían introducido genes de proteínas chaperonas (PDI1) derivadas de *S. cerevisiae*, de ser humano y de ser humano sintetizadas.

La figura 12 es un gráfico que muestra los resultados de medir la cantidad de anticuerpos secretados de una cepa de levadura productora de anticuerpo (cultivada con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c)) en la que se habían introducido combinaciones de genes de tres tipos de proteínas chaperonas derivadas de una cepa de *O. minuta* (PDI1/EPO1/Kar2) y genes de proteínas chaperonas derivadas de diferente especies (PDI/OmERO1 humanas).

La figura 13 muestra la construcción de un vector de expresión de anticuerpo, YEp352GAP-II-ScKarHc/ScKarLc.

La figura 14 es un gráfico que muestra los resultados de medir la cantidad de anticuerpos secretados de una cepa de levadura productora de anticuerpo (cultivada con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c)) en la que se había introducido el gen de la proteína chaperona (PDI1) derivada de *S. cerevisiae*.

La figura 15 muestra cambios en los valores de actividad para la ácido siálico transferasa (ST3Gal1) expresada en una cepa (YT-2) en la que no se había introducido el gen de proteína chaperona derivada de *O. minuta* (PDI1) y en una cepa (YT-3) en la que se había introducido el gen PDI1 con el transcurso del tiempo.

La figura 16 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western de ácido siálico transferasa (ST3Gal1) expresada en una cepa (YT-2) en la que no se había introducido el gen de proteína chaperona derivada de *O. minuta* (PDI1) y en una cepa (YT-3) en la que se había introducido el gen PDI1.

La figura 17 muestra cambios en los valores de actividad para la ácido siálico transferasa (ST3Gal1) expresada en cepas (YT-4, YT-5, YT-6 e YT-7) en las que se habían introducido genes de las proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (PDI1x2, PDI1/OmKar2, PDI1/ERO1 y PDI1/HSP104) con el transcurso del tiempo.

La figura 18 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western de ácido siálico transferasa (ST3Gal1) expresada en cepas (YT-4, YT-5, YT-6 e YT-7) en las que se habían introducido genes de las proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (PDI1x2, PDI1/OmKar2, PDI1/ERO1 y PDI1/HSP104).

La figura 19 es un gráfico que muestra los resultados de medir la cantidad de anticuerpos secretados de una línea celular animal productora de anticuerpo (es decir, la célula COS-1) en la que se habían introducido genes de las proteínas chaperonas derivadas de células CHO (CHOBiP y CHOPDI) y la proteína chaperona derivada de ser humano (hERO1-L β).

La figura 20 es un gráfico que muestra los resultados de medir la cantidad de anticuerpos secretados de una cepa de levadura productora de anticuerpo (cultivada con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c)) en la que se habían introducido genes de las proteínas chaperonas derivadas de ser humano (PDI, ERO1-L α , ERO1-L β y GRP78).

La figura 21 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western de anticuerpos secretados en el sobrenadante de cultivo de cepas de levadura productoras de anticuerpo (cultivadas con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c)) en las que se habían introducido genes de las proteínas chaperonas derivadas de ser humano (PDI, ERO1-L α , ERO1-L β y GRP78).

La figura 22 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western obtenidos cuando se expresa la lisozima humana fusionada a señal aMF de levadura en cepas en las que se había introducido el vector de coexpresión para tres tipos de las proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (OmPDI1, OmERO1 y OmKar2) o el vector de coexpresión para tres tipos de las proteínas chaperonas derivadas de ser humano (hPDI sintetizada, hERO1-L β sintetizada y hGRP78 sintetizada).

La figura 23 es un gráfico que muestra los resultados de medir la cantidad de anticuerpos secretados cuando se cultiva con o sin la adición de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c) en cepas preparadas introduciendo vectores de coexpresión para tres tipos de las proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (OmPDI1, OmERO1 y OmKar2) y un gen de anticuerpo en una cepa en la que se habían destruido los genes PMT.

La figura 24 es una fotografía que muestra los resultados de observación con microscopio electrónico de barrido de la cepa de *O. minuta* en la que se había destruido el gen PMT.

La figura 25 es una fotografía que muestra los resultados de observación con microscopio electrónico de transmisión de la cepa de *O. minuta* en la que se había destruido el gen PMT.

La figura 26 muestra los resultados de examinar la concentración de un inhibidor de O-manosilación (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c) que se ha añadido a una cepa preparada introduciendo vectores de coexpresión para tres tipos de las proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (OmPDI1, OmERO1 y OmKar2) y un gen de anticuerpo en la cepa de *O. minuta* en la que se había destruido el gen PMT4.

La figura 27 muestra patrones de elución de cromatografía de exclusión molecular (SEC)-HPLC de diversos anticuerpos purificados producidos a partir de *O. minuta*.

La figura 28 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western tras electroforesis en

condiciones no reductoras de diversos anticuerpos purificados producidos a partir de *O. minuta*.

La figura 29 es un gráfico que muestra los resultados de medir la actividad citotóxica de diversos anticuerpos purificados producidos a partir de *O. minuta*.

La figura 30 es un gráfico que muestra los resultados de medir la actividad citotóxica de diversos anticuerpos purificados producidos a partir de *O. minuta*.

A continuación en el presente documento se describe en detalle la presente invención.

1. Gen usado para la producción secretora de alto nivel de una proteína

La producción secretora de alto nivel de una proteína en la presente invención implica el uso de un gen que codifica para un conjunto de chaperonas moleculares (a continuación en el presente documento tal gen se denomina “gen de chaperonas”) que funciona en el plegamiento de proteínas y la inhibición de la degradación o la agregación de una proteína desnaturalizada en el retículo endoplásmico.

En la invención, se usa una combinación de dos o más de los genes de chaperonas (a) a (c) o (d) a (f):

(a) un gen que comprende ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1;

(b) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas, en la que las condiciones rigurosas comprenden una concentración de sodio de 15 a 750 mM, una temperatura de 25°C a 70°C, una concentración de formamida del 0% al 50%, lavándose el filtro a una concentración de sal de sodio de 15 a 600 mM y a una temperatura de 50°C a 70°C tras la hibridación; o

(c) un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas, en la que la homología se determina usando un programa FASTA o BLAST, o

(d) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

(e) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas, en la que la homología se determina usando un programa FASTA o BLAST; o

(f) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 mediante delección, sustitución y/o adición de uno a 10 aminoácidos y que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas.

Los ejemplos de genes de chaperonas que se usan en la presente descripción incluyen genes PDI1, MPD1, SCJ1, EUG1, ERO1, HSP104 y Kar2 derivados de la cepa de *Ogataea minuta* (*O. minuta*), que se obtuvieron recientemente en la presente invención. Los genes PDI1, MPD1, SCJ1, EUG1, ERO1, HSP104 y Kar2 derivados de *Ogataea minuta* (*O. minuta*) consisten cada uno en una secuencia de nucleótidos mostrada en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 ó 13, y secuencias de aminoácidos deducidas basadas en tales secuencias de nucleótidos son tal como se muestran en las en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14.

El gen de chaperonas usado en la presente descripción puede ser un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14 mediante delección, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácidos, siempre que tal gen tenga una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas.

El número de aminoácidos que pueden deleccionarse, sustituirse y/o añadirse es preferiblemente de 1 a varios. El número representado por el término “varios” no está limitado de manera particular. Por ejemplo, tal número es 20 o menor, preferiblemente 10 o menor, más preferiblemente 7 o menor y más preferiblemente 5 o menor, aproximadamente. El término “mutación” usado en el presente documento se refiere principalmente a una mutación que se introduce artificialmente por medio de un método conocido para preparar una proteína mutante, y el término puede referirse a una mutación que es similar a una existente en la naturaleza.

Además, el gen de chaperonas usado en la presente descripción puede ser un gen que codifica para una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 80% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14 y que tiene una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas. El término “una homología de al menos el 80%” se refiere preferiblemente a una

homología de al menos el 85%, más preferiblemente una homología de al menos el 90% y lo más preferiblemente una homología de al menos el 95%. La búsqueda de homología entre proteínas puede llevarse a cabo con el uso de, por ejemplo, la base de datos de ADN de Japón (DDBJ) por medio de FASTA, BLAST u otros programas.

El término “actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas” usado en el presente documento se refiere a la actividad de secreción de alto nivel de una proteína foránea plegada correctamente en una célula huésped basada en la actividad de chaperonas moleculares para el plegamiento de proteínas (por ejemplo, formación de un enlace disulfuro), la actividad de replegamiento de una proteína desnaturalizada para dar una proteína normal y la actividad de inhibir la agregación de proteínas desnaturalizadas en el retículo endoplásmico.

Además, la expresión “...tiene una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas” se refiere a que tal actividad es sustancialmente equivalente a la actividad de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14.

El gen de chaperonas usado en la presente descripción puede ser un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al ADN que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 ó 13 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas.

En las “condiciones rigurosas” mencionadas anteriormente, se forma un denominado híbrido específico, pero no se forma un híbrido no específico. En tales condiciones, por ejemplo, hebras complementarias de un ácido nucleico altamente homólogo, es decir, un ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 95% con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 ó 13 experimentan hibridación, pero las hebras complementarias de un ácido nucleico que tiene niveles de homología menores no experimentarán hibridación. Más específicamente, la concentración de sodio es de 15 a 750 mM, preferiblemente de 50 a 750 mM y más preferiblemente de 300 a 750 mM, la temperatura es de 25°C a 70°C, preferiblemente de 50°C a 70°C y más preferiblemente de 55°C a 65°C, y la concentración de formamida es del 0% al 50%, preferiblemente del 20% al 50% y más preferiblemente del 35% al 45%. En condiciones rigurosas, además, generalmente se lava un filtro a una concentración de sal de sodio de 15 a 600 mM, preferiblemente de 50 a 600 mM y más preferiblemente de 300 a 600 mM, y la temperatura es de 50°C a 70°C, preferiblemente de 55°C a 70°C y más preferiblemente de 60°C a 65°C, tras la hibridación.

Un experto en la técnica puede obtener fácilmente tales genes homólogos consultando, por ejemplo, Molecular Cloning (Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10 Skyline Drive Plainview, N.Y., 1989). Además, la búsqueda de homología entre secuencias de nucleótidos puede llevarse a cabo por medio de FASTA, BLAST u otros programas.

La mutación de aminoácidos mencionada anteriormente, tal como delección, sustitución y/o adición, puede introducirse por medio de una técnica conocida en la materia, tal como el método de Kunkel o el método de dúplex con huecos, o una técnica de acuerdo con las mismas. Por ejemplo, pueden usarse kits de mutagénesis que utilizan mutagénesis dirigida al sitio, tales como un kit Mutant-K (Takara Bio), Mutant-G (Takara Bio) o uno de la serie de mutagénesis *in vitro* LA PCR (Takara Bio).

El gen de chaperonas usado en la presente descripción puede ser un gen de chaperonas derivado de otras especies de organismos, tales como otros tipos de levadura, moho o un ser humano. Como gen de chaperonas derivado de otras especies de organismos, es preferible un gen de chaperonas derivado de ser humano que corresponde al gen de chaperonas mencionado anteriormente (el gen PDI1, MPD1, SCJ1, EUG1, ERO1, HSP104 o Kar2) derivado de *Ogataea minuta*. También puede usarse un gen de chaperonas distinto de los genes de chaperonas mencionados anteriormente.

Los ejemplos de genes de chaperonas derivados de ser humano incluyen PDI (n.º de registro GenBank BC010859; SEQ ID NO: 140), ERO1-L α (n.º de registro GenBank AF081886; SEQ ID NO: 143), ERO1-L β (n.º de registro GenBank BC044573; SEQ ID NO: 146) y GRP78 (n.º de registro GenBank AL354710; SEQ ID NO: 149).

Además, los ejemplos de genes de chaperonas derivados de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen PDI1 (SGDID primario: S000000548; SEQ ID NO: 120), MPD1 (SGDID primario: S000005814; SEQ ID NO: 122), SCJ1 (SGDID primario: S000004827; SEQ ID NO: 124), ERO1 (SGDID primario: S000004599; SEQ ID NO: 126), FKB2 (SGDID primario: S000002927; SEQ ID NO: 128), JEM1 (SGDID primario: S000003609; SEQ ID NO: 130), LHS1 (SGDID primario: S000001556; SEQ ID NO: 132), MPD2 (SGDID primario: S000005448; SEQ ID NO: 134), ERJ5 (SGDID primario: S000001937; SEQ ID NO: 136) y EUG1 (SGDID primario: S000002926; SEQ ID NO: 138). La información de secuencia con respecto a los genes derivados de *Saccharomyces cerevisiae* está disponible de SGD (base de datos del genoma de *Saccharomyces*: <http://www.yeastgenome.org/>).

Tales genes de chaperonas derivados de otras especies de organismos también pueden ser genes homólogos a los mismos, siempre que tales genes tengan una actividad de aceleración de la secreción de proteínas foráneas. El

grado de tal homología de secuencia, el número de deleciones, sustituciones o adiciones de aminoácido, las condiciones rigurosas y los métodos para la mutagénesis son tal como se describieron anteriormente.

Además, los genes de chaperonas derivados de otras especies de organismos pueden ser genes con codones modificados que se modifican para mejorar la eficacia de traducción por medio de la sustitución de una secuencia de nucleótidos por un codón que se usa frecuentemente en una célula huésped (ocasionalmente puede hacerse referencia al término “con codones modificados” como “sintetizado” en el presente documento). El ADN que tiene una secuencia de nucleótidos modificada puede sintetizarse artificialmente. En el caso de una secuencia de ADN larga, una secuencia se divide en primer lugar en varios fragmentos, se sintetizan fragmentos por adelantado y entonces se unen los fragmentos resultantes entre sí por el extremo. Por tanto, puede sintetizarse ADN de interés.

En la presente descripción, se usan uno o más tipos de los genes de chaperonas mencionados anteriormente en combinación. Cuando se usan dos o más genes en combinación, tales genes pueden derivarse de la misma especie de organismo o de una diferente.

El gen de chaperonas que se usa en la presente invención es el gen PDI1 derivado de *O. minuta*. El gen PDI1 derivado de *S. cerevisiae*, el gen PDI derivado de ser humano, el gen PDI derivado de ser humano (un gen con codones modificados), el gen ERO1 derivado de *O. minuta*, el gen ERO1 derivado de ser humano y el gen Kar2 derivado de *O. minuta* son ejemplos adicionales de genes de chaperonas.

Los ejemplos preferibles adicionales de los genes de chaperonas que se usan en la presente descripción incluyen una combinación del gen PDI1 y el gen ERO1 derivados de *O. minuta*, una combinación del gen PDI1 y el gen Kar2 derivados de *O. minuta*, una combinación del gen PDI derivado de ser humano (un gen con codones modificados) y el gen ERO1 derivado de *O. minuta*, una combinación del gen PDI1, el gen ERO1 y el gen Kar2 derivados de *O. minuta*, una combinación del gen PDI, el gen ERO1-L β y el gen GRP78 derivados de ser humano (genes con codones modificados), y una combinación del gen PDI derivado de ser humano (un gen con codones modificados), el gen ERO derivado de *O. minuta* y el gen GRP78 derivado de ser humano (un gen con codones modificados).

El término “gen con codones modificados” usado con respecto al gen de chaperonas derivado de ser humano se refiere a un gen en el que la frecuencia de un codón que va a usarse está optimizada con respecto a la de *O. minuta*.

En la presente descripción, los genes mencionados anteriormente usados para la producción secretora de alto nivel de proteínas y genes que codifican para proteínas foráneas que son las dianas de la producción secretora de alto nivel descrita más adelante (a continuación en el presente documento estos genes se denominan “genes diana”) pueden obtenerse mediante una técnica general de preparación de ARNm y síntesis de ADNc usando transcriptasa inversa. Como ejemplo de la técnica general mencionada anteriormente, una biblioteca de ADNc derivada de una célula o un tejido en el que se expresa el gen diana se somete a examen con el uso de una sonda de ADN sintetizada a partir de un fragmento del gen diana, para aislar el gen de interés. Puede prepararse ARNm mediante una técnica usada generalmente en la materia. Por ejemplo, la célula o el tejido mencionado anteriormente puede tratarse con un reactivo de guanidina o un reactivo de fenol para obtener ARN total, tras lo cual se obtiene entonces poli (A)+ ARN (ARNm) por medio del método de columna de afinidad usando columnas de oligo(dT)-celulosa o poli-U-Sepharose usando Sepharose 2B como portador o una técnica discontinua. Además, puede fraccionarse poli (A)+ ARN por medio de centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa o por medio de otros medios. Posteriormente se usa el ARNm obtenido como molde para sintetizar ADNc monocatenario usando cebadores oligodT y transcriptasa inversa, se sintetiza ADNc bicatenario a partir del ADNc monocatenario usando ADN sintetasa I, ADN ligasa, ARNasaH, y similares. Al ADNc bicatenario sintetizado se le proporcionan extremos romos usando T4 ADN sintetasa, se somete a la ligamiento de un adaptador (por ejemplo, un adaptador de *EcoRI*), fosforilación o similar, se incorpora en un fago λ , tal como λ gt11, y entonces se empaqueta *in vitro* para preparar una biblioteca de ADNc. Además de un fago λ , pueden usarse vectores de plásmido para preparar una biblioteca de ADNc. Después de esto, puede seleccionarse una cepa que tiene el ADN de interés (es decir, un clon positivo) de la biblioteca de ADNc.

Cuando se aísla el gen diana de ADN genómico o cuando se aísla un fragmento que contiene una región de promotor y una región de terminador, se extrae ADN genómico de una cepa celular de un organismo fuente, y se selecciona el gen diana según una técnica común (Molecular Cloning, 1989; Methods in enzymology 194, 1991). El ADN genómico puede extraerse mediante el método de Cryer *et al.* (Methods in Cell Biology, 12, 39-44, 1975) o el método de P. Philippsen *et al.* (Methods Enzymol., 194, 169-182, 1991), por ejemplo. Cuando la fuente es una cepa de levadura, por ejemplo, se prepara un protoplasto de levadura y entonces se somete el protoplasto de levadura a una técnica convencional, tal como las conocidas técnicas de extracción de ADN, técnicas de precipitación con alcohol tras la eliminación de residuos celulares a una alta concentración de sal, o técnicas de precipitación con alcohol tras extracción con fenol o cloroformo.

El gen diana puede obtenerse, por ejemplo, mediante PCR (PCR Technology, Henry A. Erlich, Stockton Press, 1989). Cuando se amplifica el gen diana por medio de PCR, se usa como cebador un ADN monocatenario de 20 meros a 30 meros y se usa ADN genómico como molde. Se confirma la secuencia de nucleótidos del gen

amplificado y entonces se usa.

Puede obtenerse un fragmento que contiene un gen diana cuya secuencia es desconocida (a) preparando una biblioteca génica mediante una técnica convencional y (b) seleccionando un clon de interés a partir de la biblioteca génica resultante que va a amplificarse. Puede prepararse una biblioteca génica obteniendo ADN cromosómico de una línea celular de un organismo fuente por medio de una técnica convencional, digiriendo parcialmente el ADN cromosómico con enzimas de restricción adecuadas para fragmentación, ligando el fragmento resultante a un vector adecuado e introduciendo entonces el vector en una célula huésped adecuada. Alternativamente, puede extraerse ARNm de una célula, puede sintetizarse ADNc a partir del mismo, puede ligarse el ADNc sintetizado a un vector adecuado y puede introducirse el vector en una célula huésped adecuada, de modo que puede prepararse una biblioteca génica. En tal caso, puede usarse un plásmido que se conoce como vector convencional para la preparación de bibliotecas génicas, y por extensión pueden usarse fagos, cósmidos u otros vectores. Puede seleccionarse una célula huésped que se somete a transformación o transducción según el tipo de vector.

Los clones que portan fragmentos de genes diana se seleccionan de la biblioteca génica anterior por medio de hibridación de colonias, hibridación de placas de lisis u otros medios que impliquen el uso de sondas marcadoras que contienen secuencias específicas para los genes diana.

Además, los genes diana pueden someterse a una síntesis química total. Por ejemplo, se preparan dos pares de oligonucleótidos complementarios y entonces se aparean, se ligan varias cadenas de ADN apareadas con la ayuda de ADN ligasa, o se preparan varios oligonucleótidos parcialmente complementarios y se llenan los huecos mediante PCR. Por tanto, pueden sintetizarse genes.

Pueden determinarse secuencias de ADN de genes mediante una técnica convencional, tal como el método dideoxi (Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463-5467, 1977). Además, las secuencias de nucleótidos de ADN anteriores pueden determinarse fácilmente con el uso de un kit de secuenciación disponible comercialmente o similar.

2. Vector de expresión

La presente descripción proporciona un vector que comprende un único tipo del gen de chaperonas, un vector que comprende dos o más copias de un único tipo de los genes de chaperonas, o un vector que comprende una combinación de dos o más de los genes de chaperonas. Con el fin de expresar el gen de chaperonas en una célula huésped, puede usarse un vector que comprende cualquier gen para llevar a cabo la transformación. Alternativamente, puede usarse un vector que comprende una pluralidad de genes para llevar a cabo la transformación. Además, un vector de expresión de este tipo puede comprender un gen que codifica para una proteína foránea. Alternativamente, puede prepararse por separado un vector de expresión que comprende un gen que codifica para una proteína foránea. En tal caso, se cotransfectan vectores en una célula huésped.

Un gen que codifica para una proteína foránea no está limitado particularmente. Los ejemplos incluyen: diversos genes de enzimas, tales como el gen de lisozima, el gen de α -amilasa y el gen de α -galactosidasa, y en particular, genes de glicosiltransferasas que son necesarios para la producción de glicoproteínas farmacéuticamente útiles, tales como el gen de eritropoyetina (EPO) y los genes del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); diversos genes de interferón que son proteínas fisiológicamente activas, tales como genes de interferón α e interferón γ ; diversos genes de interleucinas, tales como genes de IL1 y IL2; diversos genes de citocinas, tales como el gen de eritropoyetina (EPO) y el gen del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); y genes del factor de crecimiento. Estos genes pueden obtenerse por medio de cualquier medio.

La presente invención es particularmente eficaz con una proteína que sea altamente hidrófoba y una proteína cuya producción secretora sea insuficiente debido a la formación compuesta. Por tanto, la proteína foránea mencionada anteriormente incluye una proteína multimérica, tal como un anticuerpo o su fragmento funcional, es decir, un heteromultímero.

Puede añadirse de manera adecuada una región de regulación de la expresión al gen de chaperonas o un gen que codifica para una proteína foránea para constituir un vector de expresión como unidad de expresión proteica. Una unidad de expresión proteica comprende, en el sentido de un marco de lectura de transcripción, al menos una región de promotor, el gen anterior y una región de terminador de la transcripción. Un promotor que puede usarse en el presente documento puede ser un promotor de expresión inducible o promotor de expresión constitutiva. Los ejemplos de promotores de expresión inducible incluyen promotores implicados en el metabolismo de metanol de levadura asimiladora de metanol, tal como el promotor del gen de alcohol oxidasa (AOX), promotor del gen de dihidroxiacetona sintasa (DAS) y el promotor del gen de formiato deshidrogenasa (FDH). Un ejemplo de otro promotor inducible que puede usarse es un promotor inducible por cobre (CUP). Los ejemplos de promotores de expresión constitutiva incluyen promotores del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH, GAP), el gen de fosfoglicerocinasa (PGK), el gen de fosfotriosa isomerasa (TPI), el gen de enolasa (ENO), el gen de actina (ACT), el gen de citocromo c (CYC), el gen de trehalosa sintasa (TPS) y el gen de alcohol deshidrogenasa (ADH). Además, un terminador de la transcripción puede ser una secuencia que tiene una actividad de terminación de la transcripción

de un promotor. Puede ser una secuencia del mismo gen del promotor o de uno diferente.

Con el fin de realizar la producción secretora de alto nivel de proteínas foráneas, es necesario el uso de un promotor potente. Cuando se intenta la producción de una proteína que tiene menos probabilidad de plegarse o menos probabilidad de secretarse con el uso de un promotor altamente activo, puede producirse de manera desventajosa hiposecreción. Tal hiposecreción se produce debido a los siguientes motivos. Es decir, la producción de proteína supera la capacidad del ribosoma en el que se realiza la traducción y del retículo endoplásmico en el que realizan el plegamiento y la secreción. Esto provoca que las proteínas producidas en exceso se desnaturalicen, se agreguen, se ubiquitinen en células y se degraden por el proteosoma. Por consiguiente, pueden seleccionarse de manera adecuada promotores que pueden alcanzar un nivel de expresión hasta el grado en el que las proteínas resultantes no se desnaturalicen y no experimenten agregación o las proteínas resultantes no superen la capacidad de secreción. Alternativamente, puede atenuarse la actividad de los promotores y entonces pueden usarse los promotores de interés. Es probable que las moléculas que forman heteromultímeros se vean afectadas como se describió anteriormente entre las proteínas multiméricas. En particular, moléculas tales como anticuerpos son heterotetrámeros que comprenden dos moléculas de cada una de la cadena pesada y de la cadena ligera que están agregadas. Por tanto, el nivel de expresión es un factor importante para realizar una agregación adecuada.

El vector de expresión de la presente descripción puede comprender un marcador de selección para seleccionar un transformante. Por ejemplo, los vectores de expresión para levadura pueden comprender genes de marcadores auxótrofos seleccionados de entre genes de His1, His2, His3, His4, His5, His6, Leu2, Arg1, Arg2, Arg3, Trp1, Lys2, Ade1, Ade2, Ura3 y Ura5.

Como marcadores de selección, pueden usarse marcadores resistentes a fármacos que confieren resistencia a fármacos tales como cerulenina, aureobasidina, Zeocin, canavanina, cicloheximida, higromicina, blasticidina, tetraciclina, kanamicina, ampicilina y neomicina, además de los marcadores auxótrofos mencionados anteriormente. Por tanto, pueden seleccionarse transformantes. Además, pueden usarse como marcadores genes que confieren resistencia a disolventes con respecto a etanol, resistencia osmótica con respecto a glicerol o sal, resistencia a iones metálicos con respecto a cobre, y similares, de modo que pueden seleccionarse transformantes.

3. Célula huésped transformada

La célula huésped transformada de la presente descripción comprende el gen descrito en 1. anteriormente o el vector de expresión descrito en 2. anteriormente introducido en la misma.

Un ejemplo de una célula huésped que va a transformarse es una célula eucariota, y preferiblemente una cepa de levadura. Los ejemplos de cepas de levadura incluyen cepas de levadura asimiladora de metanol, tales como *Ogataea minuta*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) y *Candida boidinii*, y cepas de levadura, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* y *Shizosaccharomyces pombe*. Más específicamente, puede usarse la cepa YK3 de *Ogataea minuta* ($\Delta\text{och1}\Delta\text{pep4}\Delta\text{prb1}\Delta\text{yps1}\Delta\text{ura3}\Delta\text{ade1}$) como la cepa de *Ogataea minuta*, y puede usarse la cepa BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae* (MATa $\Delta\text{his3}\Delta\text{leu2}\Delta\text{met15}\Delta\text{ura3}$) como las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque las cepas de levadura no están limitadas a esto.

Además, la presente descripción pretende obtener una célula huésped en la que el retículo endoplásmico (ER), que es esencial para la secreción, esté potenciado. Por consiguiente, la presente invención puede aplicarse a células animales u otras células.

En la presente descripción, puede introducirse un vector de expresión en una célula huésped mediante cualquier método, siempre que un gen introducido esté presente de manera estable y se exprese de manera adecuada en un huésped. Los ejemplos de tales métodos que se emplean generalmente incluyen el método de fosfato de calcio (Ito *et al.*, Agric. Biol. Chem., 48, 341, 1984), la electroporación (Becker, D. M. *et al.*, 1990; Methods. Enzymol., 194, 182-187), el uso de esferoplastos (Creggh *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5, 3376, 1985), el método de acetato de litio (Itoh, H., 1983; J. Bacteriol. 153, 163-168) y la lipofección.

4. Método para producir proteína

En la presente descripción, pueden producirse proteínas cultivando las células huésped transformadas por medio de una técnica convencional y tomando una muestra de las proteínas del producto de cultivo, seguido por purificación. El término "producto de cultivo" usado en el presente documento se refiere a células en cultivo, cuerpos fúngicos cultivados, o cuerpos fúngicos o células destruidos, además de un sobrenadante de cultivo.

La célula huésped transformada puede cultivarse en un medio según un método convencional usado para el cultivo de la célula huésped.

Cuando la célula huésped transformada es un microorganismo, tal como una levadura, puede usarse un medio o bien natural o bien sintético como medio para el cultivo, siempre que contenga fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y sales inorgánicas asimilables por el microorganismo y pueda proporcionar un cultivo eficaz del

transformante. Puede usarse cualquier fuente de carbono asimilable por el microorganismo, y los ejemplos de las mismas incluyen: hidratos de carbono tales como glucosa, fructosa, sacarosa y almidón; ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido propiónico; y alcoholes tales como etanol y propanol. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen: amoníaco; sales de amonio de ácidos inorgánicos u orgánicos tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio, acetato de amonio y fosfato de amonio; otros compuestos que contienen nitrógeno; peptona; extractos de carne; y licor de maíz fermentado. Los ejemplos de sales inorgánicas incluyen: fosfato de monopotasio, fosfato de dipotasio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato de hierro (I), sulfato de manganeso, sulfato de cobre y carbonato de calcio. Según el tipo de marcador de selección, puede añadirse de manera adecuada un agente antibiótico, tal como aureobasidina, ampicilina o tetraciclina, a un medio. Alternativamente, puede eliminarse un aminoácido que puede suministrarse mediante un gen que complementa la auxotrofia (por ejemplo, Leu, Ura o Trp).

Cuando se cultiva la célula huésped transformada, en el caso de levadura, por ejemplo, el nivel de pH del medio se ajusta preferiblemente a de 4 a 7. La temperatura de cultivo es de entre 15°C y 32°C, y preferiblemente de aproximadamente 28°C. Cuando se expresa una proteína que tiene una estructura estérica complicada como anticuerpo, el cultivo puede llevarse a cabo preferiblemente a baja temperatura, con el fin de plegar de manera más eficaz una proteína de este tipo en la célula. La duración del cultivo es generalmente de aproximadamente 24 a 1.000 horas, y el cultivo puede llevarse a cabo por medio de un cultivo discontinuo, tal como un cultivo estático, con sacudidas, con agitación o con aireación, o por medio de un cultivo continuo.

Un producto de expresión de un gen de una proteína foránea del producto de cultivo (es decir, una disolución de cultivo o células cultivadas) puede confirmarse por medio de SDS-PAGE, inmunotransferencia de tipo Western, ELISA, o similares.

Las proteínas producidas pueden aislarse y purificarse por medio de técnicas convencionales para el aislamiento y la purificación de proteínas. Cuando se producen proteínas diana en los cuerpos fúngicos o las células tras el cultivo, los cuerpos fúngicos o las células pueden pulverizarse usando, por ejemplo, un pulverizador ultrasónico, una prensa francesa, un homogeneizador Manton-Gaulin, un molino Dinomil, o similares, para obtener las proteínas diana. Cuando las proteínas diana se producen fuera del cuerpo fúngico o las células, la disolución de cultivo se usa tal cual, o el cuerpo fúngico o las células se retiran por medio de centrifugación o similar. Después de esto, las proteínas diana se recogen por medio de extracción usando un disolvente orgánico, se someten a diversas técnicas de cromatografía (por ejemplo, cromatografía hidrófoba, de fase inversa, de afinidad o de intercambio iónico), filtración en gel usando tamices moleculares, electroforesis usando gel de poliacrilamida, o similar, según la necesidad. Estas técnicas pueden emplearse solas o en combinaciones de dos o más. Por tanto, pueden aislarse y purificarse las proteínas diana.

Las técnicas de cultivo y purificación anteriores son ejemplos, y los métodos no están limitados a las mismas. La secuencia de aminoácidos del producto génico purificado puede confirmarse mediante un método convencional de análisis de aminoácidos, tal como la secuenciación de aminoácidos automatizada por medio de la técnica de degradación de Edman.

En la presente descripción, cuando se usa levadura como célula huésped, el cultivo mencionado anteriormente se lleva a cabo más preferiblemente en condiciones en las que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT).

Se forma una cadena de O-azúcar en una célula de mamífero tras la adición de GalNAc mediante la péptido O-GalNAc transferasa, que está presente principalmente en el aparato de Golgi. Tal adición de cadena de azúcar tiene lugar tras el plegamiento de proteínas. Por el contrario, la formación de cadena de O-azúcar en células de levadura y moho se inicia tras la adición de manosa a un residuo de serina o treonina de la proteína mediante una proteína-O-manosiltransferasa (PMT) codificada por el gen PMT. Tal adición se denomina actividad PMT. La adición de manosa tiene lugar en paralelo al plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (ER) en la célula. Por tanto, puede añadirse de manera desventajosa una cadena de azúcar innecesaria a un sitio en el que tal adición no tendría lugar en el caso de la expresión de proteínas de mamífero. Por consiguiente, tal modificación innecesaria provocaría una formación de agregados insuficiente y reduciría la actividad.

Por consiguiente, realizando el cultivo en condiciones en las que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT), puede inhibirse la formación de una cadena de O-azúcar innecesaria. Esto también acelera el ensamblaje de proteínas y permite mantener la actividad y propiedades físicas nativas de proteínas. En la presente invención, los efectos de la producción secretora de alto nivel de proteínas por medio de la introducción del gen de chaperonas pueden producir adicionalmente efectos sinérgicos regulando la formación de cadena de O-azúcar potenciada por URP por medio de la inhibición de la actividad PMT.

La adición de una cadena de O-azúcar peculiar para una levadura o un moho puede inhibirse mediante, por ejemplo, los dos métodos descritos a continuación. Estos métodos pueden realizarse en combinación.

(1) El cultivo y la producción se llevan a cabo en condiciones en las que se inhibe la actividad PMT que experimenta

la adición de una cadena de O-azúcar peculiar para una levadura o un mohó.

(2) Se usan células en las que se inhibe la actividad PMT que experimenta la adición de una cadena de O-azúcar peculiar para una levadura o un mohó.

La actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) de (1) anteriormente puede inhibirse con la adición de un inhibidor de la actividad PMT (es decir, un inhibidor de PMT) al medio, por ejemplo. Un ejemplo de un inhibidor de la actividad PMT que puede usarse es el derivado de ácido rodanin-3-acético (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14, págs. 3975-3978, 2004). Los ejemplos específicos del derivado de ácido rodanin-3-acético incluyen ácido 5-[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metilen]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinacético (compuesto (1c) descrito en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 14, pág. 3975, 2004) y ácido {(5Z)-4-oxo-5-[3-(1-feniletoxi)-4-(2-feniletoxi)benciliden]-2-tioxo-1,3-tiazolidin-3-il}acético (compuesto (5a) descrito en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 14, pág. 3975, 2004). PMT es importante para la generación de manoproteínas que constituyen la pared celular de levadura. Una actividad PMT excesivamente reducida afectará de manera adversa al crecimiento de levadura. Por consiguiente, cuando se usan sistemas de expresión inducible, la adición de un inhibidor de la actividad PMT en el momento de la expresión de genes de proteínas foráneas, tras el crecimiento celular, sería más eficaz. Por tanto, pueden producirse al máximo nivel proteínas diana de alta calidad en las que se inhibe la modificación de cadena de O-azúcar.

La actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) descrita en (2) anteriormente puede inhibirse perturbando el gen PMT o inhibiendo la expresión de tal gen. En *S. cerevisiae*, PMT está codificada por al menos 6 genes; es decir, el gen PMT1 (GenBank: L19169), el gen PMT2 (GenBank: L05146), el gen PMT3 (GenBank: X83797), el gen PMT4 (GenBank: X83798), el gen PMT5 ((GenBank: X95644) y el gen PMT46 ((GenBank: Z72984), y estos genes forman independientemente un homodímero (PMT4p) o un heterodímero (PMT1p/PMT2p) y presentan actividad. La deficiencia del gen PMT puede ser deficiencia simple o doble. Tal como se describió anteriormente, PMT es un gen importante para el crecimiento de levadura. Cuando la actividad, tal como deficiencia de gen PMT, se elimina o se reduce extremadamente, la pared celular se vuelve frágil. Por tanto, el uso de una cepa deficiente en el gen PMT requiere atención. Una cepa en la que el gen PMT se ha destruido es preferiblemente una cepa en la que se ha destruido el gen o bien PMT5 o bien PMT6 o una cepa en la que se han destruido tanto el gen PMT5 como el gen PMT6.

Los ejemplos de métodos para suprimir el gen PMT incluyen un método que implica el uso de ARN antisentido o ARNi y un método que implica la atenuación de un promotor.

Mejores modos para llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, la presente invención y descripción se describe en detalle con referencia a los ejemplos, aunque el alcance técnico de la presente invención no está limitado a los ejemplos. Los plásmidos, las enzimas de restricción, las enzimas modificadoras de ADN, y similares que se usan en los ejemplos de la presente invención son productos disponibles comercialmente, y estos productos pueden usarse según técnicas convencionales. Además, los procedimientos de clonación de ADN, secuenciación de nucleótidos, transformación de células huésped, cultivo de células huésped transformadas, toma de muestras y purificación de enzimas a partir de productos de cultivo, y similares se conocen ampliamente en la técnica o pueden aprenderse a través de publicaciones existentes.

[Ejemplo 1] Construcción de un vector para la introducción de un gen de anticuerpo

(1) Construcción de un vector para la introducción de un gen de anticuerpo que porta un gen resistente a Zeocin como marcador de selección y que comprende el casete de promotor y terminador de gen GAP

Con el fin de preparar un marcador de gen resistente a Zeocin, se sometió un fragmento de ADN sintetizado mostrado en SEQ ID NO: 15 a digestión doble con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI* para obtener un fragmento de ADN que contenía un gen resistente a Zeocin.

Se escindió pOMexGP1U dado a conocer en el documento WO 2003/091431 con *SpeI*, se le proporcionaron extremos romos, y entonces se ligó. Se sometieron el sitio *SaI* y el sitio *EcoT22I* del plásmido resultante a cambio de ligador con el sitio *SpeI* y el sitio *BamHI*, respectivamente. Se obtuvo así el plásmido pOMexGP1UΔSp. Se sometió el pOMexGP1UΔSp resultante a digestión doble con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI* para aislar un fragmento que contenía el promotor del gen GAP y el terminador, y se introdujo en el mismo un fragmento de ADN que contenía el marcador del gen resistente a Zeocin para obtener el plásmido pOMexGP1Z.

Tras añadir las secuencias de nucleótidos de los sitios de enzima de restricción (el sitio *XbaI* en el lado 5' y el sitio *BamHI* en el lado 3') a ambos extremos del gen de cadena pesada del gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560, sintetizado por Takara Bio teniendo en cuenta la frecuencia del uso de codones de *O. minuta*), se digirió el fragmento resultante con *XbaI* y *BamHI* para obtener un fragmento del gen de cadena pesada de anticuerpo.

Se usó el gen de cadena pesada de anticuerpo sintetizado artificialmente resultante como molde para llevar a cabo una PCR usando el cebador SynCH-F y el cebador SynCH-R mostrados a continuación a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 20 veces. Se obtuvo así una región constante del gen de cadena pesada de anticuerpo.

SynCH-F: 5'-GGAGCTCAAAAAGCTAGCACCAAGGGTCCATCCGTTTTCC-3' (SEQ ID NO: 16)

SynCH-R: 5'-CAGATCTTTACTTACCTGGGGACAAGGACAAG-3' (SEQ ID NO: 17)

Se sometió el fragmento de ADN resultante a digestión doble con las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI*, y se introdujo el fragmento resultante en pOMexGP1Z, que se había sometido a digestión doble con las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI*. Se designó el vector resultante como pOMexGPZ/SynCH. Puede introducirse una región variable del gen de cadena pesada de anticuerpo en un sitio entre los sitios de enzima de restricción *SacI* y *NheI* de este vector.

(2) Construcción de un vector para la introducción de un gen de anticuerpo que porta el gen ADE1 como marcador de selección y que comprende el casete de promotor y terminador de gen GAP

Se trató pOMexGP1U dado a conocer en el documento WO 2003/091431 con *EcoT22I* y se le proporcionaron extremos romos. Se introdujo el ligador *BamHI* en el mismo para obtener pOMexGP2U. Se trató pOMexGP2U con *SalI* y se le proporcionaron extremos romos. Se introdujo el ligador *SpeI* en el mismo para obtener pOMexGP3U. Se digirió pOMexGP3U con *HindIII* y *KpnI* para aislar un fragmento de aproximadamente 2,0 kb que comprendía el casete de expresión de GAP. Se ligó el fragmento resultante a un fragmento de aproximadamente 5,0 kb que comprendía el marcador ADE1 aislado tratando pOMex4A (dado a conocer en el documento WO 2003/091431) con *HindIII* y *KpnI* para obtener pOMexGP1A. Se proporcionó extremos romos al fragmento obtenido mediante la escisión de pOMexGP1A con la enzima de restricción *BsiWI* y se introdujo el ligador *NdeI* (Takara Bio). Se designó el plásmido resultante como pOMexGP2A.

Tras añadir las secuencias de nucleótidos de los sitios de enzima de restricción (el sitio *XbaI* en el lado 5' y el sitio *BamHI* en el lado 3') a ambos extremos del gen de cadena ligera del gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560, sintetizado por Takara Bio teniendo en cuenta la frecuencia del uso de codones de *O. minuta*), se digirió el fragmento resultante con *XbaI* y *BamHI* para obtener un fragmento del gen de cadena ligera de anticuerpo.

Se usó el gen de cadena ligera de anticuerpo sintetizado artificialmente resultante como molde para llevar a cabo una PCR usando el cebador SynCL-F y el cebador SynCL-R mostrados a continuación a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 20 veces. Se obtuvo así una región constante del gen de cadena ligera de anticuerpo.

SynCL-F: 5'-GACTAGTAAAAACGTACGGTTGCTGCTCCATCCGTTTTCATC-3' (SEQ ID NO: 18)

SynCL-R: 5'-CAGATCTTTAGCACTCACCTCTGTTGAAGGAC-3' (SEQ ID NO: 19)

Se sometió el fragmento de ADN resultante a digestión doble con las enzimas de restricción *SpeI* y *BglII*, y se introdujo el fragmento resultante en pOMexGP2A, que se había sometido a digestión doble con las enzimas de restricción *SpeI* y *BamHI*. Se designó el vector resultante como pOMexGPA/SynCL. Puede introducirse una región variable del gen de cadena ligera de anticuerpo en un sitio entre las enzimas de restricción *SpeI* y *BsiWI* de este vector.

[Ejemplo 2] Construcción de un vector de expresión para un gen de anticuerpo

Con el fin de expresar la señal de Kar2 derivada de *O. minuta* (a continuación en el presente documento denominada la "señal de OmKar2") y la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TRAIL como proteína de fusión, se ligó la secuencia señal de OmKar2 al gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560, sintetizado por Takara Bio teniendo en cuenta la frecuencia del uso de codones de *O. minuta*) por medio de PCR de extensión por solapamiento usando los cebadores oligonucleotídicos a continuación.

Para la señal de OmKar2 y la cadena pesada de anticuerpo anti-receptor de TRAIL

Om-Kar2-Sac: 5'-GGAGCTCATGTTTAAGTTCAACCGCTC-3' (SEQ ID NO: 20)

OmKar-SanH-R3: 5'-CAACGAGTTGAACCTCCGCCTCTGCTTCCACG-3' (SEQ ID NO: 21)

OmKar-SanH-F3: 5'-CGTGAAGCAGAGGCGGAGGTTCAACTCGTTG-3' (SEQ ID NO: 22)

SanH-Nhe: 5'-GGCTAGCGGAGGAAACGGTAAC-3' (SEQ ID NO: 23)

Para la señal de OmKar2 y la cadena ligera de anticuerpo anti-receptor de TRAIL

5 Om-Kar2-Spe: 5'-GACTAGTATGTTTAAGTTCAACCGCTC-3' (SEQ ID NO: 24)

OmKar-SanL-R3: 5'-GGGTCATCTGGATGTCCGCCTCTGCTTCCACG-3' (SEQ ID NO: 25)

10 OmKar-SanL-F3: 5'-CGTGGAAGCAGAGGCGGACATCCAGATGACCC-3' (SEQ ID NO: 26)

SanL-Bsi: 5'-GCGTACGCTTGATCTCAACC-3' (SEQ ID NO: 27)

15 Se amplificó la región de la secuencia señal de OmKar2 usando ADN genómico de *O. minuta* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE, 78870) como molde. Con el uso de ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024), se llevó a cabo una PCR usando los cebadores Om-Kar2-Sac y OmKar-SanH-R3 para la cadena pesada y los cebadores Om-Kar2-Spe y OmKar-SanL-R3 para la cadena ligera a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperaron así fragmentos de ADN diana amplificados de aproximadamente 0,1 kb.

20 Se amplificó la región de gen de anticuerpo usando ADN obtenido sintetizando el codón del ADNc de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) según la frecuencia del codón de *O. minuta* usado como molde. Con el uso de ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024), se llevó a cabo una PCR usando los cebadores OmKar-SanH-F3 y SanH-Nhe para la cadena pesada y los cebadores OmKar-SanL-F3 y SanL-Bsi para la cadena ligera a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperaron un fragmento de ADN diana amplificado de la región variable de cadena pesada de aproximadamente 0,36 kb y uno de la región variable de cadena ligera de aproximadamente 0,33 kb.

30 Posteriormente, se usaron la región de señal de OmKar2 amplificada para la cadena pesada y la región variable de cadena pesada como moldes, se llevó a cabo una PCR usando los cebadores Om-Kar2-Sac y SanH-Nhe y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó así un fragmento de ADN diana amplificado de aproximadamente 0,47 kb. Además, se usaron la región de señal de OmKar2 amplificada para la cadena ligera y la región variable de cadena ligera como moldes, y se llevó a cabo una PCR usando los cebadores Om-Kar2-Spe y SanL-Bsi y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó así un fragmento de ADN diana amplificado de aproximadamente 0,43 kb. Se clonaron los fragmentos de ADN recuperados en pCR2.1-TOPO. Basándose en las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN insertados, se confirmó que la región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-señal de OmKar2 y la región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-señal de OmKar2 tenían genes que estaban fusionados en marco entre sí. A partir de un plásmido que tenía un fragmento de ADN, cuya secuencia de nucleótidos se había confirmado, se recuperó un fragmento de ADN que contenía la región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-señal de OmKar por medio de digestión con SacI y NheI con el uso del sitio de enzima de restricción SacI introducido en el cebador Om-Kar2-Sac y el sitio de enzima de restricción NheI introducido en el cebador SanH-Nhe. Por separado, se usaron el sitio de enzima de restricción SpeI introducido en el cebador Om-Kar2-Spe y el sitio de enzima de restricción BsiWI introducido en el cebador SanL-Bsi para recuperar un fragmento de ADN que contenía las regiones variables de cadena ligera de anticuerpo anti-señal de OmKar por medio de digestión con SpeI y BsiWI.

50 Con el fin de expresar la cadena pesada de anticuerpo y la cadena ligera de anticuerpo en *O. minuta*, se ligaron un fragmento de ADN que codifica para la región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-señal de OmKar recuperado por medio de digestión doble con las enzimas de restricción SacI y NheI y un fragmento de ADN que codifica para la región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-señal de OmKar recuperado por medio de digestión doble con las enzimas de restricción SpeI y BsiWI, al vector de expresión pOMexGPZ/SynCH para la región constante de cadena de IgG1γ humana obtenido por medio de digestión doble con las enzimas de restricción SacI y NheI (preparado en el ejemplo 1) y el vector de expresión pOMexGPA/SynCL para la región constante de IgG1κ humana obtenido por medio de digestión doble con las enzimas de restricción SpeI y BsiWI (preparado en el ejemplo 1), respectivamente. Se designaron los plásmidos resultantes como onaP02706 y onaP03106.

[Ejemplo 3] Construcción de un vector de expresión para un gen de chaperonas solo

60 (1) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen OmPD11

Se deduce que el gen que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 (1551 pb) codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 (516 residuos de aminoácido).

65 La proteína anterior tiene una homología de secuencia de nucleótidos de aproximadamente el 60,5% con respecto a

PDI1 (YCL043C) de *S. cerevisiae* y una supuesta homología de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 46,9%. Se dedujo que la proteína era un homólogo funcional que también comprendía dos dominios similares a tiorredoxina, CGHC (Cys-Gly-His-Cys), en PDI1 de *S. cerevisiae*, y se designó como OmPDI1 al ser PDI1 de *O. minuta*. Dado que la secuencia de nucleótidos de OmPDI1 comprende los sitios de escisión para las enzimas de restricción *EcoT22I* y *Sall*, se modificaron los sitios de enzima de restricción *EcoT22I* y *Sall* por medio de PCR de extensión por solapamiento usando los cebadores oligonucleotídicos a continuación.

OMPDI1SAL: 5'-GGTCGACATGAAGTTATTTGGATTGAC-3' (SEQ ID NO: 28)

OMPDI1T22I: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCGTGAGCCAC-3' (SEQ ID NO: 29)

OMPDI912F: 5'-GAGATACGGTATGCACGCCAAGAAC-3' (SEQ ID NO: 30)

OMPDI936R: 5'-GTTCTTGGCGTGCATACCGTATCTC-3' (SEQ ID NO: 31)

OMPDI1321F: 5'-GTTGCCGGTGTGACATCGCCGG-3' (SEQ ID NO: 32)

OMPDI1343R: 5'-CCGGCGATGTCAACACCGGCAAC-3' (SEQ ID NO: 33)

Se llevó a cabo una PCR usando el ADN genómico de *O. minuta* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (78870, PIERCE) como molde, los cebadores OMPDI1SAL y OMPDI936R, los cebadores OMPDI912F y OMPDI1343R, y los cebadores OMPDI1321F y OMPDI1T22I, y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificaron así fragmentos de ADN diana de aproximadamente 0,94 kb, aproximadamente 0,43 kb y aproximadamente 0,23 kb. Posteriormente, se llevó a cabo una PCR usando los fragmentos amplificados anteriores y los cebadores OMPDI1SAL y OMPDI1T22I a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificó adicionalmente el fragmento de ADN diana amplificado de aproximadamente 1,6 kb y se clonó el fragmento resultante en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que el fragmento diana tenía el gen OmPDI1. A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN que contenía OmPDI1 por medio de digestión con *Sall* y *EcoT22I*, con el uso del sitio de enzima de restricción *Sall* introducido en el cebador OMPDI1SAL y el sitio de enzima de restricción *EcoT22I* introducido en el cebador OMPDI1T22I. Con el fin de expresar de manera constitutiva OmPDI1 en *O. minuta*, se ligó OmPDI1 a pOMexGP1U dado a conocer en el documento WO 2003/091431 recuperado por medio de digestión con *Sall* y *EcoT22I*. Se designó el plásmido resultante como onaP03606.

(2) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen OmMPD1

Se deduce que el gen que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 3 (936 pb) codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 (311 residuos de aminoácido).

La proteína anterior tiene una homología de secuencia de nucleótidos de aproximadamente el 47,3% con respecto a MPD1 (YOR288C) de *S. cerevisiae* y una supuesta homología de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 31,2%. Se dedujo que la proteína era un homólogo funcional que también comprendía un dominio similar a tiorredoxina, CGHC (Cys-Gly-His-Cys), contenido en derivado de MPD1 de *S. cerevisiae*, y se designó como OmMPD1 al ser MPD1 derivada de *O. minuta*. Se amplificó el fragmento resultante por medio de PCR usando los cebadores oligonucleotídicos a continuación.

OMIC1379SAL: 5'-GGTCGACATGAAAGTGGCAAGTTTG-3' (SEQ ID NO: 34)

OMIC1379T22I: 5'-GATGCATTCATAGCTCATCTTTTC-3' (SEQ ID NO: 35)

Se llevó a cabo una PCR usando el ADN genómico de *O. minuta* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (78870, PIERCE) como molde y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificó así un fragmento de ADN diana de aproximadamente 0,94 kb y se introdujo el fragmento resultante en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que el fragmento diana tenía el gen OmMPD1. A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN que contenía OmMPD1 por medio de digestión con *Sall* y *EcoT22I*, con el uso del sitio de enzima de restricción *Sall* introducido en el cebador OMIC1379SAL y el sitio de enzima de restricción *EcoT22I* introducido en el cebador OMIC1379T22I. Con el fin de expresar de manera constitutiva OmMPD1 en *O. minuta*, se ligó OmMPD1 a pOMexGP1U dado a conocer en el documento WO 2003/091431 recuperado por medio de digestión con *Sall* y *EcoT22I*. Se designó el plásmido resultante como onaP04006.

(3) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen OmSCJ1

Se deduce que el gen que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 5 (930 pb) codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6 (309 residuos de aminoácido).

La proteína anterior tiene una homología de secuencia de nucleótidos de aproximadamente el 54,8% con respecto a SCJ1 (YMR214W) de *S. cerevisiae* y una supuesta homología de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 36,6%. Se dedujo que la proteína era un homólogo funcional que comprendía el dominio rico en cisteína (CR) central de la proteína DnaJ de CXXCXGXG y una región parcialmente homóloga a la región terminal de DnaJ-C, y se designó como OmSCJ1 al ser SCJ1 de *O. minuta*. Se amplificó el fragmento resultante por medio de PCR usando los cebadores oligonucleotídicos a continuación.

OMSCJ1SAL: 5'-GGTCGACATGTTTATGGAGATCGGAG-3' (SEQ ID NO: 36)

OMSCJ1T22I: 5'-GATGCATTCACAGCTCGTCGTGCAAC-3' (SEQ ID NO: 37)

Se llevó a cabo una PCR usando el ADN genómico de *O. minuta* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (78870, PIERCE) como molde y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificó así un fragmento de ADN diana de aproximadamente 0,93 kb y se clonó el fragmento resultante en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que el fragmento diana tenía el gen OmSCJ1. A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN que contenía OmSCJ1 por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I*, con el uso del sitio de enzima de restricción *SalI* introducido en el cebador OMSCJ1SAL y el sitio de enzima de restricción *EcoT22I* introducido en el cebador OMSCJ1T22I. Con el fin de expresar de manera constitutiva OmSCJ1 en *O. minuta*, se ligó OmSCJ1 a pOMexGP1U dado a conocer en el documento WO 2003/091431 recuperado por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I*. Se designó el plásmido resultante como onaP03806.

(4) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen OmEUG1

Se deduce que el gen que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 7 (1137 pb) codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 (378 residuos de aminoácido).

Aunque la proteína anterior no mostró una homología obvia con respecto a la familia de proteína disulfuro isomerasas de *S. cerevisiae*, la proteína comprendía dominios similares a tiorredoxina de CHSC en una región que comprendía los residuos 52 a 55 y de CGYC en una región que comprendía los residuos 174 a 177 desde el extremo N-terminal. En *S. cerevisiae* se conocen cinco tipos de proteína disulfuro isomerasas que tienen dominios similares a tiorredoxina; sin embargo, aquellas que tienen dos dominios similares a tiorredoxina en las moléculas están limitadas a PDI1 y EUG1. Dado que P5 que pertenece a la familia de PDI humana es la única isomerasa que tiene dos dominios similares a tiorredoxina desde el extremo N-terminal hasta la región central de la molécula (Gene, 1995, 164, págs. 377-378), se deduce que la proteína anterior funciona como una proteína disulfuro isomerasa. Además, se dedujo que la proteína tenía el dominio de retención en ER de KDEL en el extremo C-terminal y funcionaba como proteína disulfuro isomerasa en el retículo endoplásmico de levadura.

Por consiguiente, se dedujo que la proteína anterior era un homólogo funcional de EUG1 derivado de *S. cerevisiae*, y se designó como OmEUG1 al ser EUG1 de *O. minuta*. Dado que la secuencia de nucleótidos de OmEUG1 comprende sitios de escisión para las enzimas de restricción *EcoT22I* y *SalI*, se modificaron los sitios de enzima de restricción *EcoT22I* y *SalI* por medio de PCR de extensión por solapamiento usando los cebadores oligonucleotídicos a continuación.

OMEUG1SAL: 5'-GGTCGACATGAAAGTCACGTCTATCTGG-3' (SEQ ID NO: 38)

OMEUG1T22I: 5'-GATGCATTCACAGCTCATCCTTGGCTGG-3' (SEQ ID NO: 39)

OMEUG819F: 5'-GATACACGCAGTTGACGAGCTG-3' (SEQ ID NO: 40)

OMEUG840R: 5'-CAGCTCGTCAACTGCGTGTATC-3' (SEQ ID NO: 41)

OMEUG925F: 5'-GACAACGCATTGTGCAAGAAG-3' (SEQ ID NO: 42)

OMEUG946R: 5'-CTTCTTTCGACAATGCGTTGTC-3' (SEQ ID NO: 43)

Se llevó a cabo una PCR usando el ADN genómico de *O. minuta* preparado usando el reactivo de extracción de

ADN de levadura Y-DER (78870, PIERCE) como molde, los cebadores OMEUG1SAL y OMEUG840R, los cebadores OMEUG819F y OMEUG946R, y los cebadores OMEUG925F y OMEUG1T22I, y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificaron así fragmentos de ADN diana de aproximadamente 0,84 kb, aproximadamente 0,13 kb y aproximadamente 0,21 kb. Posteriormente, se llevó a cabo una PCR usando los fragmentos amplificados anteriores, los cebadores OMEUG1SAL y OMEUG1T22I, y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificó así un fragmento de ADN diana de aproximadamente 1,1 kb y se clonó el fragmento resultante en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que el fragmento diana tenía el gen OmEUG1. A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN que contenía OmEUG1 por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I* con la utilización del sitio de enzima de restricción *SalI* introducido en el cebador OMEUG1SAL y el sitio de enzima de restricción *EcoT22I* introducido en el cebador OMEUG1T22I. Con el fin de expresar de manera constitutiva OmEUG1 en *O. minuta*, se ligó OmEUG1 a pOMexGP1U digerido con *SalI* y *EcoT22I* dado a conocer en el documento WO 2003/091431. Se designó el plásmido resultante como onaP03706.

(5) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen OmERO1

Se deduce que el gen que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 9 (1728 pb) codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 (575 residuos de aminoácido).

La proteína anterior tiene una homología de secuencia de nucleótidos de aproximadamente el 37,4% con respecto a ERO1 (YML130C) de *S. cerevisiae* y una supuesta homología de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 35,1%. Se sabe que ERO1 de *S. cerevisiae* comprende 14 residuos Cys y al menos 10 residuos Cys están asociados con enlace disulfuro (Cell, 2007, 129, págs. 333-344). En particular, se demuestra que 4 residuos Cys son importantes para la actividad ERO1, Cys100-Cys105 se denomina "disulfuro lanzadera" y se asocia con la oxidación de PDI1, y Cys352-Cys355 se asocia con la reoxidación de disulfuro lanzadera reducido (Moll. Cell, 1999, 4, págs. 469-477). La búsqueda de homología entre ERO1 de *S. cerevisiae* y SEQ ID NO: 10 demuestra que Cys125-Cys130, que es equivalente a Cys lanzadera de Cys100-Cys105 de *S. cerevisiae*, y Cys384-Cys387, que es equivalente a Cys activo de Cys352-Cys355 de *S. cerevisiae*, están conservados. Por tanto, se deduce que la proteína anterior tiene una actividad similar a oxidorreductasa endoplásmica. Por tanto, se deduce que la proteína anterior es un homólogo funcional de ERO1 de *S. cerevisiae* y se designó como OmERO1 al ser ERO1 de *O. minuta*. Dado que la secuencia de nucleótidos de OmERO1 comprende un sitio de escisión para la enzima de restricción *SalI*, se modificó el sitio de enzima de restricción *SalI* por medio de PCR de extensión por solapamiento usando los cebadores oligonucleotídicos a continuación.

OMEROSAL: 5'-GGTCGACATGAAGCACGTGATAAGTGGC-3' (SEQ ID NO: 44)

OMEROT22I: 5'-GATGCATTTATAGCTCCAAACGATACAG-3' (SEQ ID NO: 45)

OMERO166F: 5'-GAGTTTGAGTCCACGCCTTCCGCG-3' (SEQ ID NO: 46)

OMERO190R: 5'-CGCGGAAAGGCGTGGACTCAAATC-3' (SEQ ID NO: 47)

Se llevó a cabo una PCR usando el ADN genómico de *O. minuta* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (78870, PIERCE) como molde, los cebadores OMEROSAL y OMERO190R, y los cebadores OMERO166F y OMEROT22I, y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificaron así fragmentos de ADN diana de aproximadamente 0,19 kb y aproximadamente 1,56 kb. Posteriormente, se llevó a cabo una PCR usando los fragmentos amplificados anteriores, los cebadores OMEROSAL y OMEROT22I, y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 120 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificó así un fragmento de ADN diana de aproximadamente 1,73 kb y se clonó el fragmento resultante en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que el fragmento diana tenía el gen OmERO1. A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN que contenía OmERO1 por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I* con la utilización del sitio de enzima de restricción *SalI* introducido en el cebador OMEROSAL y el sitio de enzima de restricción *EcoT22I* introducido en el cebador OMEROT22I. Con el fin de expresar de manera constitutiva OmERO1 en *O. minuta*, se ligó OmERO1 a pOMexGP1U recuperado por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I* dado a conocer en el documento WO 2003/091431. Se designó el plásmido resultante como onaP03906.

(6) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen OmHSP104

Se deduce que el gen que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 11 (2700 pb) codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12 (899 residuos de

aminoácido).

La proteína anterior tiene una homología de secuencia de nucleótidos de aproximadamente el 60,4% con respecto a HSP104 (ILL026W) de *S. cerevisiae* y una supuesta homología de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 63,4%. HSP104 de *S. cerevisiae* es una chaperona molecular que pertenece a la familia de HSP100/C1p, y actúa conjuntamente con una chaperona molecular que pertenece a la familia de HSP70/HSP40 y una chaperona auxiliar de la misma para regenerar una proteína agregada. La proteína anterior tiene dos dominios en su molécula; es decir, el dominio amino-terminal C1p y el dominio AAA+, y se deduce que tiene una actividad similar a HSP104. Por tanto, se dedujo que la proteína anterior era un homólogo funcional de HSP104 de *S. cerevisiae* y se designó como OmHSP104 al ser HSP104 de *O. minuta*.

Se llevó a cabo una PCR usando el ADN genómico de *O. minuta* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (78870, PIERCE) como molde, el cebador OmHSP104salF (5'-GGTCGACATGGATTCTACGCAATTTAC-3': SEQ ID NO: 48), el cebador OmHSP104EcoTR (5'-GATGCATTTAATCGAGATCAGGACTGC-3': SEQ ID NO: 49), y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 180 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificó así un fragmento de ADN diana de aproximadamente 2,7 kb y se clonó el fragmento resultante en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que el fragmento diana tenía el gen OmHSP104. A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN que contenía OmHSP104 por medio de digestión con *SalI* y *EcoT221* con la utilización del sitio de enzima de restricción *SalI* introducido en el cebador OmHSP104salF y el sitio de enzima de restricción *EcoT221* introducido en el cebador OmHSP104EcoTR. Con el fin de expresar de manera constitutiva OmHSP104 en *O. minuta*, se ligó OmHSP104 a pOMexGP1U recuperado por medio de digestión con *SalI* y *EcoT221* dado a conocer en el documento WO 2003/091431. Se designó el plásmido resultante como onaP07107.

(7) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen OmKar2

Se deduce que el gen que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 13 (1998 pb) codifica para una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14 (665 residuos de aminoácido).

La proteína anterior tiene una homología de secuencia de nucleótidos de aproximadamente el 60,4% con respecto a Kar2 (YJL034W) de *S. cerevisiae* y una supuesta homología de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 74,6%. Por tanto, se dedujo que la proteína de interés era un homólogo funcional y se designó como OmKar2 al ser Kar2 de *O. minuta*. La secuencia de nucleótidos de OmKar2 comprende sitios de escisión para las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI*. Con el fin de recuperar un casete de expresión que comprendía una región desde un promotor hasta un terminador tras clonación en pOMEGPU-1, se modificaron los sitios de enzima de restricción *HindIII* y *KpnI* por medio de PCR de extensión por solapamiento usando los cebadores oligonucleotídicos a continuación.

OMKAR-F: 5'-GGTCGACATGTTTAAGTTGAAGCGGTCTG-3' (SEQ ID NO: 50)

OMKAR-R: 5'-GATGCATTCACAGCTCATCATGATCCCAG-3' (SEQ ID NO: 51)

Kar1-F: 5'-CACTAAGGATGCTGGAACCATGCGGTCTGGAAG-3' (SEQ ID NO: 52)

Kar1-R: 5'-CTTCCAGACCGGCAATGGTTCCAGCATCCTTAGTG-3' (SEQ ID NO: 53)

Kar2-F: 5'-CCAGCCCCAAGAGGAACCCACAAATTGAGGTGAC-3' (SEQ ID NO: 54)

Kar2-R: 5'-GTCACCTCAATTTGTGGGGTTCCTCTTGGGGCTGG-3' (SEQ ID NO: 55)

Kar3-F: 5'-CGGATTCGGCTCCAACTTGATGAGGATGACAAGG-3' (SEQ ID NO: 56)

Kar3-R: 5'-CCTTGTCACTCCTCATCAAGTTTGGAGCCGAATCCG-3' (SEQ ID NO: 57)

Se llevó a cabo una PCR usando el ADN genómico de *O. minuta* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (78870, PIERCE) como molde, los cebadores OMKAR-F y Kar1-R, los cebadores Kar1-F y Kar2-R, los cebadores Kar2-F y Kar3-R, y los cebadores Kar3-F y OMKAR-R, y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificaron así fragmentos de ADN diana de aproximadamente 0,6 kb, aproximadamente 0,95 kb, aproximadamente 0,3 kb y aproximadamente 0,2 kb. Posteriormente, se llevó a cabo una PCR usando los fragmentos amplificados anteriores, los cebadores OMKAR-F y OMKAR-R, y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificó así un fragmento de ADN diana de aproximadamente 2,0 kb

y se clonó el fragmento resultante en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que el fragmento diana tenía el gen OmKar2. A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN que contenía OmKar2 por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I* con la utilización del sitio de enzima de restricción *SalI* introducido en el cebador OMKAR-P y el sitio de enzima de restricción *EcoT22I* introducido en el cebador OMKAR-R. Con el fin de expresar de manera constitutiva OmKar2 en *O. minuta*, se ligó OmKar2 a pOMexGP1U recuperado por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I* dado a conocer en el documento WO 2003/091431. Se designó el plásmido resultante como onaP09007.

(8) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen ScPDI1

PDI1 (YCL043C) de *S. cerevisiae* consiste en una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 121) compuesta por 522 residuos de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótidos de 1569 pb (SEQ ID NO: 120). Se llevó a cabo una PCR usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE, 78870) como molde, el cebador ScPDI-sal-F (5'-GGTCGACATGAAGTTTTCTGCTGGTG-3': SEQ ID NO: 58), el cebador ScPDI-EcoT-R (5'-GATGCATTTACAATTCATCGTGAATG-3' SEQ ID NO: 59), y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificó así un fragmento de ADN diana de aproximadamente 1,6 kb y se clonó el fragmento resultante en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que el fragmento diana tenía el gen PDI1 de *S. cerevisiae* (ScPDI1). A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN que contenía ScPDI1 por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I* con la utilización del sitio de enzima de restricción *SalI* introducido en el cebador ScPDI-sal-F y el sitio de enzima de restricción *EcoT22I* introducido en el cebador ScPDI-EcoT-R. Con el fin de expresar de manera constitutiva ScPDI1 en *O. minuta*, se ligó ScPDI1 a pOMexGP1U recuperado por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I* dado a conocer en el documento WO 2003/091431. Se designó el plásmido resultante como onaP09307.

(9) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen de PDI humana

La PDI humana (hPDI, n.º de registro P07237) consiste en una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 141) compuesta por 508 residuos de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótidos de 1527 pb (SEQ ID NO: 140). El clon de ADNc de longitud completa humano, AK095938, carece de una secuencia de ADN de 20 pb (5'-GTACCTGCTGGTGGAGTTCT-3') desde los residuos 126 a 145 de un codón de iniciación. Se restauró una región de 20 pb ausente por medio de PCR de extensión por solapamiento usando AK095938 como molde. Posteriormente, se llevó a cabo una PCR usando el cebador SalmodifiedPDI-F (5'-GGTCGACATGCTGCGCCGCTCTGC-3': SEQ ID NO: 60), el cebador EcoTmodifiedPDI-R (5'-GATGCATTTACAGTTTCATCTTTACAG-3': SEQ ID NO: 61), y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se amplificó así un fragmento de ADN diana de aproximadamente 1,5 kb y se clonó el fragmento resultante en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que el fragmento diana tenía el gen de hPDI. A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN que contenía hPDI por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I* con la utilización del sitio de enzima de restricción *SalI* introducido en el cebador SalmodifiedPDI-F y el sitio de enzima de restricción *EcoT22I* introducido en el cebador EcoTmodifiedPDI-R. Con el fin de expresar de manera constitutiva hPDI en *O. minuta*, se ligó hPDI a pOMexGP1U recuperado por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I* dado a conocer en el documento WO 2003/091431. Se designó el plásmido resultante como onaP09207.

(10) Construcción de un vector de expresión constitutiva para gen de PDI humana con codones modificados

La PDI humana (hPDI, n.º de registro P07237) consiste en una secuencia de aminoácidos compuesta por 508 residuos de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótidos de 1527 pb. Se sintetizó el gen de hPDI teniendo en cuenta la preferencia de codones de *O. minuta* (Operon Biotechnologies). A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 142) que contenía hPDI sintetizada por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I* con la utilización del sitio de enzima de restricción *SalI* y el sitio de enzima de restricción *EcoT22I*, que se habían introducido en el momento de la síntesis. Con el fin de expresar de manera constitutiva la hPDI sintetizada en *O. minuta*, se ligó hPDI sintetizada a pOMexGP1U recuperado por medio de digestión con *SalI* y *EcoT22I* dado a conocer en el documento WO 2003/091431. Se designó el plásmido resultante como onaP09107.

[Ejemplo 4] Construcción de un vector de expresión para una combinación de genes de chaperonas

(1) Construcción del vector pZ/GpGt para la introducción de una segunda chaperona

Con el fin de coexpresar dos genes de chaperonas, se construyó un vector que comprendía el promotor de GAP y el terminador de GAP y que portaba, como marcador de selección, un gen resistente a Zeocin de la siguiente manera. Con el fin de sustituir el sitio de escisión para la enzima de restricción *HindIII* ubicado en el sentido de 5' del

promotor de GAP y el sitio de escisión para la enzima de restricción *KpnI* ubicado en el sentido de 3' del terminador de GAP de pOMexGP1U con la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *Apal*, GGGCCC, se llevó a cabo una PCR usando el cebador GAPp-02Apa (5'-GCAGGGCCCTACTGGTTC AAGG-3': SEQ ID NO: 62), el cebador GAPt-02Apa (5'-GCAGGGCCCGCTCGAATCGAC-3': SEQ ID NO: 63) y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 120 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se clonó el fragmento de ADN diana resultante de aproximadamente 2,1 kb en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que el fragmento diana comprendía la región de promotor de GAP y la región de terminador de GAP. Se introdujo el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada en el sitio *Apal* del vector pOMexGPZ/SynCH-AA, sustituido con la secuencia de reconocimiento de enzima de restricción *Apal* por medio de la inserción del ligador pApa I (Takara Bio, 4605P) en la secuencia de reconocimiento de enzima de restricción *HindIII* ubicada en el sentido de 5' del promotor de GAP y la secuencia de reconocimiento de enzima de restricción *KpnI* ubicada en el sentido de 3' del terminador de GAP de pOMexGPZ/SynCH. Por tanto, se construyó el vector pZ/GpGt que comprendía el promotor de GAP y el terminador de GAP que puede seleccionarse con el uso de un gen resistente a Zeocin.

(2) Construcción de un vector de coexpresión y expresión constitutiva para el gen OmPDI1 y el gen OmERO1

Se recuperó la región de OmERO1 del vector de expresión constitutiva de OmERO1, onaP03906, con la ayuda de las enzimas de restricción *SaI* y *EcoT22I*. Tras digerirse pZ/GpGt con las enzimas de restricción *SaI* y *EcoT22I*, se introdujo un fragmento de *SaI-EcoT22I* que contenía OmERO1 para construir pZ/GpGt/OmERO1. Posteriormente, se digirió pZ/GpGt/OmERO1 con la enzima de restricción *Apal*, y se recuperó un fragmento que comprendía el promotor de GAP-OmERO1-terminador de GAP (es decir, el casete de expresión de OmERO1). Se introdujo el casete de expresión de OmERO1 recuperado en el sitio de enzima de restricción *Apal* del vector de expresión de OmPDI1, onaP03606, se confirmó la dirección de inserción por medio de PCR y se seleccionó un vector en el que se había introducido el casete de expresión de OmPDI1 y OmERO1 en una orientación inversa uno con respecto a otro alrededor del marcador URA3 del vector de expresión de OmPDI1, onaP03606. Se designó el vector de coexpresión resultante para OmPDI1 y OmERO1 como onaP09507 (figura 1).

(3) Construcción de un vector de coexpresión y expresión constitutiva para el gen OmPDI1 y el gen OmKar2

Se recuperó la región de OmKar2 del vector de expresión constitutiva de OmKar2, onaP09007, con la ayuda de las enzimas de restricción *SaI* y *EcoT22I*. Tras digerirse pZ/GpGt con las enzimas de restricción *SaI* y *EcoT22I*, se introdujo un fragmento de *SaI-EcoT22I* que contenía OmKar2 para construir pZ/GpGt/OmKar2. Posteriormente, se digirió pZ/GpGt/OmKar2 con la enzima de restricción *Apal* y se recuperó un fragmento que comprendía el promotor de GAP-OmKar2-terminador de GAP (es decir, el casete de expresión de OmKar2). Se introdujo el casete de expresión de OmKar2 recuperado en el sitio de enzima de restricción *Apal* del vector de expresión de OmPDI1, onaP03606, se confirmó la dirección de inserción por medio de PCR y se seleccionó un vector en el que se había introducido el casete de expresión de OmPDI1 y OmKar2 en una orientación inversa uno con respecto a otro alrededor del marcador URA3 del vector de expresión de OmPDI1, onaP03606. Se designó el vector de coexpresión resultante para OmPDI1 y OmKar2 como onaP09707 (figura 1).

(4) Construcción de un vector de coexpresión y expresión constitutiva para el gen OmPDI1 y el gen OmHSP104

Se recuperó la región de OmHSP104 del vector de expresión constitutiva de OmHSP104, onaP07107, con la ayuda de las enzimas de restricción *SaI* y *EcoT22I*. Tras digerirse pZ/GpGt con las enzimas de restricción *SaI* y *EcoT22I*, se introdujo un fragmento de *SaI-EcoT22I* que contenía OmHSP104 para construir pZ/GpGt/OmHSP104. Posteriormente, se digirió pZ/GpGt/OmHSP104 con la enzima de restricción *Apal* y se recuperó un fragmento que comprendía el promotor de GAP-OmHSP104-terminador de GAP (es decir, el casete de expresión de OmHSP104). Se introdujo el casete de expresión de OmHSP104 recuperado en el sitio de enzima de restricción *Apal* del vector de expresión de OmPDI1, onaP03606, se confirmó la dirección de inserción por medio de PCR y se seleccionó un vector en el que se había introducido el casete de expresión de OmPDI1 y OmHSP104 en una orientación inversa uno con respecto a otro alrededor del marcador URA3 del vector de expresión de OmPDI1, onaP03606. Se designó el vector de coexpresión resultante para OmPDI1 y OmHSP104 como onaP09607 (figura 1).

(5) Construcción de un vector de expresión constitutiva que comprende dos copias de casetes de expresión del gen OmPDI1

Se recuperó la región de OmPDI1 del vector de expresión constitutiva de OmPDI1, onaP03606, con la ayuda de las enzimas de restricción *SaI* y *EcoT22I*. Tras digerirse pZ/GpGt con las enzimas de restricción *SaI* y *EcoT22I*, se introdujo un fragmento de *SaI-EcoT22I* que contenía OmPDI1 para construir pZ/GpGt/OmPDI1. Posteriormente, se digirió pZ/GpGt/OmPDI1 con la enzima de restricción *Apal* y se recuperó un fragmento que comprendía el promotor de GAP-OmPDI1-terminador de GAP (es decir, el casete de expresión de OmPDI1). Se introdujo el casete de expresión de OmPDI1 recuperado en el sitio de enzima de restricción *Apal* del vector de expresión de OmPDI1, onaP03606, se confirmó la dirección de inserción por medio de PCR y se seleccionó un vector en el que se había introducido un casete de expresión de la primera copia, OmPDI1, y un casete de expresión de la segunda copia, OmPDI1, en una orientación inversa uno con respecto a otro alrededor del marcador URA3 del vector de expresión

de OmPDI1, onaP03606. Se designó el vector de coexpresión resultante que comprendía dos copias de los casetes de expresión de OmPDI1 como onaP09407 (figura 1).

(6) Construcción de un vector de coexpresión y expresión constitutiva para el gen de hPDI y el gen OmERO1

Se recuperó la región de OmERO1 del vector de expresión constitutiva de OmERO1, onaP03906, con la ayuda de las enzimas de restricción *SalI* y *EcoT22I*. Tras digerirse pZ/GpGt con las enzimas de restricción *SalI* y *EcoT22I*, se introdujo un fragmento de *SalI-EcoT22I* que contenía OmERO1 para construir pZ/GpGt/OmERO1. Posteriormente, se digirió pZ/GpGt/OmERO1 con la enzima de restricción *Apal* y se recuperó un fragmento que comprendía el promotor de GAP-OmERO1-terminador de GAP (es decir, el casete de expresión de OmERO1). Se introdujo el casete de expresión de OmERO1 recuperado en el sitio de enzima de restricción *Apal* del vector de expresión constitutiva para el gen de PDI humana con codones modificados, onaP09107, se confirmó la dirección de inserción por medio de PCR y se seleccionó un vector en el que se había introducido el casete de expresión de OmERO1 y HPDI humana con codones modificados en una orientación inversa uno con respecto a otro alrededor del marcador URA3 del vector constitutivo de PDI humana con codones modificados, onaP09107. Se designó el vector de coexpresión resultante para PDI humana con codones modificados y OmERO1 como onaP11107 (figura 2).

(7) Construcción de un vector de coexpresión y expresión constitutiva para los genes OmPDI1, OmERO1 y OmKar22

Se construyó un vector de coexpresión para tres genes de chaperonas de la siguiente manera.

(7-1) Construcción de un vector de expresión de gen foráneo (pOMexPGHy) con un promotor y un terminador de fosfoglicerina cinasa (PGK1) usando un gen resistente a higromicina B como marcador de selección

Se obtuvo el gen PGK1 que codifica para fosfoglicerina cinasa a partir de la cepa IFO10746 de *Ogataea minuta* y se determinó la secuencia de nucleótidos del mismo.

(i) Preparación de sondas

Se sintetizaron cebadores degenerados de ADN que comprendían secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos conservadas, es decir, RVDFNVPLD y EGKELPGVA, derivadas de *Saccharomyces cerevisiae* (número de registro GenBank: P00560) y *Candida maltosa* (número de registro GenBank: P41757) de la siguiente manera.

PPG5: 5'-GN GTN GAY TTY AAY GTN CCN TTR GA-3' (SEQ ID NO: 64)

PPG3: 5'-GY NAC DCC NGG YAA YTC YTT DCC YTC-3' (SEQ ID NO: 65)

El cebador PPG5 (SEQ ID NO: 64) corresponde a la secuencia de aminoácidos, RVDFNVPLD, y el cebador PPG3 (SEQ ID NO: 65) es una secuencia de una hebra complementaria de una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos, EGKELPGVA. Se usó ADN cromosómico de la cepa IFO10746 de *O. minuta* como molde, se llevó a cabo una PCR usando los cebadores PPG5 y PPG3 a 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y se repitió este ciclo 25 veces. Se recuperó un fragmento de ADN amplificado (de aproximadamente 1,2 kb) y se clonó usando el kit de clonación TOPO TA. Se aisló ADN plasmídico del clon resultante y se determinó la secuencia de nucleótidos. Por tanto, se seleccionó un clon que tenía una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos que tiene una alta homología con la secuencia de aminoácidos del gen PGK1 derivado de *S. cerevisiae* y *C. maltosa* en el fragmento de ADN con inserción de plásmido. Se recuperó un fragmento con inserción de ADN de 1,2 kb tras escindir el plásmido con *EcoRI*, seguido por electroforesis en gel de agarosa.

(ii) Preparación y examen de biblioteca

Se escindió ADN cromosómico de la cepa IFO10746 de *O. minuta* con diversas enzimas de restricción y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Se transfirió el ADN separado a la membrana de nailon Hybond N+ (GE Healthcare Bio-Sciences). Se marcó el fragmento de ADN obtenido anteriormente con el uso de AlkPhos DIRECT (RPN3690, GE Healthcare Bio-Sciences), seguido por hibridación de tipo Southern. Se llevó a cabo la hibridación según una técnica convencional (Molecular cloning 2nd edn., ed. Sambrook, J., *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory U.S.A., 1989). Como resultado, se consideró que el gen PGK1 estaba presente en un fragmento de *BamHI* de aproximadamente 9,0 kb. Con el fin de clonar el fragmento de ADN, se preparó una biblioteca genómica. Se escindió ADN cromosómico de *O. minuta* con *BamHI* y se sometió a electroforesis en agarosa, y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 9,0 kb del gel. Se ligó el fragmento de ADN recuperado a pUC118 escindido con *BamHI* y se transformó en la cepa DH5 α de *E. coli* según el método de Hanahan (Gene, 10, 63, 1980) para preparar la biblioteca. Se examinaron aproximadamente 4.000 clones por medio de hibridación de colonias usando los fragmentos de ADN mencionados anteriormente como sondas. De entre los clones positivos obtenidos, se seleccionaron los plásmidos pOMPGK1 que portaban los genes PGK1.

(iii) Secuenciación de nucleótidos

Se determinó la secuencia de nucleótidos en la región de *Bam*HI en el plásmido pOMPGK1 mediante el método de paseo con cebador y se encontró que la secuencia determinada tenía la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 66. La secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 66 comprende un marco de lectura abierto que comprende 1.254 pares de bases desde los nucleótidos 4.766 hasta 6.016. Se inspeccionó la homología entre la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 67 que se deduce basándose en el marco de lectura abierto y fosfoglicerina cinasas derivadas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida maltosa*. Como resultado, se encontró que la primera homología era del 74% y que la segunda homología era del 81%.

(iv) Construcción de un casete de expresión de gen foráneo usando el promotor y el terminador del gen PGK1

Se preparó un casete de expresión que introduce un gen foráneo entre un fragmento que contenía el promotor del gen PGK1 y un fragmento que contenía un terminador de *O. minuta*. Con el fin de introducir los sitios *Spe*I, *Bgl*II y *Bam*HI entre el promotor y el terminador del gen PGK1, se sintetizaron los siguientes cebadores.

OPGK-P-F: 5'-AAGCTTGACAATGTAGGAGATCATAAACACATCGTGCGCGTC-3' (SEQ ID NO: 68)

OPGK-P-R: 5'-GGATCCAGATCTCATATGACTAGTTGCTAGTTCTATGCGGCGTTAGTGTTTACACTACGACAGCT-3' (SEQ ID NO: 69)

OPGK-T-F: 5'-GGATCCGTGGGATTTGCGTGATCGTACGTAGTGGTTATTTT-3' (SEQ ID NO: 70)

OPGK-T-R: 5'-GGTACCGCAGTGAAAGGCGATGCCACCATGTGCAAGGAGTTC-3' (SEQ ID NO: 71)

Usando el pOMPGK1 anterior como molde, se llevó a cabo una PCR usando el cebador OPGK-P-F (SEQ ID NO: 68) y el cebador OPGK-P-R (SEQ ID NO: 69) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y se repitió este ciclo 20 veces. Además, se llevó a cabo una PCR usando el cebador OPGK-T-F (SEQ ID NO: 70) y el cebador OPGK-T-R (SEQ ID NO: 71) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y se repitió este ciclo 20 veces. Se recuperaron fragmentos de ADN de 1,5 kb y 1,0 kb amplificados y se clonaron usando el kit de clonación TOPO TA. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN de inserción para seleccionar clones que tenían las secuencias de nucleótidos correctas. Se aislaron los fragmentos de ADN de inserción de 1,5 kb y 1,0 kb como el fragmento de *Hind*III-*Bam*HI y el fragmento de *Bam*HI-*Kpn*I, respectivamente.

Se introdujo el fragmento de *Bam*HI-*Kpn*I de 1,0 kb mencionado anteriormente entre *Bam*HI y *Kpn*I de pOMex5H descrito en el documento WO 2003/091431. Después de esto, se introdujo el fragmento de *Hind*III-*Bam*HI de 1,5 kb mencionado anteriormente entre *Hind*III y *Bam*HI del plásmido obtenido. Se designó el plásmido resultante como pOMexPGHy. pOMexPGHy es un vector de expresión de gen foráneo que comprende los sitios *Spe*I, *Bgl*II y *Bam*HI en el casete de expresión del gen PGK1.

(7-2) Construcción de vector de coexpresión para OmPDI1 y OmERO1 por medio de la regulación de la expresión mediante el promotor de GAP y para OmKar2 por medio de la regulación de la expresión mediante el promotor de PGK

Se clonaron las regiones de promotor de PGK y de terminador de PGK por medio de PCR a partir del vector pOMexPGNy preparado de la manera descrita anteriormente. Se sometió la región de promotor de PGK a PCR usando el cebador OmPGKp-01Hd (5'-GGAAGCTTGACAATGTAGGAGATCATAAACA-3': SEQ ID NO: 72) y el cebador OmPGKp-02Sal (5'-GGTCGACTGCTAGTTCTATGCGGC-3': SEQ ID NO: 73) y se sometió la región de terminador de PGK a PCR usando el cebador OmPGKt-01EcoT (5'-GGATGCATGTGGGATTTGCGTGATCTAC-3': SEQ ID NO: 74) y el cebador OmPGKt-02Kpn (5'-GGGTACCAGGGTCGATTTTCTTGGTCG-3': SEQ ID NO: 75) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos con el uso de ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024), y se repitió este ciclo 30 veces. Se clonaron los fragmentos de ADN diana resultantes de aproximadamente 1,5 kb y aproximadamente 0,5 kb en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que los fragmentos diana comprendían las regiones de promotor de PGK y de terminador de PGK.

Posteriormente se digirió el vector de expresión constitutiva para el gen OmKar2, onaP09007, con las enzimas de restricción *Eco*T22I y *Kpn*I y se ligó el fragmento resultante a la región de terminador de PGK recuperada por medio de digestión con las enzimas de restricción *Eco*T22I y *Kpn*I. Además, se digirió el plásmido resultante con las enzimas de restricción *Hind*III y *Sal*I, y se ligó el fragmento resultante a la región de terminador de PGK recuperada por medio de digestión con las enzimas de restricción *Hind*III y *Sal*I. En el plásmido resultante, se sustituyeron el promotor de GAP y el terminador de GAP por el promotor de PGK y el terminador de PGK, y se reguló la expresión de OmKar2 mediante el promotor de PGK. Por tanto, se designó como el vector pOU1/Kar2Ppt (figura 3). Se proporcionó extremos romos al sitio de enzima de restricción *Hind*III de pOU1/Kar2Ppt, se introdujo el sitio de

escisión para la enzima de restricción *KpnI* con el uso del ligador *pKpnI* (Takara Bio, 4668P), y se designó el vector resultante como pOU1/Kar2-PptK.

Posteriormente, se digirió pOU1/Kar2-PptK con la enzima de restricción *KpnI*, se recuperó un fragmento que contenía el promotor de PGK-OmKar2-terminador de PGK (es decir, el casete de expresión de OmKar2) y se introdujo el fragmento resultante en el sitio de enzima de restricción *KpnI* del vector de coexpresión para OmPDI1 y OmERO1, onaP09507, para construir el vector de coexpresión para OmPDI1, OmERO1 y OmKar2, onaP11007 (figura 4).

[Ejemplo 5] Preparación de una cepa de levadura con introducción de chaperonas (*O. minuta*)

Se digirieron todos los vectores de expresión constitutiva para el gen de chaperonas construido en el ejemplo 4 con la enzima de restricción *NotI* y entonces se introdujo en la cepa YK5 de *O. minuta* ($\Delta och1\Delta yps1\Delta ura3\Delta ade1$: una cepa en la que se había destruido el gen de proteasa YPS1 de *Ogataea minuta*) por medio de electroporación. Se llevó a cabo la electroporación en las condiciones descritas en el documento WO 2003/091431. Tras la electroporación, se aplicó el fragmento resultante sobre medio de agar Casamino-U que se había esterilizado por medio de inyección de vapor a presión (6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,5 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de glucosa, 20 mg/l de L-triptófano, 20 mg/l de adenina y 20 g/l de agar Bacto), seguido por multiplicación a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido volviera a crecer sobre medio de agar Casamino-U, un transformante en el que el gen de chaperonas, cuya expresión se regula mediante el promotor de GAP, se seleccionó por medio de PCR de colonias. Se suspendió parte de la levadura que se había multiplicado sobre medio de agar Casamino-U en 10 μ l de una disolución de SDS al 0,25%, se añadieron 90 μ l de agua esterilizada y entonces se retiraron las células de levadura por medio de centrifugación a 2.700 x g y 4°C durante 5 minutos. Se designó el sobrenadante obtenido como disolución de ADN. Se designó una cepa que se confirmó que se había amplificado con el uso del cebador GAPpforS-F (5'-GATCTCAGGCCGAGTCAAGAC-3': SEQ ID NO: 76) diseñado en la secuencia de promotor de GAP y el cebador mostrado a continuación, como cepa en la que se había introducido un vector de expresión constitutiva para el gen de chaperonas. Al construir un vector de coexpresión para tres genes de chaperonas, se expresó OmKar2 con el uso del promotor de PGK. Por tanto, se confirmó la introducción del casete de expresión de promotor de PGK-Omkar2-terminador de PGK con el uso del cebador PGKpforS-F (5'-TAACGCCGCATAGAACTAGC-3': SEQ ID NO: 77) diseñado en la secuencia de promotor de PGK y el cebador OMKAR-R (5'-GATGCATTCACAGCTCATCATGATCCCAG-3': SEQ ID NO: 51).

(p1) Un cebador usado para confirmar la introducción de OmPDI1 y 2 copias de OmPDI1

OMPDI1T22I: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCGTGAGCCAC-3' (SEQ ID NO: 29)

(p2) Un cebador usado para confirmar la introducción de OmMPD1

OMIC1379T22I: 5'-GATGCATTCATAGCTCATCTTTTTC-3' (SEQ ID NO: 35)

(p3) Un cebador usado para confirmar la introducción de OmSCJ1

OMSCJ1T22I: 5'-GATGCATTCACAGCTCGTCGTGCAAC-3' (SEQ ID NO: 37)

(p4) Un cebador usado para confirmar la introducción de OmEUG1

OMEUG1T22I: 5'-GATGCATTCACAGCTCATCCTTGCTGG-3' (SEQ ID NO: 39)

(p5) Un cebador usado para confirmar la introducción de OmERO1

OMEROT22I: 5'-GATGCATTTATAGCTCCAAACGATACAG-3' (SEQ ID NO: 45)

(p6) Un cebador usado para confirmar la introducción de OmHSP104

OmHSP104EcoTR: 5'-GATGCATTTAATCGAGATCAGGACTGC-3' (SEQ ID NO: 49)

(p7) Un cebador usado para confirmar la introducción de OmKar2

OMKAR-R: 5'-GATGCATTCACAGCTCATCATGATCCCAG-3' (SEQ ID NO: 51)

(p8) Un cebador usado para confirmar la introducción de ScPDI1

ScPDI-EcoT-R: 5'-GATGCATTTACAATTCATCGTGAATG-3' (SEQ ID NO: 59)

(p9) Un cebador usado para confirmar la introducción de hPDI

*EcoT*modifiedPDI-R: 5'-GATGCATTTACAGTTCATCTTTACAG-3' (SEQ ID NO: 61)

(p10) Un cebador usado para confirmar la introducción de hPDI sintetizada

5 ShPDI-ttaR: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCCTTAAC-3' (SEQ ID NO: 78)

(p11) Un cebador usado para confirmar la introducción de OmPDI1+OmERO1

10 OMPDI1T22I: 5'-GATGCATTTACAAGTGGTCGTGAGCCAG-3' (SEQ ID NO: 29) y OMEROT22I: 5'-GATGCATTTATAGCTCCAAACGATACAG-3' (SEQ ID NO: 45)

(p12) Un cebador usado para confirmar la introducción de OmPDI1+OmKar2

15 OMPDI1T22I: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCGTGAGCCAC-3' (SEQ ID NO: 29) y OMKAR-R: 5'-GATGCATTCACAGCTCATCATGATCCCAG-3' (SEQ ID NO: 51)

(p13) Un cebador usado para confirmar la introducción de OmPDI1+OmHSP104

20 OMPDI1T22I: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCGTGAGCCAC-3' (SEQ ID NO: 29) y OmHSP104*Eco*TR: 5'-GATGCATTTAATCGAGATCAGGACTGC-3' (SEQ ID NO: 49)

(p14) Un cebador usado para confirmar la introducción de hPDI sintetizada+OmERO1

25 ShPDI-ttaR: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCCTTAAC-3' (SEQ ID NO: 78) y OMEROT22I: 5'-GATGCATTTATAGCTCCAAACGATACAG-3' (SEQ ID NO: 45):

(p15) Un cebador usado para confirmar la introducción de OmPDI1+OmERO1+OmKar2

30 OMPDI1T22I: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCGTGAGCCAC-3' (SEQ ID NO: 29), OMEROT22I: 5'-GATGCATTTATAGCTCCAAACGATACAG-3' (SEQ ID NO: 45) y OMKAR-R: 5'-GATGCATTCACAGCTCATCATGATCCGAG-3' (SEQ ID NO: 51).

35 Se amplificó un fragmento diana por medio de PCR usando TaKaRa LA Taq™ con tampón GC (Takara Bio, RR02AG) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante de 60 a 180 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se designaron los transformantes a continuación, que se confirmó que se habían amplificado, como cepas que expresan de manera constitutiva una chaperona.

(E1) La cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1, la cepa ona03306

40 (E2) La cepa que expresa de manera constitutiva OmMPD1, la cepa ona03406

(E3) La cepa que expresa de manera constitutiva OmSCJ1, la cepa ona03506

45 (E4) La cepa que expresa de manera constitutiva OmEUG1, la cepa ona03706

(E5) La cepa que expresa de manera constitutiva OmERO1, la cepa ona03606

(E6) La cepa que expresa de manera constitutiva OmHSP104, la cepa ona13407

50 (E7) La cepa que expresa de manera constitutiva OmKar2, la cepa ona23007

(E8) La cepa que expresa de manera constitutiva ScPDI1, la cepa ona26907

55 (E9) La cepa que expresa de manera constitutiva hPDI, la cepa ona31107

(E10) La cepa que expresa de manera constitutiva HPDI sintética, la cepa ona30807

(E11) La cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1+OmERO1, la cepa ona27607

60 (E12) La cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1+OmKar2, la cepa ona30507

(E13) La cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1+OmHSP104, la cepa ona27707

(E14) La cepa que expresa de manera constitutiva 2 copias de OmPDI1, la cepa ona27207

65 (E15) La cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética+OmERO1, la cepa ona45007

(E16) La cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1+OmERO1+OmKar2, la cepa ona44607

[Ejemplo 6] Construcción de una cepa de levadura productora de anticuerpo (*O. minuta*)

Se introdujo el vector de expresión para el gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) construido en el ejemplo 2 en la cepa de levadura (*O. minuta*) para preparar una cepa de levadura productora de anticuerpo. Como cepa de levadura (*O. minuta*), se usó la cepa ona01206 preparada a partir de la cepa YK5 de *O. minuta* de la siguiente manera.

Cuando la cepa YK5 de *O. minuta* no complementaba una mutación de delección de *ura3*, se redujo la capacidad de crecimiento se delecionó el codón de iniciación del gen de *ura3*. Por consiguiente, con el fin de complementar una mutación de delección de *ura3*, se llevó a cabo una recombinación homóloga usando el fragmento de OmURA3 para complementar una mutación de delección de *ura3*. Tras transformar la cepa YK5 de *O. minuta* con el uso del fragmento de OmURA3 por medio de electroporación, se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U, que se había esterilizado por medio de inyección de vapor a presión, y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido volviera a crecer sobre medio de agar Casamino-U, se suspendió parte de la levadura que había crecido sobre medio de agar Casamino-U en 10 µl de una disolución de SDS al 0,25%, se añadieron 90 µl de agua esterilizada y se retiraron las células de levadura por medio de centrifugación a 2.700 x g y 4°C durante 5 minutos. Se designó el sobrenadante obtenido como disolución de ADN. Con el uso del cebador OmURA3F (5'-ATGTCCTCGACTAAGACATACGC-3': SEQ ID NO: 79) y el cebador OmURA3R (5'-TCATGCGACACGACTCAAATAAG-3': SEQ ID NO: 80), que se habían diseñado en el lado del codón de iniciación y en el lado del codón de terminación del gen de *ura3*, respectivamente, se amplificó un fragmento diana de aproximadamente 0,8 kb usando TaKaRa LA Taq™ con tampón GC (Takara Bio, RR02AG) (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces). Se designó el transformante, que se confirmó que se había amplificado, como la cepa ona01206 como cepa candidata de *ura3*.

Posteriormente, se introdujo el vector de expresión para el gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) construido en el ejemplo 2 en la cepa ona01206 por medio de electroporación. Como cadena pesada de anticuerpo, se usó 1 µg de onaP02706 digerido con la enzima de restricción Sse8387I. Como cadena ligera de anticuerpo, se usó 1 µg de onaP03106 digerido con la enzima de restricción NotI. Tras la electroporación, se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 µg/ml (6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,5 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de glucosa, 20 mg/l de L-triptófano y 20 g/l de agar Bacto), y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido volviera a crecer sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 µg/ml, y se designó el transformante resultante como cepa productora de secreción de anticuerpo. Se cultivó la cepa productora de anticuerpo de la siguiente manera. Con el uso de medio 2x YP-P6-GG (se preparó el medio disolviendo 20 g de extracto de levadura Difco y 40 g de peptona Bacto en 900 ml de agua pura, esterilizando la disolución por medio de inyección de vapor a presión y añadiendo 100 ml de tampón fosfato 10x (pH 6,0) (KH₂PO₄ 1 M, (NH₄)₂SO₄ 0,15 M, KOH 0,375 N) esterilizado por separado, 10 ml de una disolución de glucosa al 50% esterilizada por separado y 25 ml de glicerina al 80% esterilizada por separado), se introdujeron de 800 µl a 1000 µl de medio 2x YP-P6-GG en una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, 780271), se sembraron las cepas con el uso de un palillo de dientes y se selló la parte superior de la placa con selladores de placa permeables al CO₂ (Greiner, 676051). Se llevó a cabo el cultivo a una velocidad de agitación de 310 rpm, una amplitud de 50 mm, a 30°C durante 3 ó 4 días. Se retiraron las células de levadura de la disolución de cultivo por medio de centrifugación a 2.700 x g y 4°C durante 5 minutos para preparar un sobrenadante de cultivo, y se designó el sobrenadante resultante como muestra de anticuerpo de secreción.

Se sometieron los anticuerpos secretados y producidos a ensayo cuantitativo por medio de ELISA tipo sándwich. Se adsorbieron proteínas de receptor de TRAIL que eran antígenos de los anticuerpos anti-receptor de TRAIL en una placa de 96 pocillos, se añadió una muestra de anticuerpo de secreción y se llevó a cabo la detección usando un anticuerpo anti-Fc específico de IgG humana marcado con peroxidasa (anticuerpo frente a IgG humana (Fc) purificado por afinidad marcado con peroxidasa (KPL, 04-10-20)) y el sustrato ABTS peroxidasa (KPL, 50-66-01). La cepa de levadura productora de anticuerpo seleccionada, ona02306, presentaba la capacidad para secretar y producir un anticuerpo a aproximadamente 0,8 mg/l (figura 5).

[Ejemplo 7] Efectos de la inhibición de la adición de cadena de O-azúcar de levadura productora de anticuerpo provocada por la adición de un inhibidor de proteína manosil transferasa (PMT) sobre la producción de anticuerpo

Se cultivó la levadura productora de anticuerpo obtenida en el ejemplo 6 en condiciones en las que se inhibía la formación de cadena de O-azúcar por medio de la adición de inhibidores de PMT (inhibidores de PMT, derivado de ácido rodanin-3-acético: ácido 5-[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metilen]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinacético (se añadió al medio el compuesto 1c descrito en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 14, pág. 3975, 2004). Con el uso de medio 2x YP-P6-GG [(se preparó el medio disolviendo 20 g de extracto de levadura Difco y 40 g de peptona

Bacto en 900 ml de agua pura, esterilizando la disolución por medio de inyección de vapor a presión y añadiendo 100 ml de tampón fosfato 10x (pH 6,0) (KH_2PO_4 1 M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,15 M, KOH 0,375 N) esterilizado por separado, 10 ml de una disolución de glucosa al 50% esterilizada por separado y 25 ml de glicerina al 80% esterilizada por separado), se introdujeron 800 μl de medio 2x YP-P6-GG en una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, 780271), se sembraron las cepas con el uso de un palillo de dientes y se selló la parte superior de la placa con selladores de placa permeables al CO_2 (Greiner, 676051). Se llevó a cabo el cultivo control a una velocidad de agitación de 310 rpm, una amplitud de 50 mm, a 30°C durante 2 días, se añadieron 100 μl de medio 2x YP-P6-GG y se añadieron adicionalmente 100 μl de medio 2x YP-P6-GG el día 3. En el caso de cultivo que implicaba la adición simple de un derivado de ácido rodanin-3-acético 1c, se llevó a cabo el cultivo a una velocidad de agitación de 310 rpm, una amplitud de 50 mm, a 30°C durante 2 días, se añadieron 100 μl de medio 2x YP-P6-GG y se añadieron adicionalmente 100 μl de medio 2x YP-P6-GG que contenía 20 μM de 1c el día 3. En el caso de cultivo que implicaba la adición de un derivado de ácido rodamin-3-acético 1c dos veces, se llevó a cabo el cultivo a una velocidad de agitación de 310 rpm, una amplitud de 50 mm, a 30°C durante 2 días, se añadieron 100 μl de medio 2x YP-P6-GG que contenía 20 μM de 1c y se añadieron adicionalmente 100 μl de medio 2x YP-P6-GG que contenía 20 μM de 1c el día 3.

Se confirmaron la secreción y producción de un anticuerpo por medio de ELISA tipo sándwich o inmunotransferencia de tipo Western. Se retiraron las células de levadura del producto de cultivo por medio de centrifugación a 2.700 x g y 4°C durante 5 minutos, y se designó el sobrenadante de cultivo resultante como muestra de anticuerpo secretado. Se sometieron los anticuerpos secretados y producidos a ensayo cuantitativo por medio de ELISA tipo sándwich. Se adsorbieron proteínas de receptor de TRAIL que eran antígenos de los anticuerpos anti-receptor de TRAIL en una placa de 96 pocillos, se añadió la muestra de anticuerpo secretado y se llevó a cabo la detección usando un anticuerpo anti-Fc específico de IgG humana marcado con peroxidasa (anticuerpo frente a IgG humana (Fc) purificado por afinidad marcado con peroxidasa (KPL, 04-14-20)) y el sustrato ABTS peroxidasa (KPL, 50-66-01).

Se llevó a cabo una inmunotransferencia de tipo Western tal como sigue. Tras someter la proteína a SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, se transfirió la proteína separada a una membrana de PVDF y se detectaron la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo usando anticuerpo anti-IgG humana (específico de cadena γ) (Sigma, 1-3382) y anticuerpo de cabra anti-kappa b&f humana purificado por afinidad (Bethyl, A-80-115A) como anticuerpos primarios. Se usó anticuerpo anti-IgG de cabra purificado por afinidad conjugado con peroxidasa (H&L) (conejo) (Rockland, n.º 605-4313) como anticuerpo secundario. Se llevó a cabo la detección usando el kit de detección de inmunotransferencia de tipo Western ECL Advance (GE, RPN2135).

Tal como se muestra en la figura 5, una muestra control (la cepa ona02306) presentaba una cantidad de secreción y producción de un anticuerpo a 0,8 mg/l. Con una adición sencilla de inhibidores de PMT, se aumentó la cantidad de producción de anticuerpo hasta aproximadamente 1,7 mg/l y se aumentó hasta aproximadamente 1,9 mg/l; es decir, de aproximadamente 2,1 a aproximadamente 2,4 veces más, por medio de la adición de inhibidores de PMT dos veces. Es decir, se aumentó la cantidad de producción de anticuerpo en de aproximadamente 2,1 a aproximadamente 2,4 veces por medio de la adición de inhibidores de PMT (figura 5). Además, el análisis de inmunotransferencia de tipo Western demostró que, en cultivo control, se detectaba una cadena pesada de anticuerpo de alto peso molecular con una menor movilidad que la cadena pesada de anticuerpo por medio de electroforesis en condiciones reductoras mediante un anticuerpo específico de cadena pesada de anticuerpo, aunque la cadena pesada de anticuerpo de alto peso molecular disminuyó por medio de la adición de inhibidores de PMT al cultivo (figura 6: SDS-PAGE/WB en condiciones reductoras, se detectaron simultáneamente Hc de anticuerpo y Lc de anticuerpo). Por consiguiente, cuando debía cultivarse la levadura transformada con el uso de una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, 780271) con la adición de inhibidores de PMT, se llevó a cabo el cultivo a 30°C durante 2 días, y se llevó a cabo adicionalmente el cultivo añadiendo 100 μl de medio 2x YP-P6-GG que contenía 20 μM de 1c y entonces 100 μl de medio 2x YP-P6-GG que contenía 20 μM de 1c 3 días más tarde.

[Ejemplo 8] Construcción de una cepa de levadura productora de anticuerpo (*O. minuta*) que expresa de manera constitutiva una chaperona.

Se introdujo el vector de expresión para el gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) construido en el ejemplo 2 en cada una de las cepas que expresan de manera constitutiva una chaperona sola cultivadas en el ejemplo 5 por medio de electroporación. Como cadena pesada de anticuerpo, se usó 1 μg de onaP02706 digerido con la enzima de restricción Sse83871. Como cadena ligera de anticuerpo, se usó 1 μg de onaP03106 digerido con la enzima de restricción NotI. Tras la electroporación, se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,5 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de glucosa, 20 mg/l de L-triptófano y 20 g/l de agar Bacto), y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido volviera a crecer sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se examinó una cepa que secreta y produce un anticuerpo. Se seleccionó la cepa ona08906 como la cepa que expresa de manera constitutiva OmSCJ1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona09206 como la cepa que expresa de manera constitutiva OmEUG1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido

en la misma, se seleccionó la cepa ona09406 como la cepa que expresa de manera constitutiva OmERO1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona26407 como la cepa que expresa de manera constitutiva OmKar2 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona09506 como la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, y se seleccionó la cepa ona15807 como la cepa que expresa de manera constitutiva OmHSP104 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma.

[Ejemplo 9] Efectos de una chaperona sobre la producción secretora de anticuerpo

Con el uso de la cepa que expresa de manera constitutiva una chaperona y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma obtenida en el ejemplo 8, se examinaron los efectos de la introducción de chaperona sobre la producción secretora de anticuerpo. Además, se examinaron los efectos de potenciación de la producción secretora de anticuerpo provocados por la adición de inhibidores de PMT que se encontraron en el ejemplo 7. Tal como se muestra en la figura 7, una cepa control (es decir, la cepa ona02306) presentaba una cantidad de producción secretora de anticuerpo de aproximadamente 0,8 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva OmSCJ1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona08906) presentaba una de aproximadamente 2,6 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva OmEUG1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona09206) presentaba una de 1,4 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva OmERO1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona09406) presentaba una de 2,4 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva OmKar2 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona26407) presentaba una de 3,6 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva OmMPD1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona09506) presentaba una de 1,3 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona09806) presentaba una de 4,2 mg/l, y la cepa que expresa de manera constitutiva OmHSP104 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona15807) presentaba una de 1,8 mg/l. Potenciando la expresión de chaperona, se mejoró la capacidad de producción secretora de anticuerpo en aproximadamente de 2 a 5 veces. Además, se encontró que la adición de inhibidores de PMT al cultivo mejoraba la cantidad de producción secretora de anticuerpo de todas las cepas producidas, tal como se muestra en la figura 7. En el caso de la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona09806), en particular, se encontró que la cantidad de producción secretora de anticuerpo mejoraba en aproximadamente 15 veces más que la obtenida por medio de cultivo control de la cepa en la que se había introducido el gen de anticuerpo (es decir, la cepa ona02306) construida en el ejemplo 6. Tal como se muestra en la figura 8, se confirmó claramente por medio de análisis de inmunotransferencia de tipo Western tras electroforesis en condiciones no reductoras que se secretaba y producía un anticuerpo de longitud completa (H2L2).

[Ejemplo 10] Efectos de la combinación de chaperonas

Se introdujo el vector de expresión para el gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) construido en el ejemplo 2 en la cepa que expresa de manera constitutiva dos tipos de chaperonas cultivadas en el ejemplo 5 por medio de electroporación. Como cadena pesada de anticuerpo, se usó 1 µg de onaP02706 digerido con la enzima de restricción Sse8387I. Como cadena ligera de anticuerpo, se usó 1 µg de onaP03106 digerido con la enzima de restricción NofI. Tras la electroporación, se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 µg/ml (6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,5 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de glucosa, 20 mg/l de L-triptófano y 20 g/l de agar Bacto) y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido volviera a crecer sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 µg/ml y se examinó una cepa que secreta y produce un anticuerpo. Se seleccionó la cepa ona32507 como la cepa que porta dos unidades de expresión de OmPDI1 y que expresa de manera constitutiva OmPDI1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa 2xOmPDI1), se seleccionó la cepa ona33407 como la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1/OmHSP104 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona40007 como la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1/OmKar2 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, y se seleccionó la cepa ona33107 como la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1/OmERO1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma.

Tal como se muestra en la figura 9, una cepa control en la que se había introducido el gen de anticuerpo (es decir, la cepa ona02306) presentaba una cantidad de producción secretora de anticuerpo de aproximadamente 0,8 mg/l y aproximadamente 1,9 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, la cepa que expresa de manera constitutiva OmHSP104 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona15807) presentaba una de aproximadamente 1,8 mg/l y aproximadamente 4,6 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, la cepa que expresa de manera constitutiva OmKar2 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona26407) presentaba una de aproximadamente 3,6 mg/l y aproximadamente 8,9 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, la cepa que expresa de manera constitutiva OmERO1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona09406) presentaba una de aproximadamente 2,4 mg/l y aproximadamente 7,6 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, y la cepa que expresa de manera constitutiva

OmPDI1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona09806) presentaba una de aproximadamente 4,2 mg/l y aproximadamente 12,2 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT. Por el contrario, la cepa que expresa de manera constitutiva 2xOmPDI1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona32507) presentaba una cantidad de producción secretora de anticuerpo de aproximadamente 6,8 mg/l y aproximadamente 15,8 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1/OmHSP104 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona33407) presenta una de aproximadamente 4,8 mg/l y aproximadamente 13,6 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1/OmKar2 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona40007) presentaba una de aproximadamente 9,5 mg/l y aproximadamente 18,2 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, y la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1/OmERO1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona33107) presentaba una de aproximadamente 17,7 mg/l y aproximadamente 26,2 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT. Se mejoró adicionalmente la capacidad para la producción secretora de anticuerpo que se había mejorado en aproximadamente de 2 a 5 veces potenciando la expresión de una chaperona sola, cuando se potenció la expresión de chaperonas en combinación. Cuando se potenciaron la expresión de OmPDI1 y la de OmERO1, en particular, se mejoró la capacidad de producción secretora de anticuerpo en aproximadamente 22 veces y se mejoró en aproximadamente 33 veces con la adición de inhibidores de PMT al cultivo.

Tal como se muestra en la figura 10, se confirmó por medio de análisis de inmunotransferencia de tipo Western tras electroforesis en condiciones no reductoras que la cantidad de un anticuerpo de longitud completa (H2L2) secretado, que se dedujo que se había plegado correctamente, aparentemente había aumentado.

[Ejemplo 11] Efectos de la expresión constitutiva de proteína disulfuro isomerasa (PDI) heteróloga sobre la producción secretora de anticuerpo

Se introdujo el vector de expresión para el gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) construido en el ejemplo 2 en la cepa que expresa de manera constitutiva PDI heteróloga cultivada sola en el ejemplo 5 por medio de electroporación. Como cadena pesada de anticuerpo, se usó 1 µg de onaP02706 digerido con la enzima de restricción *NotI*. Tras la electroporación, se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 µg/ml (6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,5 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de glucosa, 20 mg/l de L-triptófano y 20 g/l de agar Bacto), y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido volviera a crecer sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 µg/ml, y se examinó una cepa que secreta y produce un anticuerpo. Se seleccionó la cepa ona32207 como la cepa que expresa de manera constitutiva ScPDI1 de *Saccharomyces cerevisiae* y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona38907 como la cepa que expresa de manera constitutiva PDI humana y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, y se seleccionó la cepa ona39307 como la cepa que expresa de manera constitutiva PDI humana sintética (es decir, PDI humana con la utilización de codones optimizada según la de *O. minuta*) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma.

Tal como se muestra en la figura 11, una cepa control en la que se había introducido el gen de anticuerpo (es decir, la cepa ona02306) presentaba una cantidad de producción secretora de anticuerpo de aproximadamente 0,8 mg/l y aproximadamente 1,9 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona09806) presentaba una de aproximadamente 4,2 mg/l y 12,2 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, la cepa que expresa de manera constitutiva 2xOmPDI1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona32507) presentaba una de aproximadamente 6,8 mg/l y aproximadamente 15,8 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, la cepa que expresa de manera constitutiva ScPDI1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona32207) presentaba una de aproximadamente 3,7 mg/l y aproximadamente 11,3 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona38907) presentaba una de aproximadamente 4,0 mg/l y aproximadamente 10,4 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, y la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona39307) presentaba una de aproximadamente 9,5 mg/l y aproximadamente 20,1 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT. Cuando se potenció la expresión de un homólogo funcional, es decir, PDI heteróloga, además de la expresión constitutiva de PDI1 de *O. minuta*, se encontró también que mejoraba la capacidad de producción secretora de anticuerpo. En el caso de hPDI sintetizada teniendo en cuenta la frecuencia de uso de codones de *O. minuta*, en particular, la adición de inhibidores de PMT al cultivo dio como resultado una mejora en la capacidad para la producción secretora de anticuerpo de hasta aproximadamente 25 veces mayor que la del control y aproximadamente 1,6 veces mayor que la obtenida tras la introducción de OMPDI1 y la adición de inhibidores de PMT al cultivo.

[Ejemplo 12] Efectos de la combinación de chaperonas

Se introdujo el vector de expresión para el gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560)

construido en el ejemplo 2 en cada una de la cepa que expresa de manera constitutiva PDI humana sintética y OmERO1 y la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1, OmERO1 y OmKar2 cultivadas en el ejemplo 5 por medio de electroporación. Como cadena pesada de anticuerpo, se usó 1 µg de onaP02706 digerido con la enzima de restricción Sse8387I. Como cadena ligera de anticuerpo, se usó 1 µg de onaP03106 digerido con la enzima de restricción NotI. Tras la electroporación, se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 µg/ml (6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,5 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de glucosa, 20 mg/l de L-triptófano y 20 g/l de agar Bacto), y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido volviera a crecer sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 µg/ml, y se examinó una cepa que secreta y produce un anticuerpo. Se seleccionó la cepa ona49707 como cepa en la que se había introducido el gen de un anticuerpo que expresa de manera constitutiva PDI humana sintética/OmERO1, y se seleccionó la cepa ona48707 como la cepa en la que se había introducido el gen de un anticuerpo que expresa de manera constitutiva OmPDI1, OmERO1 y OmKar2.

Tal como se muestra en la figura 12, una cepa control en la que se había introducido el gen de anticuerpo (es decir, la cepa ona02306) presentaba una cantidad de producción secretora de anticuerpo de aproximadamente 0,65 mg/l y aproximadamente 2,2 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, la cepa que expresa de manera constitutiva PDI humana sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona39307) presentaba una de aproximadamente 5,1 mg/l y aproximadamente 12,3 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, y la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1/OmERO1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona33107) presentaba una de aproximadamente 9,2 mg/l y aproximadamente 18,9 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT. Por el contrario, la cepa que expresa de manera constitutiva PDI humana sintética/OmERO1 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona49707) presentaba una cantidad de producción secretora de anticuerpo de aproximadamente 10,8 mg/l y aproximadamente 23,4 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT, y la cepa que expresa de manera constitutiva OmPDI1/OmERO1/OmKar2 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona48707) presentaba una de aproximadamente 16,2 mg/l y aproximadamente 29,8 mg/l cuando se añadían inhibidores de PMT. Cuando se potenció la expresión de PDI heteróloga, es decir, PDI humana sintética y OmERO1, se aumentó la capacidad de producción secretora de anticuerpo en al menos el 20%, en comparación con el caso en el que se potenció la expresión de OmPDI1 y OmERO1. Es decir, la capacidad de producción secretora de anticuerpo era aproximadamente 36 veces mayor que la del control. Cuando se potenció la expresión de OmPDI1, OmERO1 y OmKar2 en combinación, se mejoró adicionalmente la capacidad de producción secretora de anticuerpo, que era aproximadamente 45,8 veces mayor que la del control.

[Ejemplo 13] Construcción de un vector de expresión para un gen de anticuerpo

Con el fin de expresar una señal secretora de Kar2 (YTL034W) derivada de *S. cerevisiae* (denominada a continuación en el presente documento "señal ScKar2") y las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo anti-receptor de TRAIL como proteína de fusión, se ligó el gen de señal ScKar2 al gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) por medio de PCR de extensión por solapamiento usando los cebadores oligonucleotídicos a continuación.

Para la cadena pesada de señal ScKar2-anticuerpo anti-receptor de TRAIL

BipXba-F: 5'-GTCTAGATGTTTTCAACAGACTAAG-3' (SEQ ID NO: 81)

BipTraH-R: 5'-GACTCCACCAGCTGTACTTCAGTTCGGTAGTTTTCTACATC-3' (SEQ ID NO: 82)

BipTraH-F: 5'-GATGTAGAAACTACGGAAGTGAAGTACAGCTGGTGGAGTC-3' (SEQ ID NO: 83)

H04: 5'-GGTCGACTCATTTACCCGGGGACAG-3' (SEQ ID NO: 84)

Para la cadena ligera de señal ScKar2-anticuerpo anti-receptor de TRAIL

BipXba-F: 5'-GTCTAGATGTTTTCAACAGACTAAG-3' (SEQ ID NO: 85)

BipTraL-R: 5'-GATTGGGTCATCTGAATGTCAGTTCGGTAGTTTTCTACATC-3' (SEQ ID NO: 86)

BipTraL-F: 5'-GATGTAGAAACTACGGAAGTGAAGTACAGCTGGTGGAGTC-3' (SEQ ID NO: 87)

L04: 5'-GGTCGACCTAACACTCTCCCCTGT-3' (SEQ ID NO: 88)

Se amplificó la región del gen de señal ScKar2 usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos usando el cebador BipXba-F y el cebador

BipTraH-R para la cadena pesada, y se repitió este ciclo 30 veces. Además, se llevó a cabo una PCR a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos usando el cebador BipXba-F y el cebador BipTraL-R y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) para la cadena ligera, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperaron fragmentos de ADN diana amplificados de aproximadamente 0,15 kb.

Se amplificó la región de gen de anticuerpo usando el ADNc de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) como molde. Se llevó a cabo una PCR a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos usando el cebador BipTraH-F y el cebador H04 para la cadena pesada. Además, se llevó a cabo una PCR a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos usando el cebador BipTraL-F y el cebador L04 para la cadena ligera y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024), y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperaron un fragmento de ADN diana amplificado de una región de cadena pesada de aproximadamente 1,35 kb y uno de una región de cadena ligera de aproximadamente 0,65 kb.

Posteriormente, se llevó a cabo una PCR a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos usando la región de señal ScKar2 para la cadena pesada y la región de cadena pesada de aproximadamente 1,35 kb como moldes, el cebador BipXba-F y el cebador H04, y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024), y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana amplificado de aproximadamente 1,5 kb. Además, se llevó a cabo una PCR a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos usando la región de señal ScKar2 para la cadena ligera y la región de cadena ligera de aproximadamente 0,65 kb como moldes y el cebador BipXba-F y el cebador L04, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana amplificado de aproximadamente 0,8 kb. Se clonaron los fragmentos de ADN recuperados en pCR2.1-TOPO. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado, se confirmó que los fragmentos diana comprendían cada uno el gen en el que se había fusionado la señal ScKar-cadena pesada de anticuerpo en marco con la señal ScKar2-cadena ligera de anticuerpo. Se usaron el sitio de enzima de restricción *XbaI* introducido en el cebador BipXba-F y el sitio de enzima de restricción *SaI* introducido en los cebadores H04 y L04 para recuperar un fragmento de ADN que codifica para la señal ScKar2-cadena pesada de anticuerpo y la señal ScKar2-cadena ligera de anticuerpo por medio de digestión con *XbaI* y *SaI*.

Con el fin de expresar la cadena pesada de anticuerpo y la cadena ligera de anticuerpo en *S. cerevisiae*, se ligó un fragmento de ADN que codifica para la señal ScKar2-cadena pesada de anticuerpo y la señal ScKar2-cadena ligera de anticuerpo recuperado por medio de digestión con *XbaI* y *SaI*, al sitio *XbaI-SaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP) introducido en el vector lanzadera de *E. coli*/levadura YEp352 (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designaron los plásmidos resultantes como plásmidos YEp352GAP-II-ScKarHc e YEp352GAP-II-ScKarLc.

Posteriormente, se recuperó un fragmento de gen que codifica para *Bam*HI-promotor de GAP-señal ScKar2-cadena ligera de anticuerpo-terminador de GAP-*Bam*HI a partir de YEp352GAP-II-ScKarLc usando los sitios de enzima de restricción *Bam*HI ubicados en ambos extremos del casete de promotor-terminador de GAP. Posteriormente, se digirió YEp352GAP-II-ScKarHc con la enzima de restricción *HpaI*. Se proporcionó extremos romos a estos fragmentos, se ligaron entre sí y se transformaron en JM109 de *E. coli*. Se seleccionaron de manera arbitraria los clones obtenidos, se sometieron a PCR de colonias (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos) usando el cebador 352-*HpaI*-R2 (5'-CAAAATGAAGCACAGATGC-3': SEQ ID NO: 89), el cebador L04 (5'-GGTCGACCTAACACTCTCCCTGT-3': SEQ ID NO: 88) y TaKaRa LA Taq™ con tampón GC (Takara Bio, RR02AG), y se repitió este ciclo 30 veces. Se seleccionaron los clones en los que se habían insertado el promotor de GAP-señal ScKar2-cadena pesada de anticuerpo-terminador de GAP y el promotor de GAP-señal ScKar2-cadena ligera de anticuerpo-terminador de GAP en una orientación inversa uno con respecto a otro. De los transformantes que se confirmó que se habían amplificado, se seleccionó un vector en el que se había introducido *Bam*HI-promotor de GAP-señal ScKar2-cadena ligera de anticuerpo-terminador de GAP-*Bam*HI en el sitio de enzima de restricción *HpaI* de extremos romos de YEp352GAP-II-ScKarHc, y se designó como YEp352GAP-II-ScKarHc/ScKarLc (figura 13).

[Ejemplo 14] Construcción de un vector de expresión para un gen de chaperonas solo

(1) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen PDI1 de *S. cerevisiae* (Sc PDI1)

Se amplificó PDI1 de Sc (YCL043C: SEQ ID NO: 120 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 121 (secuencia de aminoácidos)) usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador PDI1-sac (5'-CGAGCTCATGAAGTTTCTGCTGGTG-3': SEQ ID NO: 90), el cebador PDI1-sma (5'-GCCCCGGGTTACAATTCATCGTGAATG-3': SEQ ID NO: 91) y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 1,6 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Con el fin de expresar ScPDI1 en *S. cerevisiae*, se ligó el gen que codifica para ScPDI1 recuperado por medio de digestión con *SacI* y *SmaI* con el uso de los sitios de enzima de restricción *SacI* y *SmaI* introducidos en el cebador PDI1-sac y el cebador PDI1-sma, al sitio *SacI-SmaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3,

GAP) introducido en el vector lanzadera de *E. coli*/levadura YEp351 (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-ScPDI1.

(2) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen ScMPD1

Se amplificó ScMPD1 (YOR288C: SEQ ID NO: 122 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 123 (secuencia de aminoácidos)) usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador MPD1-sac (5'-CGAGCTCATGTTATTTCTTAATATTATTAAG-3': SEQ ID NO: 92), el cebador MPD1-sma (5'-GCCCCGGGCTACAATTCGTCGTCGTTGTTTCC-3': SEQ ID NO: 93) y ADN polimerasa Accu-Prime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 0,96 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Con el fin de expresar ScMPD1 en *S. cerevisiae*, se ligó el gen que codifica para ScMPD1 recuperado por medio de digestión con *SacI* y *SmaI* con el uso de los sitios de enzima de restricción *SacI* y *SmaI* introducidos en el cebador MPD1-sac y el cebador MPD1-sma, al sitio *SacI-SmaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP) introducido en el vector lanzadera de *E. coli*/levadura YEp351 (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-ScMPD1.

(3) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen ScSCJ1

Se amplificó ScSCJ1 (YMR214W: SEQ ID NO: 124 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 125 (secuencia de aminoácidos)) usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador SCJ1-sac (5'-CGAGCTCATGATTCCAAAATTATATATAC-3': SEQ ID NO: 94), el cebador SCJ1-sma (5'-GCCCCGGGCTACAACCTCATCTTTGAGC-3': SEQ ID NO: 95) y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 1,1 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Con el fin de expresar ScSCJ1 en *S. cerevisiae*, se ligó el gen que codifica para ScMPD1 recuperado por medio de digestión con *SacI* y *SmaI* con el uso de los sitios de enzima de restricción *SacI* y *SmaI* introducidos en el cebador SCJ1-sac y el cebador SCJ1-sma, al sitio *SacI-SmaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP) introducido en el vector lanzadera de *E. coli*/levadura YEp351 (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-ScSCJ1.

(4) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen ScERO1

Se amplificó ScERO1 (YML130C: SEQ ID NO: 126 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 127 (secuencia de aminoácidos)) usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador ERO1-sac2 (5'-CGAGCTCATGAGATTAAGAACCGCCATTG-3': SEQ ID NO: 96), el cebador ERO1-sma2 (5'-GCCCCGGGTTATTGTATATCTAGCTTATAG-3': SEQ ID NO: 97) y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 120 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 1,7 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Con el fin de expresar ScERO1 en *S. cerevisiae*, se ligó el gen que codifica para ScERO1 recuperado por medio de digestión con *SacI* y *SmaI* con el uso de los sitios de enzima de restricción *SacI* y *SmaI* introducidos en el cebador ERO1-sac2 y el cebador ERO1-sma2, al sitio *SacI-SmaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP) introducido en el vector lanzadera de *E. coli*/levadura YEp351 (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-ScERO1.

(5) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen ScFKB2

Se amplificó ScFKB2 (FPR2/YDR519W: SEQ ID NO: 128 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 129 (secuencia de aminoácidos)) usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador FKB2-sac (5'-CGAGCTCATGATGTTTAATATTACC-3': SEQ ID NO: 98), el cebador FKB2-sma (5'-GCCCCGGGCTAGGCGGCTGATTCACG-3': SEQ ID NO: 99) y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 0,5 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Con el fin de expresar ScFKB2 en *S. cerevisiae*, se ligó el gen que codifica para ScFKB2 recuperado por medio de digestión con *SacI* y *SmaI* con el uso de los sitios de enzima de restricción *SacI* y *SmaI* introducidos en el cebador FKB2-sac y el cebador FKB2-sma, al sitio *SacI-SmaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP) introducido en el vector lanzadera de *E. coli*/levadura YEp351 (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-ScFKB2.

(6) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen ScJEM1

Se amplificó ScJEM1 (YJL073W: SEQ ID NO: 130 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 131 (secuencia de aminoácidos)) usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador JEM1-sac (5'-CGAGCTCATGATACTGATCTCGGGATACTGTC-3': SEQ ID NO: 100), el cebador JEM1-sma (5'-GCCCCGGGTCAAAGCCCCAAAATTCATTTTAAAG-3': SEQ ID NO: 101) y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 120 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 1,9 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Con el fin de expresar ScJEM1 en *S. cerevisiae*, se ligó el gen que codifica para ScJEM1 recuperado por medio de digestión con *SacI* y *SmaI* con el uso de los sitios de enzima de restricción *SacI* y *SmaI* introducidos en el cebador JEM1-sac y el cebador JEM1-sma, al sitio *SacI-SmaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP) introducido en el vector lanzadera de *E. coli*/levadura YEp351 (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-ScJEM1.

(7) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen ScLHS1

Se amplificó ScLHS1 (YKL073W: SEQ ID NO: 132 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 133 (secuencia de aminoácidos)) usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador LHS1.1-sac (5'-CGAGCTCATGCGAAACGTTTAAAGGCTTT-3': SEQ ID NO: 102), el cebador LHS1-sma (5'-GCCCCGGGCTATAATTCATCATGCAAAATG-3': SEQ ID NO: 103) y ADN polimerasa Accu-Prime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 180 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 2,65 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Con el fin de expresar ScLHS1 en *S. cerevisiae*, se ligó el gen que codifica para ScLHS1 recuperado por medio de digestión con *SacI* y *SmaI* con el uso de los sitios de enzima de restricción *SacI* y *SmaI* introducidos en el cebador LHS1.1-sac y el cebador LHS1-sma, al sitio *SacI-SmaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP) introducido en el vector lanzadera de *E. coli*/levadura YEp351 (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-ScLHS1.

(8) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen ScMPD2

Se amplificó ScMPD2 (YOL088C: SEQ ID NO: 134 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 135 (secuencia de aminoácidos)) usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador MPD2-sac (5'-CGAGCTCATGAAATTGCACGGCTTTTTATTTTC-3': SEQ ID NO: 104), el cebador MPD2-sma (5'-GCCCCGGGTCAAAGCTCGTCATGACTACTGG-3': SEQ ID NO: 105) y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 0,8 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Con el fin de expresar ScMPD2 en *S. cerevisiae*, se ligó el gen que codifica para ScMPD2 recuperado por medio de digestión con *SacI* y *SmaI* con el uso de los sitios de enzima de restricción *SacI* y *SmaI* introducidos en el cebador MPD2-sac y el cebador MPD2-sma, al sitio *SacI-SmaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP) introducido en el vector lanzadera de *E. coli*/levadura YEp351 (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-ScMPD2.

(9) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen ScERJ5

Se amplificó ScERJ5 (YFR041C: SEQ ID NO: 136 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 137 (secuencia de aminoácidos)) usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador YFR041C-sac (5'-CGAGCTCATGAACGGTTACTGGAAAC-3': SEQ ID NO: 106), el cebador YFR041C-sma (5'-GCCCCGGGTCAATTTACGTGAATAGATC-3': SEQ ID NO: 107) y ADN polimerasa Accu-Prime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 0,9 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Con el fin de expresar ScERJ5 en *S. cerevisiae*, se ligó el gen que codifica para ScERJ5 recuperado por medio de digestión con *SacI* y *SmaI* con el uso de los sitios de enzima de restricción *SacI* y *SmaI* introducidos en el cebador YFR041C-sac y el cebador YFR041C-sma, al sitio *SacI-SmaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP) introducido en el vector lanzadera de *E. coli*/levadura YEp351 (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-ScERJ5.

(10) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen ScEUG1

Se amplificó ScEUG1 (YDR518W: SEQ ID NO: 138 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 139 (secuencia de aminoácidos)) usando ADN genómico de *S. cerevisiae* preparado usando el reactivo de extracción de ADN de levadura Y-DER (PIERCE) como molde. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador EUG1-sac (5'-CGAGCTCATGCAAGTGACCACAAGATT-3': SEQ ID NO: 108), el cebador EUG1-sma (5'-GCCCCGGTTATAATTCATCATGTACGG-3': SEQ ID NO: 109) y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 1,5 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Con el fin de expresar ScEUG1 en *S. cerevisiae*, se ligó el gen que codifica para ScEUG1 recuperado por medio de digestión con *SacI* y *SmaI* con el uso de los sitios de enzima de restricción *SacI* y *SmaI* introducidos en el cebador EUG1-sac y el cebador EUG1-sma, al sitio *SacI-SmaI* en el casete de promotor-terminador del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3, GAP) introducido en el vector lanzadera de *E. coli*/levadura YEp351 (Yeast 2, págs. 163-167, 1986). Se designó el plásmido resultante como YEp351GAP-II-ScEUG1.

[Ejemplo 15] Efectos de una chaperona sobre la producción secretora de anticuerpo

Se prepararon células competentes de la cepa ZUO1/YGR285C (MATa Δ his3 Δ leu2 Δ met15 Δ ura3 Δ Δ zuo1) derivada de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* usando el kit Frozen-EZ Yeast Transformation II (ZYMO RESARCH). Se sembró la cepa ZUO1/YGR285C de *S. cerevisiae* en 5 ml de medio YPAD (medio YPD que contenía adenina al 0,04% (Sigma)), y se usaron las células de levadura resultantes del cultivo durante la noche a 30°C y 310 rpm. Se introdujeron los vectores de expresión contruidos en el ejemplo 13 y en el ejemplo 14 en la cepa ZUO1/YGR285C de *S. cerevisiae* usando el kit Frozen-EZ Yeast Transformation II (ZYMO RESARCH), y se seleccionaron en cada caso transformantes crecidos sobre medio de agar ST que contenía agar al 2% (el medio de base nitrogenada de levadura y sulfato de amonio (Sigma) que contiene glucosa al 2%, adenina al 0,04% y KCl 0,3 M y que carece de uracilo y leucina) como cepa de levadura que expresa un anticuerpo que expresa de manera constitutiva una chaperona.

YEp352 GAP-II-ScKarHc/ScKarLc que porta la unidad de expresión de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo comprende un gen marcador URA3 que complementa la mutación que requiere uracilo de un huésped. Por el contrario, YEp351GAP-II (un vector de control en el que no se ha introducido el gen), YEp351GAP-II-ScPD11 (el vector de expresión de ScPD11), YEp351GAP-II-ScMPD1 (el vector de expresión de ScMPD1), YEp351GAP-II-ScSCJ1 (el vector de expresión de ScSCJ1), YEp351GAP-II-ScERO1 (el vector de expresión de ScERO1), YEp351GAP-II-ScFKB2 (el vector de expresión de ScFKB2), YEp351GAP-II-ScJEM1 (el vector de expresión de ScJEM1), YEp351GAP-II-ScLHS1 (el vector de expresión de ScLHS1), YEp351GAP-II-ScMPD2 (el vector de expresión de ScMPD2), YEp351GAP-II-ScERJ5 (el vector de expresión de ScERJ5) y YEp351GAP-II-ScEUG1 (el vector de expresión de ScEUG1) tienen cada uno un gen marcador LEU2 que complementa la mutación que requiere leucina de un huésped. Se transformaron células huésped de modo que puedan crecer sólo cuando se introducen el vector de expresión para el gen de un anticuerpo y el vector de expresión constitutiva para una chaperona, y se construyeron 10 tipos de cepas de levadura que expresan un anticuerpo que expresa de manera constitutiva una chaperona a partir de la cepa ZUO1/YGR285C de *S. cerevisiae*.

Se aplicó medio ST (500 μ l) (medio de base nitrogenada de levadura y sulfato de amonio que contiene glucosa al 2%, adenina al 0,04% y KCl 0,3 M y que carece de uracilo y leucina (Sigma)) sobre una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, 780271), se sembró el transformante con el uso de un palillo de dientes, se selló la parte superior de la placa con selladores de placa permeables al CO₂ (Greiner, 676051) y se llevó a cabo el cultivo a una velocidad de agitación de 310 rpm, una amplitud de 50 mm, a 30°C durante 3 días. Se llevó a cabo el cultivo control aplicando 1 ml de medio YPAD a una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, 780271). En el caso de cultivo que implicaba la adición de inhibidores de PMT, se aplicó 1 ml de medio YPAD al que se le había añadido inicialmente el derivado de ácido rodanin-3-acético 1c hasta una concentración final de 10 μ M a la placa. Se sembró la disolución de cultivo que se había cultivado sobre medio ST hasta una concentración final del 5% y se selló la parte superior de la placa con selladores de placa permeables al CO₂ (Greiner, 676051). Después de esto, se llevó a cabo el cultivo a una velocidad de agitación de 310 rpm, una amplitud de 50 mm, a 30°C durante 3 días. Se preparó el sobrenadante de cultivo a partir de la disolución de cultivo y se designó como muestra que contenía un anticuerpo secretado y producido por levadura. Se confirmó la producción secretora de anticuerpo por medio de ELISA tipo sándwich. Se retiraron las células de levadura del producto de cultivo por medio de centrifugación a 2.700 x g y 4°C durante 5 minutos, y se designó el sobrenadante de cultivo resultante como muestra de anticuerpo secretado. Se llevó a cabo un ELISA tipo sándwich adsorbiendo las proteínas de receptor de TRAIL que eran antígenos de los anticuerpos anti-receptor de TRAIL en una placa de 96 pocillos, añadiendo la muestra de anticuerpo secretado y realizando la detección usando un anticuerpo anti-Fc específico de IgG humana marcado con peroxidasa (anticuerpo frente a IgG humana (Fc) purificado por afinidad marcado con peroxidasa (KPL, 04-10-20)) y el sustrato ABTS peroxidasa (KPL, 50-66-01).

Tal como se muestra en la figura 14, una cepa control presentaba una cantidad de producción secretora de anticuerpo de 3,9 ng/ml. Sin embargo, cuando se suprimió la adición de una cadena de O-azúcar, la cepa control presentaba una cantidad aproximadamente 2,5 veces mayor de producción secretora de anticuerpo; es decir,

10 ng/ml, y se observaron efectos de supresión de la adición de cadena de O-azúcar. Cuando se suprimió la adición de una cadena de O-azúcar, las cepas en las que se habían introducido cada uno de ScERO1 y ScPDI1 presentaban cada una cantidades aproximadamente 7 veces y aproximadamente 20 veces mayores de producción secretora de anticuerpo; es decir, 26,4 ng/ml y 79,2 ng/ml.

[Ejemplo 16] Construcción de una cepa de coexpresión para OmPDI1 y ácido alfa-2,3-sialico transferasa humana (ST3Gall)

(1) Construcción de un vector de expresión de ST3Gall

Se amplificó un gen que codifica para una secuencia que comprende 3 repeticiones de la secuencia FLAG (3xFLAG). Se amplificó el gen por medio de PCR usando el vector de expresión P3xFLAG-CMV-13 (Sigma, E4776) como molde y el cebador 5'-3XFLAG (5'-atcatcatcatgcccgggcccgaactacaagaccat-3': SEQ ID NO: 110), el cebador 3'-3XFLAG (5'-gcaccgtctcgatccctgtcatcgtcatcctt-3': SEQ ID NO: 111) a los que se habían añadido el sitio *SrfI* y el sitio *Bam*HI, respectivamente. Se insertó el fragmento resultante en el vector de expresión de *O. minuta*, pOMEA1-His6, (Akeboshi *et al.*, 2007, Appl. Environ. Microbiol., 73:4805-4812) escindido con *SrfI* y *Bam*HI usando el kit de clonación por PCR In-Fusion Dry-Down (Takara Bio, Z9602N). Se designó el vector resultante como pOMEA1-6H3F.

Posteriormente, se amplificó un gen que codifica para un sitio catalizador de ST3Gall. El gen de ST3Gall está presente en el cromosoma 8 humano y su secuencia de nucleótidos de ADNc está registrada en una base de datos pública, GenBank, con el n.º de registro L29555. Se amplificó en primer lugar el dominio catalizador del gen de ST3Gall por medio de PCR usando el cebador 3FLAG-ST3Gall-F (5'-GATGACGATGACAAGGGATCCaactactcccacacatgg-3': SEQ ID NO: 112) y el cebador 3FLAG-ST3Gall-R (5'-GCACCGTCTCGGATCCtctctcccctgaagatccggat-3': SEQ ID NO: 113). Se usó un clon de entrada de la biblioteca de glicosiltransferasa humana preparada en el proyecto NEDO SG como molde (Shimma *et al.*, 2006, Appl. Environ. Microbiol., 72, 7003-7012). Se insertó el fragmento obtenido en el sitio *Bam*HI de pOMEA1-6H3F usando el kit de clonación por PCR In-Fusion Dry-Down (Takara Bio, Z9602N). Tras confirmar la secuencia de nucleótidos, se designó el fragmento como el vector de expresión, pOMEA1-6H3F-ST3Gall1.

(2) Construcción de la cepa de expresión de ST3Gall

Se escindió el plásmido pOMEA1-6H3F-ST3Gall1 con la enzima de restricción *NotI* y entonces se transformó la cepa TK10-1-2 de *O. minuta*. Se llevó a cabo la transformación mediante el método de acetato de litio. Tras la transformación, se aplicó el resultado sobre medio SD-Ade (glucosa al 2%, base nitrogenada de levadura sin aminoácidos al 0,17% (Difco), bases de ácido nucleico excepto adenina y una mezcla de aminoácidos (de 20 a 400 mg/l)), y se llevó a cabo el cultivo a 30°C durante 2 días. Se confirmó si el vector de expresión se había incorporado a un cromosoma o no por medio de la PCR de colonias descrita en el ejemplo 5 y se designó el transformante como la cepa YT-1.

Posteriormente, se introdujo el vector de expresión de PDI1 derivada de *O. minuta* (onaP03606) construido en el ejemplo 3. Además, se llevó a cabo la transformación usando pOMexGP1U que no contenía OmPDI1 como control. Tras transformar la cepa YT-1 de la manera descrita anteriormente, se aplicó el transformante sobre un medio SD-Ura (glucosa al 2%, base nitrogenada de levadura sin aminoácidos al 0,17% (Difco), bases de ácido nucleico excepto uracilo y mezcla de aminoácidos (de 20 a 400 mg/l)), y se llevó a cabo el cultivo a 30°C durante 2 días. Se confirmó si el vector de expresión se había incorporado a un cromosoma o no por medio de la PCR de colonias descrita en el ejemplo 5, se designó la cepa en la que se había introducido pOMexGP1U (plásmido control) como la cepa YT-2 y se designó la cepa en la que se había introducido onaP03606 como la cepa YT-3.

[Ejemplo 17] Expresión de ácido alfa-2,3-sialico transferasa humana (ST3Gall)

Se inocularon la cepa YT-2 y la cepa YT-3 en 5 ml de medio YPAD+KCl (polipeptona al 2%, extracto de levadura al 1%, glucosa al 2%, adenina (40 mg/l), cloruro de potasio 0,3 M), y se llevó a cabo un precultivo a 30°C durante la noche. Posteriormente, se inoculó 1 ml de una disolución de precultivo en 150 ml de medio YPAD+KCl, y se llevó a cabo el cultivo a 30°C durante 48 horas. Se recuperaron las cepas, se resuspendieron en 100 ml de medio BMMY+casaminoácidos al 2% (extracto de levadura al 1%, polipeptona al 2%, base nitrogenada de levadura sin aminoácidos al 1,34% (Difco), KPi 0,1 M (pH 6,0), casaminoácidos al 2%, metanol al 1%), y se cultivaron a 20°C durante 96 horas. Se añadió metanol hasta una concentración del 0,5% cada 12 horas. Tras completarse el cultivo, se sometió el producto de cultivo a centrifugación para retirar las células de levadura y se designó la disolución resultante como disolución enzimática bruta.

Se sometió a ensayo la actividad enzimática de la siguiente manera. Se añadió una disolución enzimática bruta (2 µl) a 18 µl de una disolución de reacción (Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5), MnCl₂ 1 mM, CMP-NeuAc 5 mM, core1-pNP 50 µM) y se inició la reacción. Tras llevar a cabo la reacción a 37°C durante 30 minutos, se terminó la reacción por medio de ebullición y se llevó a cabo un análisis de HPLC. Se usó una columna Cosmosil 5C18-ARII (4,6 x 250 mm, Nacalai Tesque, Inc.) y se usó una mezcla de ácido trietilaminoacético 0,2 M (pH 7,0, disolución A) y acetonitrilo (disolución B) (disolución A:disolución B = 9:1) como fase móvil. Se equilibró la columna, se inyectó la muestra en la

misma y se llevó a cabo una elución 20 minutos después. Se llevó a cabo la detección usando un detector UV (longitud de onda de detección: 300 nm). Eluyó un sustrato core1-pNP 14,5 minutos más tarde y eluyó un producto de reacción, sialycore1-pNP, 17 minutos más tarde. Se cuantificó el producto de reacción basándose en el área de pico y se designó el resultado como actividad (U). Se definió la unidad "1 U" como la cantidad de una enzima que es necesaria para producir 1 μ mol del producto de reacción por minuto. La figura 15 muestra cambios en los niveles de expresión de la enzima con el transcurso del tiempo durante el cultivo. Como resultado, se observó una actividad enzimática aumentada en la cepa que expresa ST3Gall (YT-3) en la que se había introducido OmPDI1, en comparación con la cepa en la que no se había introducido OmPDI1 (YT-2), y la diferencia en los niveles de expresión llegó a ser de hasta aproximadamente 3,4 veces 96 horas más tarde.

Entonces se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se sometieron los sobrenadantes de cultivo en cantidades equivalentes a "10 μ U" de la cepa YT-2 y la cepa YT-3 a tratamiento con EndoHf (NEB, P0703S) según el protocolo, se aplicaron y entonces se sometieron a SDS-PAGE. Tras la electroforesis, se transfirió el producto a una membrana de PVDF y se llevó a cabo una inmunotransferencia de tipo Western según una técnica convencional. Se usó un anticuerpo de ratón anti-FLAG M2 (Sigma, F1804) como anticuerpo primario y un material compuesto de anticuerpo anti-IgG de ratón-fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario. Se llevó a cabo la detección usando CDP-Star y un analizador de imágenes, LAS1000 (Fujifilm Corporation). Además, se cuantificaron las señales usando Image Gauge (Fujifilm Corporation).

Se muestran los resultados en la figura 16 y en la tabla 1. Aunque además del ensayo de actividad enzimática se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia de tipo Western, se encontró que la intensidad de la señal de ST3Gall derivada de la cepa en la que se había introducido OmPDI1 (YT-3) estaba atenuada hasta tan sólo 0,6 veces. Por tanto, se consideró que la introducción de OmPDI1 dio como resultado la promoción de la formación de enlaces disulfuro normales en moléculas de ST3Gall, y aumentó el número de proteínas plegadas correctamente, lo que a su vez elevó la actividad específica en aproximadamente 1,6 veces.

Tabla 1

Cepa que expresa chaperona	Intensidad de señal (UA)	Actividad específica (pU/UA)
YT-2	4694842	2,13
YT-3	2976349	3,36

[Ejemplo 18] Construcción de una cepa de coexpresión para un vector de expresión para una combinación de genes de chaperonas y un vector de expresión para ácido alfa-2,3-sialico transferasa humana (ST3Gall)

Se introdujo el vector de expresión para diversas combinaciones de genes de chaperonas derivado de *O. minuta* preparado en el ejemplo 4 en la cepa YT-1 del ejemplo 17. De la misma manera que en el ejemplo 16, se escindieron plásmidos con *NotI* para transformar la cepa YT-1. Tras la transformación, se aplicó el fragmento resultante sobre un medio SD-Ura (glucosa al 2%, base nitrogenada de levadura sin aminoácidos al 0,17% (Difco), bases de ácido nucleico excepto uracilo y mezcla de aminoácidos (de 20 a 400 mg/l)) y se llevó a cabo el cultivo a 30°C durante 2 días. Se confirmó si el vector de expresión se había incorporado o no a un cromosoma por medio de la PCR de colonias descrita en el ejemplo 5, se designó una cepa expresada que tenía un vector de coexpresión (onaP09407) que portaba dos copias del casete de expresión de OmPDI1 como la cepa YT-4, se designó una cepa expresada que tenía un vector de coexpresión (onaP09707) para OmPDI1 y OmKar2 como la cepa YT-5, se designó una cepa expresada que tenía un vector de coexpresión (onaP09507) para OmPDI1 y OmERO1 como la cepa YT-6, y se designó una cepa expresada que tenía un vector de coexpresión (onaP09607) para OmPDI1 y OmHSP104 como la cepa YT-7. Se llevó a cabo el cultivo de la misma manera que en el ejemplo 17, se sometió a ensayo la expresión de enzima de cada cepa con el transcurso del tiempo y se muestran los resultados en la figura 17. Además, se sometieron 30 μ l del sobrenadante de cultivo a tratamiento con EndoHf (NEB, P0703S) según el protocolo y entonces análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se muestran los resultados en la figura 18, y se muestran las intensidades de señal cuantificadas y las actividades específicas determinadas basándose en las mismas en la tabla 2.

Tabla 2

Cepa que expresa chaperona	Intensidad de señal (UA)	Actividad (mU/ml)	Actividad específica (pU/UA)
YT-4-1	5003576,86	2,32	13,9
YT-4-2	5967631,86	4,50	23,7
YT-4-3	6004529,86	4,47	22,3
YT-4-4	5686573,24	5,08	26,8
YT-5-1	3619105,78	1,29	10,7
YT-5-2	3926906,78	2,07	15,8
YT-5-3	4530942,78	1,86	12,3
YT-5-4	4603909,78	2,29	14,9
YT-6-1	2225292,78	0,70	9,4
YT-6-2	4312501,78	3,10	21,6
YT-6-3	4786891,78	5,03	31,5
YT-6-4	4057802,78	6,81	50,3
YT-7-1	3381700,78	1,28	11,4
YT-7-2	3208548,78	2,98	27,9
YT-7-3	2435370,00	3,45	42,5
YT-7-4	1912043,00	3,65	57,3

Los niveles de expresión de enzima dejaron sustancialmente de aumentar 2 días tras la inducción en las cepas YT-4, -5 y -7; sin embargo, la actividad siguió creciendo a niveles significativos hasta 4 días tras la inducción en la cepa YT-6 y actividad por ml del sobrenadante de cultivo de la cepa YT-6 fue máxima al final. Aunque no se observó ningún aumento claro en la actividad específica en las cepas de expresión YT-4 y YT-5, se observó un aumento en la actividad específica con el transcurso del tiempo en las cepas YT-6 y YT-7. Por tanto, se consideró que la coexpresión de ERO1 o HSP104 daría como resultado un aumento en el número de moléculas de enzima que se plegaban correctamente.

[Ejemplo 19] Construcción de un vector de expresión para un gen de chaperonas solo

(1) Construcción de un vector de expresión constitutiva el gen de GRP78/BiP de hámster chino

Se clonó el gen de GRP78 de hámster chino (n.º de registro M17169: SEQ ID NO: 152) de la siguiente manera para construir un vector de expresión.

Al principio, se extrajo ARN total de la célula de la cepa CHO/dhFr (ATCC CRL-9096) obtenida por medio de cultivo en medio Ex325 con el uso del kit de extracción de ARN total QuickPrep (GE Healthcare Life Sciences, 27-9271-01). Se usó ARN total purificado (600 ng) para sintetizar ADNc por medio de transcripción inversa usando ReverTra Ace- α - (TOYOBO, FSK-101). Se llevó a cabo una PCR usando el ADNc resultante como molde, el cebador CHOGRP78-F (5'-ACCCTCGAGATGAAGTTCCTATGGTGG-3': SEQ ID NO: 114), el cebador CHOGRP78-R (5'-ACCGCGGCCGCTACAACATCATC-3': SEQ ID NO: 115) y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 120 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 2 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Se ligó el gen de CHO GRP78 por medio de digestión con *Xho*I y *Not*I, al sitio *Xho*I-*Not*I en pME18s (n.º de registro AB009864) con el uso de los sitios de enzima de restricción *Xho*I y *Not*I introducidos en el cebador CHOGRP78-F y el cebador CHOGRP78-R. Se designó el plásmido resultante como pME18s/choGRP78.

(2) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen de PDI de hámster chino

Se clonó el gen de PDI de hámster chino (n.º de registro AF364317: SEQ ID NO: 153) de la siguiente manera para construir un vector de expresión.

Se llevó a cabo una PCR usando el ADNc resultante como molde como en el caso de (1) anterior, el cebador CHOPDI-F (5'-ACCCTCGAGATGCTGAGCCGTTCTC-3': SEQ ID NO: 116), el cebador CHOPDI-R (5'-ACCGCGGCCGCTACAATTCGTCCTTTAC-3': SEQ ID NO: 117) y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 1,5 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Se ligó el gen de CHO PDI recuperado por medio de digestión con *Xho*I y *Not*I, al sitio *Xho*I-*Not*I en pME18s (n.º de registro AB009864) con el uso de los sitios de enzima de restricción *Xho*I y *Not*I introducidos en el cebador CHOPDI-F y el cebador CHOPDI-R. Se designó el plásmido resultante como pME18s/choPDI.

(3) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen de ERO1-L β humana

Se clonó el gen de ERO1-L β humana (n.º de registro NM_019891: SEQ ID NO: 146) de la siguiente manera para construir un vector de expresión.

Al principio, se extrajo ARN total de la célula FreeStyle 293-F (Invitrogen, R790-07) obtenida por medio de cultivo en medio Freestyle 293 (Invitrogen, 12338-018) con el uso del kit de extracción de ARN total QuickPrep (GE Healthcare Life Sciences, 27-9271-01). Se usó ARN total purificado (600 ng) para sintetizar ADNc por medio de transcripción inversa usando ReverTra Ace- α - (TOYOBO, FSK-101). Se llevó a cabo una PCR usando el ADNc resultante como molde, el cebador hERO-F (5'-ACCCTCGAGATGAGCCAAGGG-3': SEQ ID NO: 118), el cebador hERO-R (5'-ACCCTCGAGTTACCTACTGTGTTGTAATAAGAC-3': SEQ ID NO: 119) y ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen, 12344-024) a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos, y se repitió este ciclo 30 veces. Se recuperó un fragmento de ADN diana de aproximadamente 1,4 kb y se clonó en pCR2.1-TOPO. Después de esto, se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Se ligó el gen de ERO1-L β humana recuperado por medio de digestión con *Xho*I, al sitio *Xho*I de pME18s (n.º de registro AB009864) con el uso del sitio de enzima de restricción *Xho*I introducido en el cebador hERO-F y el cebador hERO-R. Se designó el plásmido resultante como pME18s/hERO1-L β .

(4) Construcción de un vector de expresión de anticuerpo

Se introdujeron la cadena ligera y la cadena pesada del gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) en el vector de expresión pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, V790-20) y se designó el fragmento resultante como pcDNA3.1 (+)/expAB.

[Ejemplo 20] Efectos de una chaperona sobre la producción secretora de anticuerpo

Se introdujeron los vectores de expresión constitutiva para diversos genes de chaperonas construidos en el ejemplo 19 (1) a (3) en las células COS-1 para examinar los efectos de la introducción de una chaperona sobre la producción secretora de anticuerpo.

Se sembraron las células COS-1 en una microplaca de 24 pocillos (IWAK1 SI-Tech, 3820-024N) a $1,5 \times 10^5$ células/pocillo y se cotransfectaron el vector que expresa el anticuerpo anti-receptor de TRAIL, pcDNA3.1 (+)/expAB, y los vectores de expresión constitutiva para diversos genes de chaperonas, con el uso de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668-027) 24 horas tras el inicio del cultivo. Tras introducir el gen, se llevó a cabo el cultivo durante 48 horas, se clarificó el sobrenadante de cultivo por medio de centrifugación a $21.600 \times g$ a 4°C durante 3 minutos, y se designó el sobrenadante resultante como muestra de anticuerpo de secreción.

Se sometieron los anticuerpos secretados y producidos a ensayo cuantitativo por medio de ELISA tipo sándwich. Se adsorbió la proteína receptora de TRAIL (es decir, el antígeno del anticuerpo anti-receptor de TRAIL) en una placa de 96 pocillos, se añadió la muestra de anticuerpo secretado y se llevó a cabo la detección usando un anticuerpo anti-Fc específico de IgG humana marcado con peroxidasa (anticuerpo frente a IgG humana (Fc) purificado por afinidad marcado con peroxidasa (KPL, 04-10-20)) y el sustrato ABTS peroxidasa (KPL, 50-66-01). Tal como se muestra en la figura 19, se observó una mejora en la cantidad de producción de aproximadamente el 19% y aproximadamente el 13% en la cepa en la que se había introducido CHO BiP y la cepa en la que se había introducido CHO PDI, en comparación con la cepa control (es decir, una cepa en la que sólo se había introducido el gen de anticuerpo). Cuando se introdujeron genes de chaperonas en combinación, además, se encontró que la cantidad de producción secretora aumentaba aproximadamente el 30% en la cepa en la que se habían introducido CHO BiP+ERO1-L β humana y CHO PDI+ERO1-L β humana, en comparación con la cepa control (es decir, una cepa en la que sólo se había introducido el gen de anticuerpo).

[Ejemplo 21] Construcción de un vector de expresión para un gen de chaperonas solo

(1) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen de ERO1-L α humana

ERO1-L α humana (hERO1-L α , n.º de registro Q96HE7) es un homólogo funcional de OmERO1 y comprende una secuencia de aminoácidos compuesta por 468 residuos de aminoácido (SEQ ID NO: 144) codificada por una secuencia de nucleótidos de 1.407 pb (SEQ ID NO: 143). Se sintetizó el gen de hERO1-L α teniendo en cuenta la preferencia de codones de *O. minuta* (Operon Biotechnologies). A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 145) que contenía hERO1-L α sintética por medio de digestión con *Sal*I y *Eco*T221 con el uso del sitio de enzima de restricción *Sal*I y el sitio de enzima de restricción *Eco*T221 que se habían introducido en el momento de la síntesis. Con el fin de expresar de manera constitutiva hERO1-L α sintética en *O. minuta*, se ligó hERO1-L α a pOMexGP1U recuperado por medio de digestión con *Sal*I y *Eco*T221 dado a conocer en el documento WO 2003/091431. Se designó el plásmido resultante como onaP17608.

(2) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen de ERO1-L β humana

ERO1-L β humana (hERO1-L β , n.º de registro NP_063944) es un homólogo funcional de OmERO1 y comprende una secuencia de aminoácidos compuesta por 467 residuos de aminoácido (SEQ ID NO: 147) codificada por una secuencia de nucleótidos de 1.404 pb (SEQ ID NO: 146). Se sintetizó el gen de hERO1-L β teniendo en cuenta la preferencia de codones de *O. minuta* (Operon Biotechnologies). A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 148) que contenía hERO1-L α sintética por medio de digestión con *Sall* y *EcoT22I* con el uso del sitio de enzima de restricción *Sall* y el sitio de enzima de restricción *EcoT22I* que se habían introducido en el momento de la síntesis. Con el fin de expresar de manera constitutiva hERO1-L β sintética en *O. minuta*, se ligó hERO1-L β sintética a pOMexGP1U recuperado por medio de digestión con *Sall* y *EcoT22I* dado a conocer en el documento WO 2003/091431. Se designó el plásmido resultante como onaP17808.

(3) Construcción de un vector de expresión constitutiva para el gen de GRP78 humana

GRP78 humana (hGRP78, n.º de registro NP_005338) es un homólogo funcional de OmKar2 y comprende una secuencia de aminoácidos compuesta por 654 residuos de aminoácido (SEQ ID NO: 150) codificada por una secuencia de nucleótidos de 1.965 pb (SEQ ID NO: 149). Se sintetizó el gen de hGRP78 teniendo en cuenta la preferencia de codones de *O. minuta* (Operon Biotechnologies). A partir de un plásmido que portaba el fragmento de ADN con una secuencia de nucleótidos confirmada, se recuperó un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 151) que contenía hGRP78 sintética por medio de digestión con *Sall* y *EcoT22I* con el uso del sitio de enzima de restricción *Sall* y el sitio de enzima de restricción *EcoT22I* que se habían introducido en el momento de la síntesis. Con el fin de expresar de manera constitutiva hGRP78 sintética en *O. minuta*, se ligó hGRP78 sintética a pOMexGP1U recuperado por medio de digestión con *Sall* y *EcoT22I* dado a conocer en el documento WO 2003/091431. Se designó el plásmido resultante como onaP17408.

[Ejemplo 22] Construcción de un vector de expresión para una combinación de genes de chaperonas

(1) Construcción de un vector de coexpresión y expresión constitutiva para el gen de hPDI sintética y el gen de hERO1-L α sintética

Se recuperó la región de hERO1-L α sintética a partir del vector de expresión constitutiva para hERO1-L α sintética, onaP17608, con el uso de las enzimas de restricción *Sall* y *EcoT22I*. Tras digerir el vector pZ/GpGt construido en el ejemplo 4 con las enzimas de restricción *Sall* y *EcoT22I*, se introdujo el fragmento de *Sall-EcoT22I* que contenía hERO1-L α sintética para construir pZ/GpGt/hERO1-L α sintética. Posteriormente, se digirió pZ/GpGt/hERO1-L α sintética con la enzima de restricción *Apal* y se recuperó un fragmento que contenía el promotor de GAP-hERO1-L α sintética-terminador de GAP (el casete de expresión de hERO1-L α sintética). Se introdujo el casete de expresión de hERO1-L α sintética recuperado en la enzima de restricción *Apal* del vector de expresión de hPDI sintética (onaP09107), se confirmó la dirección de inserción por medio de PCR y se seleccionó un vector en el que se había introducido el casete de expresión de hPDI sintética y el casete de expresión de hERO1-L α sintética en una orientación inversa uno con respecto a otro alrededor del marcador URA3 del vector de expresión de hPDI sintética (onaP09107). Se designó el vector de coexpresión resultante para hPDI sintética y hERO1-L α sintética como onaP18208.

(2) Construcción de un vector de coexpresión y expresión constitutiva para el gen de hPDI sintética y el gen de hERO1-L β sintética

Se recuperó la región de hERO1-L β sintética a partir del vector de expresión constitutiva para hERO1-L β sintética, onaP17608, con el uso de las enzimas de restricción *Sall* y *EcoT22I*. Tras digerir el vector pZ/GpGt construido en el ejemplo 4 con las enzimas de restricción *Sall* y *EcoT22I*, se introdujo el fragmento de *Sall-EcoT22I* que contenía hERO1-L β sintética para construir pZ/GpGt/hERO1-L β sintética. Posteriormente, se digirió pZ/GpGt/hERO1-L β sintética con la enzima de restricción *Apal* y se recuperó un fragmento que contenía el promotor de GAP-hERO1-L β sintética-terminador de GAP (el casete de expresión de hERO1-L β sintética). Se introdujo el casete de expresión de hERO1-L β sintética recuperado en la enzima de restricción *Apal* del vector de expresión de hPDI sintética (onaP09107), se confirmó la dirección de inserción por medio de PCR y se seleccionó un vector en el que se habían insertado el casete de expresión de hPDI sintética y el casete de expresión de hERO1-L β sintética en una orientación inversa uno con respecto a otro alrededor del marcador URA3 del vector de expresión de hPDI sintética (onaP09107). Se designó el vector de coexpresión resultante para hPDI1 sintética y hERO1-L β sintética como onaP18308.

(3) Construcción de un vector de coexpresión y expresión constitutiva para el gen de hPDI sintética y el gen de hGRP78 sintética

Se recuperó la región de hGRP78 sintética a partir del vector de expresión constitutiva para hGRP78 sintética, onaP17408, con el uso de las enzimas de restricción *Sall* y *EcoT22I*. Tras digerirse el vector pZ/GpGt construido en el ejemplo 4 con las enzimas de restricción *Sall* y *EcoT22I*, se introdujo el fragmento de *Sall-EcoT22I* que contenía

hGRP78 sintética para construir pZ/GpGt/hGRP78 sintética. Posteriormente, se digirió pZ/GpGt/hGRP78 sintética con la enzima de restricción *Apal* y se recuperó un fragmento que contenía el promotor de GAP-hGRP78 sintética-terminador de GAP (el casete de expresión de hGRP78 sintética). Se introdujo el casete de expresión de hGRP78 sintética recuperado en la enzima de restricción *Apal* del vector de expresión de hPDI sintética (onaP09107), se confirmó la dirección de inserción por medio de PCR y se seleccionó un vector en el que se habían insertado el casete de expresión de hPDI sintética y el casete de expresión de hGRP78 sintética en una orientación inversa uno con respecto a otro alrededor del marcador URA3 del vector de expresión de hPDI sintética (onaP09107). Se designó el vector de coexpresión resultante para hPDI1 sintética y hGRP78 sintética como onaP18108.

(4) Construcción de un vector de coexpresión y expresión constitutiva para el gen de hPDI sintética, el gen de hERO1-L α sintética y el gen de hGRP78 sintética

Se construyó un vector de coexpresión para hPDI sintética y hERO1-L α sintética por medio de la regulación de la expresión mediante el promotor de GAP y para hGRP78 sintética por medio de la regulación de la expresión mediante el promotor de PGK de la siguiente manera.

Se recuperó la región de terminador de PGK a partir del plásmido pOU1/Kar2-PptK construido en el ejemplo 4 con el uso de las enzimas de restricción *EcoT22I* y *KpnI*. Además, se recuperó la región de hGRP78 sintética a partir del plásmido onaP17408 con el uso de las enzimas de restricción *SalI* y *EcoT22I*. Se ligaron tres fragmentos, es decir, el plásmido pUC119 (Takara Bio, TKR-3319) preparado con la ayuda de las enzimas de restricción *SalI* y *KpnI*, la región de terminador de PGK recuperada por medio de digestión con las enzimas de restricción *EcoT22I* y *KpnI*, y la región de hGRP78 sintética recuperada por medio de digestión con las enzimas de restricción *SalI* y *EcoT22I*, entre sí para construir pUC119/hGRP78 sintética+PGKt. Posteriormente, se sometieron la región de promotor de PGK recuperada de pOU1/Kar2-PptK con la ayuda de las enzimas de restricción *KpnI* y *SalI*, la hGRP78 sintética recuperada de pUC119/hGRP78 sintética+PGKt con la ayuda de las enzimas de restricción *SalI* y *KpnI*, y el plásmido pUC119 (Takara Bio, TKR-3319) preparado por medio de digestión de la región de terminador de PGK con la enzima de restricción *KpnI*, a ligamiento de 3 fragmentos. Por tanto, se obtuvo pUC119/PGKp + hGRP78 sintética + PGKt. Posteriormente, se digirió pUC119/PGKp + hGRP78 sintética + PGKt con la enzima de restricción *KpnI*, se recuperó un fragmento que contenía el promotor de PGK-hGRP78 sintética-terminador de PGK (el casete de expresión de hGRP78 sintética) y se introdujo el fragmento resultante en el sitio de enzima de restricción *KpnI* del vector de coexpresión (onaP18208) para hPDI sintética y hERO1-L α sintética para construir un vector de coexpresión (onaP18508) para hPDI sintética, hERO1-L α sintética y hGRP78 sintética.

(5) Construcción de un vector de coexpresión y expresión constitutiva para el gen de hPDI sintética, el gen de hERO1-L β sintética y el gen de hGRP78 sintética

Se construyó un vector de coexpresión para hPDI sintética y hERO1-L β sintética por medio de la regulación de la expresión mediante el promotor de GAP y para hGRP78 sintética por medio de la regulación de la expresión mediante el promotor de PGK de la siguiente manera.

Se digirió el pUC119/PGKp + hGRP78 sintética + PGKt construido en (4) anterior con la enzima de restricción *KpnI*, se recuperó un fragmento que contenía el promotor de PGK-hGRP78 sintética-terminador de PGK (el casete de expresión de hGRP78 sintética) y se introdujo el fragmento en el sitio de enzima de restricción *KpnI* del vector de coexpresión (onaP18308) para hPDI sintética y hERO1-L β sintética para construir el vector de coexpresión (onaP18608) para hPDI sintética, hERO1-L β sintética y hGRP78 sintética.

(6) Construcción de un vector de coexpresión y expresión constitutiva para el gen de hPDI sintética, el gen OmERO1 y el gen de hGRP78 sintética

Se construyó un vector de coexpresión para hPDI sintética y OmERO1 por medio de la regulación de la expresión mediante el promotor de GAP y para hGRP78 sintética por medio de la regulación de la expresión mediante el promotor de PGK de la siguiente manera.

Se digirió el pUC119/PGKp + hGRP78 sintética + PGKt construido en (4) anterior con la enzima de restricción *KpnI*, se recuperó un fragmento que contenía el promotor de PGK-hGRP78 sintética-terminador de PGK (el casete de expresión de hGRP78 sintética) y se introdujo el fragmento en el sitio de enzima de restricción *KpnI* del vector de coexpresión (onaP11107) para hPDI sintética y OmERO1 para construir el vector de coexpresión (onaP18708) para hPDI sintética, OmERO1 y hGRP78 sintética.

[Ejemplo 23] Preparación de una cepa de levadura con introducción de chaperonas (*O. minuta*)

Se digirieron todos los vectores de expresión constitutiva para genes de chaperonas construidos en el ejemplo 21 y en el ejemplo 22 con la enzima de restricción *NotI* y entonces se introdujeron en la cepa YK5 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1: cepa deficiente en el gen YPS1 de proteasa de *Ogataea minuta*) por medio de electroporación. Se llevó a cabo la electroporación en las condiciones descritas en el documento WO 2003/091431.

- Tras la electroporación, se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U que se había esterilizado por medio de inyección de vapor a presión (6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,5 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de glucosa, 20 mg/l de L-triptófano, 20 mg/l de adenina y 20 g/l de agar Bacto), y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido volviera a crecer sobre medio de agar Casamino-U y se seleccionó un transformante en el que se había introducido una chaperona, regulándose se expresión mediante el promotor de GAP, por medio de PCR de colonias. Se suspendió parte de la levadura que había crecido sobre medio de agar Casamino-U en 10 µl de disolución de SDS al 0,25%, se añadieron 90 µl de agua esterilizada y entonces se retiraron las células de levadura por medio de centrifugación a 2.700 x g y 4°C durante 5 minutos. Se designó el sobrenadante obtenido como disolución de ADN.
- Se designó una cepa en la que se observaba amplificación con el uso del cebador GAPpforS-F diseñado dentro de la secuencia de promotor de GAP (5'-GATCTCAGGCCGAGTCAAGAC-3': SEQ ID NO: 76) y el cebador mostrado a continuación como cepa en la que se había introducido un vector de expresión constitutiva para chaperona. Dado que se expresó hGRP78 sintética con el uso del promotor de PGK cuando se construyó un vector de coexpresión para tres genes de chaperonas, se confirmó la introducción del casete de expresión de promotor de PGK-hGRP78 sintética-terminador de PGK con el uso del cebador PGKpforS-F que se diseñó dentro de la secuencia de promotor de PGK (5'-TAACGCCGCATAGAACTAGC-3': SEQ ID NO: 77) y el cebador G78-EcoT-R (5'-ATGGATTTACAACCTGGTCC-3': SEQ ID NO: 154).
- (p10) Cebador usado para confirmar la introducción de hPDI sintética
- ShPDI-ttaR: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCCTTAAC-3' (SEQ ID NO: 78)
- (p16) Cebador usado para confirmar la introducción de hERO1-L α sintética
- E1La-EcoT-R: 5'-ATGCATTTAGTGGATGTTTTG-3' (SEQ ID NO: 155)
- (p17) Cebador usado para confirmar la introducción de hERO1-L β sintética
- E1Lb-EcoT-R: 5'-ATGCATTTATCTGGAGTGTTG-3' (SEQ ID NO: 156)
- (p18) Cebadores usados para confirmar la introducción de hPDI sintética + hERO1-L α sintética
- ShPDI-ttaR: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCCTTAAC-3' (SEQ ID NO: 78) y
- E1La-EcoT-R: 5'-ATGCATTTAGTGGATGTTTTG-3' (SEQ ID NO: 155)
- (p19) Cebadores usados para confirmar la introducción de hPDI sintética y hERO1-L β sintética
- ShPDI-ttaR: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCCTTAAC-3' (SEQ ID NO: 78) y
- E1Lb-EcoT-R: 5'-ATGCATTTATCTGGAGTGTTG-3' (SEQ ID NO: 156)
- (p20) Cebadores usados para confirmar la introducción de hPDI sintética + hGRP78 sintética
- ShPDI-ttaR: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCCTTAAC-3' (SEQ ID NO: 78) y
- G78-EcoT-R: 5'-ATGCATTTACAACCTCGTCC-3' (SEQ ID NO: 154)
- (p21) Cebadores usados para confirmar la introducción de hPDI sintética, hERO1-L α sintética y hGRP78 sintética
- ShPDI-ttaR: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCCTTAAC-3' (SEQ ID NO: 78),
- E1La-EcoT-R: 5'-ATGCATTTAGTGGATGTTTTG-3' (SEQ ID NO: 155) y
- G78-EcoT-R: 5'-ATGCATTTACAACCTCGTCC-3' (SEQ ID NO: 154)
- (p22) Cebadores usados para confirmar la introducción de hPDI sintética, hERO1-L β sintética y hGRP78 sintética
- ShPDI-ttaR: 5'-GATGCATTTACAACCTGGTCCTTAAC-3' (SEQ ID NO: 78),
- E1Lb-EcoTR: 5'-ATGGATTTATCTGGAGTGTTG-3' (SEQ ID NO: 156) y
- G78-EcoT-R: 5'-ATGCATTTACAACCTCGTCC-3' (SEQ ID NO: 154)
- (p23) Cebadores usados para confirmar la introducción de hPDI sintética, OmERO1 y hGRP78 sintética

ShPDI-ttaR: 5'-GATGCATTTACAACCTCGTCCTTAAC-3' (SEQ ID NO: 78),

OMEROT22I: 5'-GATGCATTTATAGCTCCAAACGATACAG-3' (SEQ ID NO: 45) y

G78-EcoT-R: 5'-ATGCATTTACAACCTCGTCC-3' (SEQ ID NO: 154)

Se llevó a cabo una PCR usando TaKaRa LA Taq™ con tampón GC (Takara Bio, RR02AG) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante de 60 a 180 segundos para amplificar el fragmento diana, y se repitió este ciclo 30 veces. Se designó cada uno de los transformantes a continuación en los que se observaba amplificación como cepa de expresión constitutiva para chaperona.

(E17) Cepa de expresión constitutiva para hERO1-L α sintética; la cepa ona56407

(E18) Cepa de expresión constitutiva para hERO1-L β sintética; la cepa ona56907

(E19) Cepa de expresión constitutiva para hGRP78 sintética; la cepa ona57007

(E20) Cepa de expresión constitutiva para hPDI sintética y hERO1-L α sintética; la cepa ona65708

(E21) Cepa de expresión constitutiva para hPDI sintética y hERO1-L β sintética; la cepa ona66008

(E22) Cepa de expresión constitutiva para hPDI sintética y hGRP78 sintética; la cepa ona66108

(E23) Cepa de expresión constitutiva para hPDI sintética, hERO1-L α sintética y hGRP78 sintética; la cepa ona68708

(E24) Cepa de expresión constitutiva para hPDI sintética, hERO1-L β sintética y hGRP78 sintética; la cepa ona68908

(E25) Cepa de expresión constitutiva para hPDI sintética, OmERO1 y hGRP78 sintética; la cepa ona69108

[Ejemplo 24] Construcción de una cepa de levadura (*O. minuta*) productora de anticuerpo que expresa de manera constitutiva una chaperona

Se introdujo el vector de expresión para el gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) construido en el ejemplo 2 en una cepa que expresa de manera constitutiva un único gen de chaperonas, una cepa que expresa de manera constitutiva dos tipos de genes de chaperonas y una cepa que expresa de manera constitutiva tres tipos de genes de chaperonas cultivadas en el ejemplo 23, respectivamente, por medio de electroporación. Como cadena pesada de anticuerpo, se usó 1 μ g de onaP02706 digerido con la enzima de restricción Sse8387I. Como cadena ligera de anticuerpo, se usó 1 μ g de onaP03106 digerido con la enzima de restricción NotI. Tras la electroporación, se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 μ g/ml (6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,5 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de glucosa, 20 mg/l de L-triptófano y 20 g/l de agar Bacto) y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido volviera a crecer sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 μ g/ml de medio de agar, se examinó una cepa que secreta y produce un anticuerpo. Se seleccionó la cepa ona77108 como la cepa que expresa de manera constitutiva hERO1-L α sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona62508 como la cepa que expresa de manera constitutiva hERO1-L β sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona61808 como la cepa que expresa de manera constitutiva hGRP78 sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona77408 como la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/hERO1-L α sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona77808 como la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/hERO1-L β sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona78208 como la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/hGRP78 sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona78808 como la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/hERO1-L α sintética/hGRP78 sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona79608 como la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/hERO1-L β sintética/hGRP78 sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, y se seleccionó la cepa ona80308 como la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/OmERO1/hGRP78 sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma.

[Ejemplo 25] Efectos de una chaperona sobre la producción secretora de anticuerpo

Con el uso de la cepa que expresa de manera constitutiva una chaperona derivada de ser humano y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma obtenida en el ejemplo 24, se examinaron los efectos de introducción de una chaperona derivada de ser humano sobre la producción secretora de anticuerpo. Además, se examinaron los

efectos de la potenciación de la producción secretora de anticuerpo con la adición de inhibidores de PMT que se encontraron en el ejemplo 7. Tal como se muestra en la figura 20, una cepa control (es decir, la cepa ona02306) presentaba una cantidad de producción secretora de anticuerpo de aproximadamente 0,4 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona39307) presentaba una de aproximadamente 3,1 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva hERO1-L α y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona77108) presentaba una de aproximadamente 0,7 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva hERO1-L β y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona62508) presentaba una de aproximadamente 1,4 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva hGRP78 y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona61808) presentaba una de aproximadamente 1,0 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/hERO1-L α sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona77408) presentaba una de aproximadamente 1,4 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/hERO1-L β sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona77808) presentaba una de aproximadamente 1,0 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/hGRP78 sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona78208) presentaba una de aproximadamente 2,3 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/hERO1-L α sintética/hGRP78 sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona78808) presentaba una de aproximadamente 0,8 mg/l, la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/hERO1-L β sintética/hGRP78 sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona79608) presentaba una de 4,1 mg/l, y la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/OmERO1/hGRP78 sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona80308) presentaba una de aproximadamente 5,6 mg/l. Potenciando la expresión de chaperona derivada de ser humano, se mejoró la capacidad de producción secretora de anticuerpo en aproximadamente de 2 a 13 veces. Añadiendo inhibidores de PMT al cultivo, además, todas las cepas productoras de anticuerpo presentaban las cantidades aumentadas de producción secretora de anticuerpo, tal como se muestra en la figura 20. En particular, la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/hERO1-L β sintética/hGRP78 sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona79608) presentaba una cantidad de producción secretora de anticuerpo de 9,7 mg/l y la cepa que expresa de manera constitutiva hPDI sintética/OmERO1/hGRP78 sintética y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona80308) presentaba una de aproximadamente 12,5 mg/l. Se demostró que tales cepas presentaban una cantidad de producción secretora de anticuerpo mejorada aproximadamente 23 veces y aproximadamente 30 veces más que la de un cultivo control. Tal como se muestra en la figura 21, se confirmó por medio de análisis de inmunotransferencia de tipo Western tras electroforesis en condiciones no reductoras que aparentemente se secretaba y producía un anticuerpo de longitud completa (H2L2). Como en el caso de la expresión del/de los gen(es) de chaperonas derivado(s) de *O. minuta* solos o en combinación, también se mejoró la capacidad para la producción secretora de anticuerpo cuando la expresión del/de los gen(es) de chaperonas derivado(s) de ser humano se potenciaron solos o en combinación. Añadiendo inhibidores de PMT al cultivo, además, se mejoró la capacidad de producción secretora de anticuerpo en aproximadamente de 23 a 30 veces.

[Ejemplo 26] Efectos de una chaperona sobre la expresión de lisozima humana

(1) Construcción de un vector de expresión para lisozima humana

La lisozima humana (hLyz, n.º de registro NM_000239) está codificada por un gen que comprende 447 pares de bases y comprende 148 residuos de aminoácido. Con el fin de expresarse de manera eficaz en *O. minuta* y con el fin de expresarse en forma de una proteína de fusión con la señal de secreción (denominada a continuación en el presente documento "señal de secreción aMF") de MF alpha1 derivado de *S. cerevisiae* (número de registro GENBANK; P01149) para la secreción de manera eficaz en *O. minuta*, se sintetizó el gen de hLyz fusionada a señal de secreción aMF teniendo en cuenta la preferencia de codones de *O. minuta*. Se construyó un vector de expresión ligando un fragmento que contenía el marcador ADE1 que se obtuvo digiriendo pOMex4A dado a conocer en el documento WO 2003/091431 con las enzimas de restricción *KpnI* y *Apal*, a un fragmento que contenía el promotor de GAP y el terminador de GAP obtenido digiriendo pOMexGP1U dado a conocer en el documento WO 2003/091431 con las enzimas de restricción *KpnI* y *Apal*, y se designó el fragmento resultante como el vector pOMEGPA-1 (*Sall*-*EcoT22I*). Se introdujo el gen de hLyz fusionada a señal de secreción aMF recuperado por medio de digestión con las enzimas de restricción *Sall* y *EcoT22I* en pOMEGPA-1 (*Sall*-*EcoT22I*) preparado con la ayuda de las enzimas de restricción *Sall* y *EcoT22I* para construir un vector de expresión para el gen de hLyz fusionada a señal de secreción aMF (onaP21808).

(2) Construcción de una cepa de levadura (*O. minuta*) que produce hLyz fusionada a señal de secreción aMF

Se introdujo el vector de expresión para el gen de hLyz fusionada a señal de secreción aMF, onaP21808, construido en (1) en la cepa ona01206 que complementa una mutación de delección de *ura3* de la cepa YK5 de *O. minuta* construida en el ejemplo 6, una cepa que expresa de manera constitutiva una combinación de chaperonas; es decir, OmPDI1, OmERO1 y OmKar2, de la cepa YK5 de *O. minuta* cultivada en el ejemplo 5 (es decir, la cepa ona44607), y una cepa que expresa de manera constitutiva una combinación de chaperonas derivadas de ser humano; es decir, hPDI sintética, hERO1-L β sintética y hGRP78 sintética, cultivada en el ejemplo 23 (es decir, la cepa ona68908),

respectivamente, por medio de electroporación. Con el uso de 1 µg de onaP21808 digerido con la enzima de restricción *NotI*, se aplicaron los transformantes sobre medio de agar Casamino-U-A (6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,5 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de glucosa, 20 mg/l de L-triptófano y 20 g/l de agar Bacto) tras electroporación, y se dejó que los transformantes crecieran a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que los transformantes crecidos crecieran de nuevo sobre medio de agar Casamino-U-A y entonces se cultivaron.

(3) Efectos de una chaperona sobre la producción secretora de lisozima humana

Se introdujo el vector de expresión para el gen de hLyz fusionada a señal de secreción aMF, onaP21808, en la cepa ona01206 en la que no se había introducido una combinación de chaperonas, una cepa que expresa de manera constitutiva una combinación de genes de chaperonas derivados de *O. minuta*; es decir, OmPDI1, OmERO1 y OmKar2 (es decir, la cepa ona44607) y una cepa que expresa de manera constitutiva una combinación de genes de chaperonas derivados de ser humano; es decir, hPDI sintética, hERO1-Lβ sintética y hGRP78 sintética (es decir, la cepa ona68908). Se seleccionaron de manera arbitraria tres clones de las colonias resultantes y se cultivaron. Con el uso de medio 2x YP-P6-GG (se preparó el medio disolviendo 20 g de extracto de levadura Difco y 40 g de peptona Bacto en 900 ml de agua pura, esterilizando la disolución por medio de inyección de vapor a presión y añadiendo 100 ml de tampón fosfato 10x (pH 6,0) (KH₂PO₄ 1 M, (NH₄)₂SO₄ 0,15 M, KOH 0,375 N) esterilizado por separado, 10 ml de una disolución de glucosa al 50% esterilizada por separado y 25 ml de glicerina al 80% esterilizada por separado), se introdujeron 800 µl de medio 2x YP-P6-GG en una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, 780271), se sembraron las cepas con el uso de un palillo de dientes y se selló la parte superior de la placa con selladores de placa permeables al CO₂ (Greiner, 676051). Tras llevar a cabo el cultivo a una velocidad de agitación de 310 rpm, una amplitud de 50 mm, a 30°C durante 2 días, se añadieron 100 µl de medio 2x YP-P6-GG que contenía derivado de ácido rodanin-3-acético 1c 20 µM y se añadieron 100 µl de medio 2x YP-P6-GG que contenía 20 µM de 1c tres días más tarde. Se retiraron las células de levadura de la disolución cultivada por medio de centrifugación a 2.700 x g y 4°C durante 5 minutos, se preparó un sobrenadante de cultivo y se designó el sobrenadante resultante como muestra de lisozima humana secretada.

Se evaluó la lisozima humana secretada y producida por medio de análisis de inmunotransferencia de tipo Western y en términos de actividad bacteriolítica. Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia de tipo Western sometiendo la lisozima humana secretada y producida a SDS-PAGE en condiciones reductoras, transfiriendo la proteína separada a la membrana de PVDF y realizando la detección usando el kit de detección de inmunotransferencia de tipo Western ECL Advance (GE, RPN2135) con el uso de la fracción de IgG conjugada con peroxidasa del rábano de antisuero de conejo policlonal frente a lisozima humana (Nordic Immunological Laboratories, RAHu/Lys/PO).

Además, se sometió a ensayo la actividad bacteriolítica de la siguiente manera. Se usaron bacterias de *M. lysodeikticus* como sustrato y se suspendió en tampón fosfato 50 mM para preparar una disolución de sustrato con una concentración de 0,16 mg/ml. A 240 µl de esta disolución de sustrato, se le añadieron 10 µl de un sobrenadante de cultivo (la lisozima humana secretada) y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de esto, se sometió a ensayo la absorbancia a 450 nm. Dado que la lisozima humana degrada la pared de la célula bacteriana, la lisozima humana que presenta una mayor actividad presenta una menor absorbancia. Por tanto, se definió una unidad de actividad de lisozima como la cantidad de una enzima que es necesaria para reducir la absorbancia a 450 nm en 0,001 por minuto. Además, se sometió a ensayo la cantidad total de proteínas en el sobrenadante de cultivo usando el kit de ensayo de proteína DC II (Bio-Rad, 500-0112JA) usando albúmina sérica bovina como patrón.

Los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western demuestran que se expresa lisozima humana en todas las cepas sometidas a prueba (figura 22). Además, se encontró que la cepa en la que se habían introducido genes de chaperonas derivados de *O. minuta*; OmPDI1, OmERO1 y OmKar2, o la cepa en la que se habían introducido genes de chaperonas derivados de ser humano; hPDI sintética, hERO1-Lβ sintética y hGRP78 sintética, presentaban una capacidad para secreción y producción de lisozima humana mejorada en aproximadamente 1,5 veces o más que la de la cepa en la que no se había introducido una chaperona, basándose en la actividad bacteriolítica sometida a ensayo (tabla 3).

Tabla 3

Huésped	Chaperona introducida	Clon	Actividad bacteriolítica (unidad/ml)	Cantidad total de proteína (mg/ml)	Actividad específica (unidad/mg)
Ona01206	Ninguna	1	23,0	51	0,45
Ona01206	Ninguna	2	22,3	53	0,42
Ona01206	Ninguna	3	22,0	52	0,43
Ona44607	PEK	1	33,3	50	0,67
Ona44607	PEK	2	34,0	51	0,67
Ona44607	PEK	3	34,0	53	0,65
Ona68908	hPE β G	1	36,0	53	0,68
Ona68908	hPE β G	2	29,3	48	0,61
Ona68908	hPE β G	3	33,3	51	0,65

PEK = OmPD11 + OmERO1 + OmKar2

hPE β G = hPD1 sintética + hERO1-L β sintética + hGRP78 sintética

[Ejemplo 27] Construcción de una cepa de expresión constitutiva para una combinación de chaperonas en una cepa deficiente en proteína manosil transferasa (PMT) de *O. minuta*

(1) Preparación de una cepa deficiente en el gen PMT4 en la que se habían introducido genes de las proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (PDI1/EPO1/Kar2)

(1-1) Preparación de un vector deficiente en el gen PMT4

Se llevó a cabo una PCR usando ADN cromosómico de la cepa IFO10746 de *O. minuta* como molde, el cebador PMT4inf5'armF (5'-CGGGCCCCCTCGAGTCTATGCTCCAAGACCT-3': SEQ ID NO: 157) y el cebador PMT4inf5'armR (5'-TACCGTCGACCTCGATCAACAACCACTGATTCC-3' : SEQ ID NO: 158) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se recuperó un fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 2,2 kb, se introdujo el fragmento recuperado en rURApBKS preparado con la ayuda de la enzima de restricción *Xho*I usando el kit In-Fusion (Clontech, 631774) y se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Se designó el plásmido resultante como PMT4K/O5armrURA3. Además, se llevó a cabo una PCR usando ADN cromosómico de la cepa IFO10746 de *O. minuta* como molde, el cebador PMT4inf3'armF (5'-AGTTCTAGAGCGGCCATCCTATACCTGTCGTGCCT-3': SEQ ID NO: 159) y el cebador PMT4inf3'armR (5'-ACCGCGGTGGCGGCCGCTCGTGTTGTTCCAGGTAATCC-3': SEQ ID NO: 160) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. Se recuperó un fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 2,5 kb, se introdujo el fragmento recuperado en PMT4K/O5armrURA3 preparado con la ayuda de la enzima de restricción *Not*I usando el kit de clonación por PCR In-Fusion (Clontech, 631774) y se confirmó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado. Se designó el vector resultante como PMT4K/O/rURA3.

(1-2) Preparación de una cepa deficiente en PMT4 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt4)

Se digirió el vector deficiente en el gen PMT4, PMT4K/O/rURA3, construido en (1-1) anterior con las enzimas de restricción *Xho*I y *Not*I, y se introdujo el resultado en la cepa YK5 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1) por medio de electroporación. Con el fin de confirmar que se había destruido el gen PMT4 en esta cepa, se sintetizaron los cebadores mostrados a continuación.

PMT4PCR5'armF: 5'-GGTAGAGGACCGTATGTAGC-3' (SEQ ID NO: 161)

PMT4PCR5'armR: 5'-CAATGAAACGTTTCCGTAGGT-3' (SEQ ID NO: 162)

PMT4PCR3'armF3: 5'-TGCGAAATCGGGCCCTCT-3' (SEQ ID NO: 163)

PMT4PCR3'armR3: 5'-CCGGAGTTTGCACGGCTAC-3' (SEQ ID NO: 164)

Se suspendió parte de la levadura transformada que se había multiplicado sobre medio de agar Casamino-U en 10 μ l de una disolución de SDS al 0,25%, se añadieron 90 μ l de agua esterilizada y entonces se retiraron las células de levadura por medio de centrifugación a 2.700 x g y 4°C durante 5 minutos. Se designó el sobrenadante obtenido como disolución de ADN. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador PMT4PCR5'armF (SEQ ID NO: 161) y el cebador PMT4PCR5'armR (SEQ ID NO: 162) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. En la cepa a la que se había incorporado en el locus de PMT4 el fragmento introducido, se detectó un fragmento amplificado de 5,8 kb tal como se deduce. De manera similar, se llevó a cabo una PCR usando el cebador PMT4PCR3'armF (SEQ ID NO: 163) y el cebador PMT4PCR3'armR (SEQ ID NO: 164) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 3 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. En la

cepa a la que se había incorporado en el locus de PMT4 el fragmento introducido, se detectó un fragmento amplificado de 7,4 kb tal como se deduce. Se designó la cepa seleccionada como la cepa YK41 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt4::rURA3).

5 (1-3) Preparación de cepa deficiente en PMT4 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt4) en la que se habían introducido los genes de chaperonas

Se cultivó la cepa YK41 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt4::rURA3) preparada en (1-2) anterior en medio YPDA y se aplicó sobre medio de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) (Zymo Research, F9002) para obtener la cepa que requiere uracilo crecida. Se designó la cepa obtenida como la cepa ona93608 (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt4). Posteriormente, se digirió el vector de expresión constitutiva, onaP11007, para OmPDI1, OmERO1 y OmKar2 construido en el ejemplo 4 con la enzima de restricción *NntI* y se introdujo en la cepa ona93608 por medio de electroporación. Se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido creciera sobre medio de agar Casamino-U de nuevo y se seleccionó un transformante en el que se había introducido una chaperona por medio de PCR de colonias. Se confirmó la introducción de OmPDI1 con el uso del cebador GAPpforS-F (5'-GATCTCAGGCCGAGTCAAGAC-3': SEQ ID NO: 76) y el cebador OMPDI1T22I (5'-GATGCATTTACAACCTCGTCGTGAGCCAC-3': SEQ ID NO: 29) diseñados dentro de la secuencia de promotor de GAP, se confirmó la de OmERO1 con el uso de GAPpforS-F (5'-GATCTCAGGCCGAGTCAAGAC-3': SEQ ID NO: 76) y OMEROT22I (5'-GATGCATTTATAGCTCCAAACGATAGAG-3': SEQ ID NO: 45) y se confirmó la de OmKar2 con el uso del cebador PGKpforS-F (5'-TAACGCCGCATAGAACTAGC-3': SEQ ID NO: 77) y el cebador OMKAR-R (5'-GATGCATTACAGCTCATCATGATCCCAG-3': SEQ ID NO: 51) diseñados dentro de la secuencia de promotor de PGK. Se designó la cepa deficiente en PMT4 de *O. minuta* obtenida (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt4) en la que se habían introducido los genes de chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) como la cepa ona96708.

25 (2) Preparación de la cepa deficiente en el gen PMT5 en la que se habían introducido los genes de proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (PDI1/EPO1/Kar2)

Se cultivó la cepa YK6 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt5::rURA3) dada a conocer en el documento WO 2007/132949 en medio YPDA y se aplicó sobre medio de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) (Zymo Research, F9002) para obtener una cepa que requiere uracilo crecida. Se designó la cepa obtenida como la cepa ona64908 (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt5). Posteriormente, se digirió el vector de expresión constitutiva, onaP11007, para OmPDI1, OmERO1 y OmKar2 construido en el ejemplo 4 con la enzima de restricción *NotI* y se introdujo en la cepa ona64908 por medio de electroporación. Se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido creciera sobre medio de agar Casamino-U de nuevo y se seleccionó un transformante en el que se había introducido una chaperona por medio de PCR de colonias. Se confirmó la introducción de OmPDI1 con el uso del cebador GAPpforS-F (5'-GATCTCAGGCCGAGTCAAGAC-3': SEQ ID NO: 76) y el cebador OMPDI1T22I (5'-GATGCATTTACAACCTCGTCGTGAGCCAC-3': SEQ ID NO: 29) diseñados dentro de la secuencia de promotor de GAP, se confirmó la de OmERO1 con el uso de GAPpforS-F (5'-GATCTCAGGCCGAGTCAAGAC-3': SEQ ID NO: 76) y OMEROT22I (5'-GATGCATTTATAGCTCCAAACGATACAG-3': SEQ ID NO: 45) y se confirmó la de OmKar2 con el uso del cebador PGKpforS-F (5'-TAACGCCGCATAGAACTAGC-3': SEQ ID NO: 77) y el cebador OMKAR-R (5'-GATGCATTACAGCTCATCATGATCCCAG-3': SEQ ID NO: 51) diseñados dentro de la secuencia de promotor de PGK. Se designó la cepa deficiente en PMT5 de *O. minuta* obtenida (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt5), en la que se habían introducido los genes de chaperona (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) como la cepa ona69308.

45 (3) Preparación de la cepa deficiente en el gen PMT6 en la que se habían introducido los genes de las proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (PDI1/EPO1/Kar2)

Se cultivó la cepa YK7 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt6::rURA3) dada a conocer en el documento WO 2007/132949 en medio YPDA y se aplicó sobre medio de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) (Zymo Research, F9002) para obtener una cepa que requiere uracilo crecida. Se designó la cepa obtenida como la cepa ona65008 (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt6). Posteriormente, se digirió el vector de expresión constitutiva, onaP11007, para OmPDI1, OmERO1 y OmKar2 construido en el ejemplo 4 con la enzima de restricción *NotI* y se introdujo en la cepa ona65008 por medio de electroporación. Se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido creciera sobre medio de agar Casamino-U de nuevo y se seleccionó un transformante en el que se había introducido una chaperona por medio de PCR de colonias. Se confirmó la introducción de OmPDI1 con el uso del cebador GAPpforS-F (5'-GATCTCAGGCCGAGTCAAGAC-3': SEQ ID NO: 76) y el cebador OMPDI1T22I (5'-GATGCATTTACAACCTCGTCGTGAGCCAC-3': SEQ ID NO: 29) diseñados dentro de la secuencia de promotor de GAP, se confirmó la de OmERO1 con el uso de GAPpforS-F (5'-GATCTCAGGCCGAGTCAAGAC-3': SEQ ID NO: 76) y OMEROT22I (5'-GATGCATTTATAGCTCCAAACGATACAG-3': SEQ ID NO: 45), y se confirmó la de OmKar2 con el uso del cebador PGKpforS-F (5'-TAACGCCGCATAGAACTAGC-3': SEQ ID NO: 77) y el cebador OMKAR-R (5'-GATGCATTACAGCTCATCATGATCCCAG-3': SEQ ID NO: 51) diseñados dentro de la secuencia de promotor de PGK. Se designó la cepa deficiente en PMT6 de *O. minuta* obtenida (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt6) en la que

se habían introducido los genes de chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) como la cepa ona69508.

(4) Preparación de la cepa doblemente deficiente en PMT5/PMT6 en la que se habían introducido los genes de proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (PDI1/EPO1/Kar2)

(4-1) Destrucción del gen PMT5 en una cepa deficiente en el gen PMT6

Se digirió el vector deficiente en el gen PMT5, PMT5K/O/rURA3, dado a conocer en el documento WO 2007/132949 con la enzima de restricción *HindIII* y entonces se introdujo en la cepa ona65008 (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt6) preparada en (3) anterior por medio de electroporación. Se confirmó si el gen PMT5 se había destruido o no en la cepa con el uso del cebador dado a conocer en el documento WO 2007/132949. Se suspendió parte de la levadura transformante que se había multiplicado sobre medio de agar Casamino-U en 10 μ l de una disolución de SDS al 0,25%, se añadieron 90 μ l de agua esterilizada y entonces se retiraron las células de levadura por medio de centrifugación a 2.700 x g y 4°C durante 5 minutos. Se designó el sobrenadante obtenido como disolución de ADN. Se llevó a cabo una PCR usando el cebador gPMT5-5 (5'-CGGTGACGACTTCGACTAGTCGAG-3'; SEQ ID NO: 165) y el cebador gPMT5-2 (5'-CGGTGCTGTTGGCGTCGTCATGGGTG-3'; SEQ ID NO: 166) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. En la cepa a la que se había incorporado en el locus de PMT5 el fragmento introducido, se detectó un fragmento amplificado de 4,9 kb tal como se deduce. De manera similar, se llevó a cabo una PCR usando el cebador gPMT5-3 (5'-GGCGCGTTCCAATTCCACTCTGCTG-3'; SEQ ID NO: 167) y el cebador gPMT5-4 (5'-CGACGAGTCCTCTCACCAGGAGGTTG-3'; SEQ ID NO: 168) a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y se repitió este ciclo 25 veces. En la cepa a la que se había incorporado en el locus de PMT5 el fragmento introducido, se detectó un fragmento amplificado de 4,9 kb tal como se deduce. Se designó la cepa seleccionada como la cepa YK51 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt6 Δ pmt5::rURA3).

(4-2) Preparación de cepa doblemente deficiente en PMT5/PMT6 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt5 Δ pmt6) en la que se había introducido una chaperona

Se cultivó la cepa YK51 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt6 Δ pmt5::rURA3) preparada en (4-1) anterior en medio YPDA y se aplicó sobre medio de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) (Zymo Research, F9002) para obtener una cepa que requiere uracilo crecida. Se designó la cepa obtenida como la cepa ona15707 (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt5 Δ pmt6). Posteriormente, se digirió el vector de expresión constitutiva, onaP11007, para OmPDI1, OmERO1 y OmKar2 construido en el ejemplo 4 con la enzima de restricción *NotI* y se introdujo en la cepa ona15707 por medio de electroporación. Se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido creciera sobre medio de agar Casamino-U de nuevo y se seleccionó un transformante en el que se había introducido una chaperona por medio de PCR de colonias. Se confirmó la introducción de OmPDI1 con el uso del cebador GAPpforS-F (5'-GATCTCAGGCCGAGTCAAGAC-3'; SEQ ID NO: 76) y el cebador OMPDI1T22I (5'-GATGCATTTACAACCTCGTCGTGAGCCAC-3'; SEQ ID NO: 29) diseñados dentro de la secuencia de promotor de GAP, se confirmó la de OmERO1 con el uso de GAPpforS-F (5'-GATCTCAGGCCGAGTCAAGAC-3'; SEQ ID NO: 76) y OMEROT22I (5'-GATGCATTTATAGCTCCAAACGATACAG-3'; SEQ ID NO: 45) y se confirmó la de OmKar2 con el uso del cebador PGKpforS-F (5'-TAACGCCGCATAGAACTAGC-3'; SEQ ID NO: 77) y el cebador OMKAR-R (5'-GATGCATTACAGCTCATCATGATCCCAG-3'; SEQ ID NO: 51) diseñados dentro de la secuencia de promotor de PGK. Se designó la cepa doblemente deficiente en PMT5/PMT6 de *O. minuta* obtenida (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt5 Δ pmt6) en la que se habían introducido los genes de chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) como la cepa ona56207.

(5) Construcción de una cepa de levadura productora de anticuerpos (*O. minuta*) utilizando la cepa deficiente en el gen PMT en la que se habían introducido los genes de las proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (PDI1/EPO1/Kar2)

Se introdujeron los vectores de expresión para el gen de anticuerpo anti-receptor de TRAIL (documento WO 2001/083560) construido en el ejemplo 2 en las cepas mostradas a continuación preparadas introduciendo los genes de chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) en las cepas deficientes en PMT construidas en (1) a (4) anteriores por medio de electroporación.

Cepa deficiente en PMT4 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt4) en la que se habían introducido los genes de chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) (es decir, la cepa ona96708)

Cepa deficiente en PMT5 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt5) en la que se habían introducido los genes de chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) (es decir, la cepa ona69308)

Cepa deficiente en PMT6 de *O. minuta* (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1 Δ pmt6) en la que se habían introducido los genes de chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) (es decir, la cepa ona69508)

Cepa doblemente deficiente en PMT5/PMT6 de *O. minuta* ($\Delta och1\Delta yps1\Delta ura3\Delta ade1\Delta pmt5\Delta pmt6$) en la que se habían introducido los genes de chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) (es decir, la cepa ona56207)

Como cadena pesada de anticuerpo, se usó 1 μ g de onaP02706 digerido con la enzima de restricción Sse83871.

Como cadena ligera de anticuerpo, se usó 1 μ g de onaP03106 digerido con la enzima de restricción NotI. Tras la electroporación, se aplicó el transformante sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 μ g/ml (6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,5 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de glucosa, 20 mg/l de L-triptófano y 20 g/l de agar Bacto) y se dejó que el transformante creciera a 30°C durante aproximadamente de 2 a 3 días. Se dejó que el transformante crecido volviera a crecer sobre medio de agar Casamino-U-A al que se le había añadido Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 100 μ g/ml, y se examinó una cepa que secreta y produce un anticuerpo. Se seleccionó la cepa ona98808 como la cepa deficiente en PMT4 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva las chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma; se seleccionó la cepa ona74108 como la cepa deficiente en PMT5 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva las chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma; se seleccionó la cepa ona74608 como la cepa deficiente en PMT6 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva las chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma; y se seleccionó la cepa ona67408 como la cepa doblemente deficiente en PMT5/PMT6 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva las chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma.

[Ejemplo 28] Confirmación de la capacidad para la producción de anticuerpo de la cepa de levadura productora de anticuerpo (*O. minuta*) preparada introduciendo genes de proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (PDI1/EPO1/Kar2) en la cepa deficiente en el gen de proteína manosil transferasa (PMT) de *O. minuta*.

Se confirmó la capacidad para la producción secretora de anticuerpo de la cepa deficiente en PMT que expresa de manera constitutiva las chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma construida en el ejemplo 27 (5). Además, se examinaron los efectos de la potenciación de la producción secretora de anticuerpo con la adición de inhibidores de PMT que se encontraron en el ejemplo 7.

Se cultivó la cepa productora de anticuerpo de la siguiente manera. Con el uso de medio 2x YP-P6-GG (se preparó el medio disolviendo 20 g de extracto de levadura Difco y 40 g de peptona Bacto en 900 ml de agua pura, esterilizando la disolución por medio de inyección de vapor a presión y añadiendo 100 ml de tampón fosfato 10x (pH 6,0) (KH_2PO_4 1 M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,15 M, KOH 0,375 N) esterilizado por separado, 10 ml de una disolución de glucosa al 50% esterilizada por separado y 25 ml de glicerina al 80% esterilizada por separado), se introdujeron 800 μ l de medio 2x YP-P6-GG en una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, 780271), se sembraron las cepas con el uso de un palillo de dientes y se selló la parte superior de la placa con selladores de placa permeables al CO_2 (Greiner, 676051). Se llevó a cabo el cultivo a una velocidad de agitación de 310 rpm, una amplitud de 50 mm, a 30°C, y se añadieron en cada caso 100 μ l de medio 2x YP-P6-GG 2 y 3 días tras el inicio del cultivo. Se llevó a cabo el cultivo que implicaba la adición de inhibidores de PMT con el uso de medio 2x YP-P6-GG (se preparó el medio disolviendo 20 g de extracto de levadura Difco y 40 g de peptona Bacto en 900 ml de agua pura, esterilizando la disolución por medio de inyección de vapor a presión y añadiendo 100 ml de tampón fosfato 10x (pH 6,0) (KH_2PO_4 1 M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,15 M, KOH 0,375 N) esterilizado por separado, 10 ml de una disolución de glucosa al 50% esterilizada por separado y 25 ml de glicerina al 80% esterilizada por separado), se introdujeron 800 μ l de medio 2x YP-P6-GG en una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, 780271), se sembraron las cepas con el uso de un palillo de dientes y se selló la parte superior de la placa con selladores de placa permeables al CO_2 (Greiner, 676051). Se llevó a cabo en primer lugar el cultivo que implicaba la adición del derivado de ácido rodanin-3-acético 1c a una velocidad de agitación de 310 rpm, una amplitud de 50 mm, a 30°C durante 2 días, se añadieron 100 μ l de medio 2x YP-P6-GG que contenía 1c 20 μ M y se añadieron adicionalmente 100 μ l de medio 2x YP-P6-GG que contenía 1c 20 μ M el día 3.

Se confirmaron la secreción y producción de un anticuerpo por medio de ELISA tipo sándwich o inmunotransferencia de tipo Western. Se retiraron las células de levadura del producto de cultivo por medio de centrifugación a 2.700 x g y 4°C durante 5 minutos, y se designó el sobrenadante de cultivo resultante como muestra de anticuerpo secretado. Se sometieron los anticuerpos secretados y producidos a ensayo cuantitativo por medio de ELISA tipo sándwich. Se adsorbieron proteínas receptoras de TRAIL que eran antígenos de los anticuerpos anti-receptor de TRAIL en una placa de 96 pocillos, se añadió la muestra de anticuerpo secretado y se llevó a cabo la detección usando un anticuerpo anti-Fc específico de IgG humana marcado con peroxidasa (anticuerpo frente a IgG humana (Fc) purificado por afinidad marcado con peroxidasa, KPL, 04-10-20) y el sustrato ABTS peroxidasa (KPL, 50-66-01). Se llevó a cabo una inmunotransferencia de tipo Western tal como sigue. Tras someter la proteína a SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, se transfirió la proteína separada a una membrana de PVDF y se detectaron la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo usando anticuerpo anti-IgG humana (específico de cadena γ) (Sigma, I-3382) y anticuerpo de cabra anti-kappa b&f humana purificado por afinidad (Bethyl, A-80-115A) como anticuerpos primarios. Se usó anticuerpo anti-IgG de cabra purificado por afinidad conjugado con peroxidasa (H&L), conejo, Rockland, n.º 605-4313) como anticuerpo secundario. Se llevó a cabo la detección usando el kit de detección de inmunotransferencia de tipo Western ECL Advance (GE, RPN2135).

Tal como se muestra en la figura 23, una cepa control (es decir, la cepa ona02306) presentaba una cantidad de producción secretora de anticuerpo de aproximadamente 0,6 mg/l; la cepa que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona48707) presentaba una de aproximadamente 8,2 mg/l; la cepa deficiente en PMT4 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona98808) presentaba una de aproximadamente 0,4 mg/l; la cepa deficiente en PMT5 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona74108) presentaba una de aproximadamente 3,8 mg/l; la cepa deficiente en PMT6 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona74608) presentaba una de aproximadamente 8 mg/l; y la cepa doblemente deficiente en PMT5/PMT6 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de un anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona67408) presentaba una de aproximadamente 8,3 mg/l. Excepto para la cepa deficiente en el gen PMT4, la expresión potenciada de chaperona era eficaz para una cepa individual o doblemente deficiente del gen PMT, y se mejoró la capacidad de producción secretora de anticuerpo en aproximadamente de 5 a 14 veces más que la de una cepa control.

Además, la adición de inhibidores de PMT, rodanina, al cultivo dio como resultado una mejora en la cantidad de producción secretora de anticuerpo de aproximadamente 20 veces a aproximadamente 33 veces en todas las cepas productoras de anticuerpo, tal como se muestra en la figura 23. En el caso de la cepa deficiente en PMT5 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona74108) y la cepa deficiente en PMT6 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona74608), se redujo la cantidad de producción secretora de anticuerpo en aproximadamente el 75% la de la cepa que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona48707). En el caso de la cepa doblemente deficiente en PMT5/PMT6 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona67408), se redujo la cantidad de producción secretora de anticuerpo de la misma en aproximadamente el 60% la de la cepa que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona48707).

Tal como se describió anteriormente, la cepa deficiente en PMT4 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona98808), que presentaba una cantidad de producción de tan solo aproximadamente 0,4 mg/l, experimentó un crecimiento y una división anómalos como resultado de la deficiencia en el gen PMT4 tal como se muestra en la figura 24 y en la figura 25. Con respecto a la cepa deficiente en PMT4 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona98808), se examinó la cantidad de un inhibidor de la actividad PMT, derivado de ácido rodanin-3-acético 1c añadido. Se llevó a cabo el cultivo introduciendo 800 µl de medio 2x YP-P6-GG a una placa de 96 pocillos profundos (Greiner, 780271), se añadieron en cada caso 100 µl de medio preparado mientras se ajustaba la concentración del derivado de ácido rodanin-3-acético 1c a 1,25, 2,5, 5, 10, 20 ó 40 µM con la ayuda de medio 2x YP-P6-GG, 2 y 3 días tras el inicio del cultivo (concentración final: 0,25, 0,5, 1, 2, 4 u 8 µM). Como resultado, se mejoró la cantidad de producción en aproximadamente el 13% cuando se añadió medio 2x YP-P6-GG que contenía 1c 0,25 µM (concentración final), tal como se muestra en la figura 26. Se determinó que la concentración del inhibidor de la actividad PMT, derivado de ácido rodanin-3-acético 1c, que debe añadirse a la cepa deficiente en PMT4 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona98808), era aproximadamente 1/16 la de otras cepas.

[Ejemplo 29] Purificación de anticuerpo producido por una cepa de levadura productora de anticuerpo (*O. minuta*) preparada introduciendo los genes de las proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (PDI1/EPO1/Kar2) en la cepa deficiente en el gen PMT

Tal como se describe en el ejemplo 28, se encontró que la destrucción del gen PMT de *O. minuta* reducía la capacidad para la producción secretora de anticuerpo en cierta medida e influía significativamente en la morfología de *O. minuta*. Esto sugiere fuertemente que la supresión de la adición de cadena de O-azúcar por medio de la supresión de la actividad PMT de *O. minuta* influye significativamente en las funciones fisiológicas de *O. minuta*. Por tanto, se considera que la evaluación de la actividad biológica (es decir, actividad citotóxica) de anticuerpos producidos por tales cepas productoras de anticuerpo conduce al descubrimiento de condiciones óptimas para combinaciones de mutación de PMT, expresión constitutiva de proteínas chaperonas (PDI1/EPO1/Kar2) y adición de un inhibidor de la actividad PMT (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c).

(1) Cultivo de cepa de levadura productora de anticuerpo (*O. minuta*) preparada introduciendo los genes de las proteínas chaperonas derivadas de *O. minuta* (PDI1/EPO1/Kar2) en la cepa deficiente en el gen PMT

Se seleccionó la cepa ona02306 como cepa control (es decir, una cepa en la que no se introducen chaperonas, pero se introduce el gen de anticuerpo); se seleccionó la cepa ona48707 como cepa que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona98808 como la cepa deficiente en PMT4 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona74108 como la cepa deficiente en PMT5 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, se seleccionó la cepa ona74608 como la cepa deficiente en PMT6 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma, y se seleccionó la cepa ona67408 como la cepa doblemente deficiente en PMT5/PMT6 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma.

Se sometió un matraz Erlenmeyer de 100 ml que comprendía 20 ml de medio Casamino-U-A preparado añadiendo Zeocin™ (Invitrogen, R250-01) a una concentración de 50 µg/ml a medio Casamino-U-A (6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,5 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de glucosa y 20 mg/l de L-triptófano) a cultivo de siembra a una velocidad de agitación de 210 rpm, una amplitud de 75 mm, a 30°C durante 2 días. Posteriormente, se introdujeron de 20 a 30 ml de la disolución de cultivo de siembra en un matraz Erlenmeyer de 2 l que contenía 400 ml de medio 2x YP-P6-GG (se preparó el medio disolviendo 20 g de extracto de levadura Difco y 40 g de peptona Bacto en 900 ml de agua pura, esterilizando la disolución por medio de inyección de vapor a presión y añadiendo 100 ml de tampón fosfato 10x (pH 6,0) (KH₂PO₄ 1 M, (NH₄)₂SO₄ 0,15 M, KOH 0,375 N) esterilizado por separado, 10 ml de una disolución de glucosa al 50% esterilizada por separado y 25 ml de glicerina al 80% esterilizada por separado) y se llevó a cabo el cultivo a una velocidad de agitación de 210 rpm, una amplitud de 75 mm, a 30°C. Después de que el valor de DO 600 superase 10, se añadió un inhibidor de la actividad PMT (derivado de ácido rodanin-3-acético 1c) (concentración de disolución madre: 40 mM) en cantidades de 0,2 µM cada vez que el valor de DO600 aumentaba en 1. Sólo en el caso de la cepa deficiente en PMT4 de *O. minuta* que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona98808), se añadió el inhibidor de la actividad PMT en cantidades de 0,0125 µM en cada caso.

(2) Purificación de un anticuerpo producido a partir de *O. minuta*

Se retiraron las células de levadura de la disolución de cultivo por medio de centrifugación a 13.000 x g, 4°C, durante 30 minutos, y se designó el sobrenadante de cultivo como muestra de anticuerpo secretado. Se concentró la muestra usando Pall Filtron Centrimate™ (tamiz de medio Omega Centrimate 10K, Pall) y entonces se purificó con el uso del purificador AKTA (GE). Al principio, se adsorbió la muestra de anticuerpo concentrada en HiTrap Mabelect SuRe (GE, 11-0034-94), que se había equilibrado con tampón fosfato de sodio (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 7,2) y se eluyó la muestra con el uso de tampón de elución de IgG ImmunoPure (Pierce, 21009). Se neutralizó inmediatamente la fracción eluida con la adición de tampón Tris-HCl 1 M (pH 9) en una cantidad de una décima parte de la fracción de elución, y entonces se añadió una cantidad equivalente de tampón fosfato de sodio (fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,2). Posteriormente, se adsorbió la fracción eluida con el uso de HiTrap Mabelect SuRe en un cartucho de proteína L (Pierce, n.º 89929), que se había equilibrado con tampón fosfato de sodio (fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,2), y se eluyó la muestra con el uso de tampón de elución de IgG ImmunoPure (Pierce, 21009). Se sometió la fracción eluida purificada con cartucho de proteína L a filtración en gel con el uso de Superdex200 10/30 GL (GE, 17-5175-01), que se había equilibrado con tampón fosfato de sodio (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,2) para purificar diversos anticuerpos producidos a partir de *O. minuta*. Se analizaron los anticuerpos purificados por medio de cromatografía de exclusión molecular (SEC)-HPLC usando PROTEIN KW403-4F (4,6 (d.i.) x 300 mm) (Showa Denko K.K., F6989202). Se usó tampón fosfato de sodio (fosfato de sodio 30 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 6,7) como fase móvil. La figura 27 muestra un patrón de elución por medio de SEC-HPLC de los anticuerpos purificados. Mientras la cepa ona02306 (la cepa control que no contiene chaperonas y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma) y la cepa deficiente en PMT4 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona98808) produjeron cromatogramas anchos, la cepa que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona48707), la cepa deficiente en PMT5 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona74108), la cepa deficiente en PMT6 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmLRO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona74608) y la cepa doblemente deficiente en PMT5/PMT6 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona67408) produjeron cromatogramas estrechos.

Los resultados de SDS-PAGE en condiciones reductoras/no reductoras seguido por análisis de inmunotransferencia de tipo Western demuestran que el heterotetrámero de la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo no se detectaba claramente en la cepa ona02306 (la cepa control que no contiene chaperonas y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma) y la cepa deficiente en PMT4 que expresa de manera constitutiva chaperonas

(OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona98808) en condiciones no reductoras tal como se muestra en la figura 28. Por otro lado, el heterotetrámero de la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo se detectó claramente en la cepa que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona48707), la cepa deficiente en PMT5 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona74108), la cepa deficiente en PMT6 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona74608), y la cepa doblemente deficiente en PMT5/PMT6 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona67408). Se encontró que la potenciación de la expresión de chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) aceleraba la formación de un ensamblaje; es decir, el heterotetrámero de la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo.

(3) Actividad citotóxica de anticuerpos producidos a partir de *O. minuta*

(3-1) Medición de la cantidad de proteína de anticuerpo purificado

Se midió la cantidad de la proteína de anticuerpo purificado empleando albúmina sérica bovina como patrón y usando el kit de ensayo de proteína DC II (Bio-Rad, 500-0112JA).

(3-2) Medición de la actividad citotóxica de anticuerpo purificado

Se midió la actividad citotóxica del anticuerpo anti-receptor de TRAIL mediante el método de reticulación usando anticuerpos secundarios tal como se describe a continuación. Se usó un anticuerpo anti-receptor de TRAIL producido con el uso de una célula de mamífero como muestra control. Se usó anticuerpo de cabra frente a Fc de IgG humana purificado por afinidad (MP Biomedicals, n.º 55071) como anticuerpo secundario. Se ajustó la concentración del anticuerpo secundario a 1 mg/ml con el uso de medio de cultivo celular (medio RPMI 1640 que contenía suero al 10%, GIBCO, 11875), y se usó el medio de cultivo celular que contenía el anticuerpo secundario así preparado para preparar una muestra a una concentración de 2.000 ng/ml. Además, se preparó una serie de dilución de la muestra preparada (200 ng/ml, 20 ng/ml, 2 ng/ml y 0,2 ng/ml; diluciones de 10 veces) y se fraccionó en la placa de 96 pocillos Corning (costar, n.º 3598) a 50 µl/pocillo. Se sembró una suspensión de células Jurkat (1×10^5 células/ml) en la placa a la que se había añadido la muestra a 50 µl/pocillo. Se cuantificó el ATP derivado de células con actividad metabólica 72 horas tras el inicio del cultivo con el uso del kit de detección de ATP (ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo™, Promega, n.º G7571), se designó la supervivencia celular del grupo no tratado como el 100% y se determinó el recuento de células viables en cada grupo tratado. Tal como se muestra en la figura 29, mientras el anticuerpo anti-TRAIL producido a partir de células animales presentaba una CI50 de 7 ng/ml, el anticuerpo producido a partir de la cepa ona02306 (la cepa control que no contiene chaperonas y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma) presentaba una CI50 de 77,3 ng/ml; el anticuerpo producido a partir de la cepa ona48707 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma presentaba una CI50 de 28,5 ng/ml; el anticuerpo producido a partir de la cepa ona74108 (la cepa deficiente en PMT5 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma) presentaba una CI50 de 26,6 ng/ml; el anticuerpo producido a partir de la cepa ona74608 (la cepa deficiente en PMT6 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma) presentaba una CI50 de 16,8 ng/ml; el anticuerpo producido a partir de la cepa ona67408 (la cepa doblemente deficiente en PMT5/PMT6 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma) presentaba una CI50 de 21,8 ng/ml. Tal como se muestra en la figura 30, mientras el anticuerpo anti-TRAIL producido a partir de células animales presentaba una CI50 de 6,7 ng/ml, el anticuerpo producido a partir de la cepa ona48707 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma presentaba una CI50 de 25,3 ng/ml; el anticuerpo producido a partir de la cepa ona74608 (la cepa deficiente en PMT6 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma) presentaba una CI50 de 21,6 ng/ml; el anticuerpo producido a partir de la cepa ona98808 (la cepa deficiente en PMT4 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma) presentaba una CI50 de 28,2 ng/ml.

La actividad citotóxica del anticuerpo producido a partir de la cepa ona02306 (la cepa control que no contiene chaperonas y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma) era de tan sólo una undécima parte de la del anticuerpo anti-receptor de TRAIL producido a partir de células animales. El anticuerpo producido por la cepa ona48707 que expresa de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma presentaba una actividad citotóxica de 1/4,1 veces la del anticuerpo anti-receptor de TRAIL producido a partir de células animales y 2,7 veces la de la cepa control. Mientras todas las cepas deficientes en PMT que expresan de manera constitutiva chaperonas (OmpDI1/OmERO1/OmKar2) y que tienen el gen de anticuerpo introducido en las mismas presentaban una actividad citotóxica mayor que la de la cepa control, el anticuerpo producido a partir de la cepa deficiente en PMT6 que expresa de manera constitutiva chaperonas

(OmPDI1/OmERO1/OmKar2) y que tiene el gen de anticuerpo introducido en la misma (es decir, la cepa ona74608) presentaba la mayor actividad citotóxica, que era 1/2,4 veces la del anticuerpo anti-receptor de TRAIL producido a partir de células animales y 4,6 veces mayor que la de la cepa control. Los resultados demuestran que un anticuerpo producido introduciendo chaperonas (OmPDI1/OmERO1/OmKar2) en la cepa deficiente en el gen PMT6 de *O. minuta* con la adición de los inhibidores de PMT (es decir, el derivado de ácido rodanin-3-acético 1c) presentaban la mayor actividad biológica.

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, la introducción de genes de chaperonas en células huésped posibilita la secreción y producción de alto nivel de proteínas que tienen estructuras complicadas (por ejemplo, anticuerpos) que se pliegan correctamente en células huésped, así como proteínas normales. Empleando la introducción de genes de chaperonas en combinación con la supresión de la adición de cadena de O-azúcar inherente a levadura, pueden alcanzarse efectos sinérgicos con respecto a la secreción y producción de alto nivel de proteínas.

Lista de secuencias

<110> Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada

<110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Método para la producción secretora de alto nivel de proteína

<130> PH-3697-PCT

<150> Documento JP2007-283731

<151> 31-10-2007

<150> Documento JP2007-288845

<151> 6-11-2007

<160> 168

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 1551

<212> ADN

<213> *Ogataea minuta*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1551)

<400> 1

atg aag tta ttt gga ttg act aca ttg acc agc atc ctg gcc gcc ctc 48

Met Lys Leu Phe Gly Leu Thr Thr Leu Thr Ser Ile Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

aca gtg gtg agc gcc acc gaa gag cca gca gtt gcc tcg cca gac tcg 96

Thr Val Val Ser Ala Thr Glu Glu Pro Ala Val Ala Ser Pro Asp Ser

20 25 30

gcg gtg gtg aag ctg acg gcc gac act ttc gag agc ttc atc aag gag 144

Ala Val Val Lys Leu Thr Ala Asp Thr Phe Glu Ser Phe Ile Lys Glu

35 40 45

aac cca ttg gtt ctg gcg gag ttt ttt gcg cca tgg tgt ggc cac tgc	192
Asn Pro Leu Val Leu Ala Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys	
50 55 60	
aag aag ctg ggt cca gaa ttc agc gca gcc gca gac cag ctg gtg gag	240
Lys Lys Leu Gly Pro Glu Phe Ser Ala Ala Ala Asp Gln Leu Val Glu	
65 70 75 80	
aag aac atc aag ctt gca cag atc gac tgt acc gag gaa aga gat ctg	288
Lys Asn Ile Lys Leu Ala Gln Ile Asp Cys Thr Glu Glu Arg Asp Leu	
85 90 95	
tgt tcg tcg cac gga atc aga gga tac cca act ttg aag gtg ttc agg	336
Cys Ser Ser His Gly Ile Arg Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Val Phe Arg	
100 105 110	
ggc gct agt gag cct gct gac tac caa gcc gcc aga gaa cag gaa gct	384
Gly Ala Ser Glu Pro Ala Asp Tyr Gln Gly Ala Arg Glu Gln Glu Ala	
115 120 125	
att gtc agt caa atg atc aag ctt tct tta cct gct gtt tcc gtc att	432
Ile Val Ser Gln Met Ile Lys Leu Ser Leu Pro Ala Val Ser Val Ile	
130 135 140	
gag gat tct gcc gac ctg ttt gat acc att gca gaa gtc tcc gac gcc	480
Glu Asp Ser Ala Asp Leu Phe Asp Thr Ile Ala Glu Val Ser Asp Ala	
145 150 155 160	
ctc att gtg caa gtg ttt cct gcg gga gct gct cag tct tcc aac gag	528
Leu Ile Val Gln Val Phe Pro Ala Gly Ala Ala Gln Ser Ser Asn Glu	
165 170 175	
acg ttc tac gaa gtc gcc aac gaa ctg aga aac gac ttt gtt ttt gtc	576
Thr Phe Tyr Glu Val Ala Asn Glu Leu Arg Asn Asp Phe Val Phe Val	
180 185 190	
tcc acc act aac gag ggg tac gtg aaa aag tac gcg aag gac tca aag	624
Ser Thr Thr Asn Glu Gly Tyr Val Lys Lys Tyr Ala Lys Asp Ser Lys	
195 200 205	
tca cct gct tat gtc atc ttc agg caa gga gaa aag gtt gaa gat gcg	672

Ser Pro Ala Tyr Val Ile Phe Arg Gln Gly Glu Lys Val Glu Asp Ala	
210 215 220	
tcc aca tac acc gga aag act gtt gac gac act cac ttg aag cag ttc	720
Ser Thr Tyr Thr Gly Lys Thr Val Asp Asp Thr His Leu Lys Gln Phe	
225 230 235 240	
atc aat acc gaa acc aaa cct ctg ttt ggt gaa atc acc ggc aac act	768
Ile Asn Thr Glu Thr Lys Pro Leu Phe Gly Glu Ile Thr Gly Asn Thr	
245 250 255	
ttc aag acc tac atg gag gcc gag ctt cct ttg gcg tac ttt ttc tgg	816
Phe Lys Thr Tyr Met Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Tyr Phe Phe Trp	
260 265 270	
gac gaa gag tct caa agg gcc gag gtc gct gac atc atc acc gag ctg	864
Asp Glu Glu Ser Gln Arg Ala Glu Val Ala Asp Ile Ile Thr Glu Leu	
275 280 285	
gcc aag aag ttt aga gga gag atg aac ttt gtt ggt ttg gaa gcc aag	912
Ala Lys Lys Phe Arg Gly Glu Met Asn Phe Val Gly Leu Glu Ala Lys	
290 295 300	
aga tac ggt atg cat gcc aag aac ctc aac atg gag gaa aag ttc ccc	960
Arg Tyr Gly Met His Ala Lys Asn Leu Asn Met Glu Glu Lys Phe Pro	
305 310 315 320	
ttg ttc gcc atc cac gat ttg acc gga aac ctc aag tac ggt att tct	1008
Leu Phe Ala Ile His Asp Leu Thr Gly Asn Leu Lys Tyr Gly Ile Ser	
325 330 335	
caa gag tct gat ctt gac gtc aag gaa atc cct aag ttc gtt gag gat	1056
Gln Glu Ser Asp Leu Asp Val Lys Glu Ile Pro Lys Phe Val Glu Asp	
340 345 350	
ttc aag aag ggc aag ttg caa gca att gtc aag tct gag cca att cca	1104
Phe Lys Lys Gly Lys Leu Gln Ala Ile Val Lys Ser Glu Pro Ile Pro	
355 360 365	
gaa gtc caa gag gag tcc gtg tac cac ctg gtt gga cac gag cac gac	1152
Glu Val Gln Glu Glu Ser Val Tyr His Leu Val Gly His Glu His Asp	
370 375 380	

gcc atc acc aag cag aag aag gac gtt ttg gtt gag tac tac gcc cca 1200
Ala Ile Thr Lys Gln Lys Lys Asp Val Leu Val Glu Tyr Tyr Ala Pro
385 390 395 400

tgg tgt gga cac tgc aag aag ctg gct cca act tac gaa att ttg gcc 1248
Trp Cys Gly His Cys Lys Lys Leu Ala Pro Thr Tyr Glu Ile Leu Ala
405 410 415

agc atc tac cag aac gac act gat gcc aag gaa aag gtt gtg att gcc 1296
Ser Ile Tyr Gln Asn Asp Thr Asp Ala Lys Glu Lys Val Val Ile Ala
420 425 430

aag att gac cac act gcc aac gat gtt gcc ggt gtc gac atc gcc ggt 1344
Lys Ile Asp His Thr Ala Asn Asp Val Ala Gly Val Asp Ile Ala Gly
435 440 445

tat cca acc atc atc ttg tat cct ggt gac gaa tct gag ccg gtt gtg 1392
Tyr Pro Thr Ile Ile Leu Tyr Pro Gly Asp Glu Ser Glu Pro Val Val
450 455 460

tac gag ggt tct aga act cta gag gct ctc agt tca ttc atc aag gag 1440
Tyr Glu Gly Ser Arg Thr Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe Ile Lys Glu
465 470 475 480

aag ggt tcg aac ggc gtt gac gct ttg tcc atc aag gaa tcg cgt gtt 1488
Lys Gly Ser Asn Gly Val Asp Ala Leu Ser Ile Lys Glu Ser Arg Val
485 490 495

gaa aaa gaa gcc gat gct caa gcc gat gct cct gac gct ggc gtg gct 1536
Glu Lys Glu Ala Asp Ala Gln Ala Asp Ala Pro Asp Ala Gly Val Ala
500 505 510

cac gac gag ttg taa 1551
His Asp Glu Leu
515

<210> 2
<211> 516
5 <212> PRT
<213> *Ogataea minuta*

<400> 2

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

Thr Val Val Ser Ala Thr Glu Glu Pro Ala Val Ala Ser Pro Asp Ser
20 25 30

Ala Val Val Lys Leu Thr Ala Asp Thr Phe Glu Ser Phe Ile Lys Glu
35 40 45

Asn Pro Leu Val Leu Ala Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys
50 55 60

Lys Lys Leu Gly Pro Glu Phe Ser Ala Ala Ala Asp Gln Leu Val Glu
65 70 75 80

Lys Asn Ile Lys Leu Ala Gln Ile Asp Cys Thr Glu Glu Arg Asp Leu
85 90 95

Cys Ser Ser His Gly Ile Arg Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Val Phe Arg
100 105 110

Gly Ala Ser Glu Pro Ala Asp Tyr Gln Gly Ala Arg Glu Gln Glu Ala
115 120 125

Ile Val Ser Gln Met Ile Lys Leu Ser Leu Pro Ala Val Ser Val Ile
130 135 140

Glu Asp Ser Ala Asp Leu Phe Asp Thr Ile Ala Glu Val Ser Asp Ala
145 150 155 160

Leu Ile Val Gln Val Phe Pro Ala Gly Ala Ala Gln Ser Ser Asn Glu
165 170 175

Thr Phe Tyr Glu Val Ala Asn Glu Leu Arg Asn Asp Phe Val Phe Val
180 185 190

Ser Thr Thr Asn Glu Gly Tyr Val Lys Lys Tyr Ala Lys Asp Ser Lys
195 200 205

Ser Pro Ala Tyr Val Ile Phe Arg Gln Gly Glu Lys Val Glu Asp Ala
210 215 220

Ser Thr Tyr Thr Gly Lys Thr Val Asp Asp Thr His Leu Lys Gln Phe
225 230 235 240

Ile Asn Thr Glu Thr Lys Pro Leu Phe Gly Glu Ile Thr Gly Asn Thr
245 250 255

Phe Lys Thr Tyr Met Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Tyr Phe Phe Trp
260 265 270

Asp Glu Glu Ser Gln Arg Ala Glu Val Ala Asp Ile Ile Thr Glu Leu
275 280 285

Ala Lys Lys Phe Arg Gly Glu Met Asn Phe Val Gly Leu Glu Ala Lys
290 295 300

Arg Tyr Gly Met His Ala Lys Asn Leu Asn Met Glu Glu Lys Phe Pro
305 310 315 320

Leu Phe Ala Ile His Asp Leu Thr Gly Asn Leu Lys Tyr Gly Ile Ser

	325		330		335
Gln Glu Ser Asp Leu Asp Val Lys Glu Ile Pro Lys Phe Val Glu Asp					
	340		345		350
Phe Lys Lys Gly Lys Leu Gln Ala Ile Val Lys Ser Glu Pro Ile Pro					
	355		360		365
Glu Val Gln Glu Glu Ser Val Tyr His Leu Val Gly His Glu His Asp					
	370		375		380
Ala Ile Thr Lys Gln Lys Lys Asp Val Leu Val Glu Tyr Tyr Ala Pro					
	385		390		395 400
Trp Cys Gly His Cys Lys Lys Leu Ala Pro Thr Tyr Glu Ile Leu Ala					
	405		410		415
Ser Ile Tyr Gln Asn Asp Thr Asp Ala Lys Glu Lys Val Val Ile Ala					
	420		425		430
Lys Ile Asp His Thr Ala Asn Asp Val Ala Gly Val Asp Ile Ala Gly					
	435		440		445
Tyr Pro Thr Ile Ile Leu Tyr Pro Gly Asp Glu Ser Glu Pro Val Val					
	450		455		460
Tyr Glu Gly Ser Arg Thr Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe Ile Lys Glu					
	465		470		475 480
Lys Gly Ser Asn Gly Val Asp Ala Leu Ser Ile Lys Glu Ser Arg Val					
	485		490		495

Glu Lys Glu Ala Asp Ala Gln Ala Asp Ala Pro Asp Ala Gly Val Ala
500 505 510

His Asp Glu Leu
515

<210> 3
<211> 936
5 <212> ADN
<213> *Ogataea minuta*

<220>
10 <221> CDS
<222> (1) .. (936)

<400> 3
atg aaa gtg gca agt ttg ata gca ttg gtc gtt acg ccg att att gct 48
Met Lys Val Ala Ser Leu Ile Ala Leu Val Val Thr Pro Ile Ile Ala
1 5 10 15

gcc act ggg gtg gta gca gat ccg cag cag cag gcc aaa aga cct ggt 96
Ala Thr Gly Val Val Ala Asp Pro Gln Gln Gln Ala Lys Arg Pro Gly
20 25 30

ttt tac aag aat tca aag cat atc tac aat ctc act ccc cag aac ttt 144
Phe Tyr Lys Asn Ser Lys His Ile Tyr Asn Leu Thr Pro Gln Asn Phe
35 40 45

gac gac gtg gtc ctg caa acc aac cat acg tct gtc gtg gag ttc tat 192
Asp Asp Val Val Leu Gln Thr Asn His Thr Ser Val Val Glu Phe Tyr
50 55 60

gcg cca tgg tgt ggc tat tgc gca gag ttt gag agc cag tac cgc aaa 240
Ala Pro Trp Cys Gly Tyr Cys Ala Glu Phe Glu Ser Gln Tyr Arg Lys
65 70 75 80

gca gca aag atc gga tcg gag ttc gtg aat ttt gcg gcc gtt aac tgc 288
Ala Ala Lys Ile Gly Ser Glu Phe Val Asn Phe Ala Ala Val Asn Cys

85	90	95	
gac gaa gac aag aac aaa cca ttg tgc aac aag tac cgc gtc gaa ggg			336
Asp Glu Asp Lys Asn Lys Pro Leu Cys Asn Lys Tyr Arg Val Glu Gly			
100	105	110	
ttc ccg acg gtg atg gtt ttc cgt cca gcg aag gtc aac tcg gcg gga			384
Phe Pro Thr Val Met Val Phe Arg Pro Ala Lys Val Asn Ser Ala Gly			
115	120	125	
tcc aac ggc aac agg cct cat tcc tcc gaa acg tat cgg ggc gag aga			432
Ser Asn Gly Asn Arg Pro His Ser Ser Glu Thr Tyr Arg Gly Glu Arg			
130	135	140	
acg gcg gct aag ttg ctc gag cat gtc aag ggc cgt gtg gtg aat tac			480
Thr Ala Ala Lys Leu Leu Glu His Val Lys Gly Arg Val Val Asn Tyr			
145	150	155	160
gtg aag aga atc aag ctc aac aaa ctt gat gaa ttt ctc aaa ccg aat			528
Val Lys Arg Ile Lys Leu Asn Lys Leu Asp Glu Phe Leu Lys Pro Asn			
165	170	175	
gaa aag agc aga gtc ttg ctg gtg act tca aaa agc act ctt tcg ccg			576
Glu Lys Ser Arg Val Leu Leu Val Thr Ser Lys Ser Thr Leu Ser Pro			
180	185	190	
gtt ttc aag agc ctg tcg atc gat ttt ctc gac tca gtc acg ttg gca			624
Val Phe Lys Ser Leu Ser Ile Asp Phe Leu Asp Ser Val Thr Leu Ala			
195	200	205	
tac ctc act ctg agc gaa aac gac tcc gaa ggt aga gac aaa ctg ctg			672
Tyr Leu Thr Leu Ser Glu Asn Asp Ser Glu Gly Arg Asp Lys Leu Leu			
210	215	220	
gaa aag att cct gcc ctc aaa gcg gac ttc aaa gtc ccg act tta ctc			720
Glu Lys Ile Pro Ala Leu Lys Ala Asp Phe Lys Val Pro Thr Leu Leu			
225	230	235	240
gcc atc gac aag gga acg aaa aat gtg acg gtt tat gat tcc gaa tcg			768
Ala Ile Asp Lys Gly Thr Lys Asn Val Thr Val Tyr Asp Ser Glu Ser			
245	250	255	

atg tcg aaa aaa gag ctg acg aag ttc atg tct aag ttc ggc cag cca 816
Met Ser Lys Lys Glu Leu Thr Lys Phe Met Ser Lys Phe Gly Gln Pro
260 265 270

caa gag ggg gca atg agc gaa aga ggg ggc atc ttg aaa gga atc aag 864
Gln Glu Gly Ala Met Ser Glu Arg Gly Gly Ile Leu Lys Gly Ile Lys
275 280 285

aag ggt gct tac aag agc ttc aaa gat tac aaa aag aag atg caa caa 912
Lys Gly Ala Tyr Lys Ser Phe Lys Asp Tyr Lys Lys Lys Met Gln Gln
290 295 300

gct ctt gaa aaa gat gag cta tga 936
Ala Leu Glu Lys Asp Glu Leu
305 310

<210> 4
<211> 311
<212> PRT
<213> *Ogataea minuta*

<400> 4
Met Lys Val Ala Ser Leu Ile Ala Leu Val Val Thr Pro Ile Ile Ala
1 5 10 15

Ala Thr Gly Val Val Ala Asp Pro Gln Gln Gln Ala Lys Arg Pro Gly
20 25 30

Phe Tyr Lys Asn Ser Lys His Ile Tyr Asn Leu Thr Pro Gln Asn Phe
35 40 45

Asp Asp Val Val Leu Gln Thr Asn His Thr Ser Val Val Glu Phe Tyr
50 55 60

Ala Pro Trp Cys Gly Tyr Cys Ala Glu Phe Glu Ser Gln Tyr Arg Lys
65 70 75 80

Ala Ala Lys Ile Gly Ser Glu Phe Val Asn Phe Ala Ala Val Asn Cys
85 90 95

Asp Glu Asp Lys Asn Lys Pro Leu Cys Asn Lys Tyr Arg Val Glu Gly
100 105 110

Phe Pro Thr Val Met Val Phe Arg Pro Ala Lys Val Asn Ser Ala Gly
115 120 125

Ser Asn Gly Asn Arg Pro His Ser Ser Glu Thr Tyr Arg Gly Glu Arg
130 135 140

Thr Ala Ala Lys Leu Leu Glu His Val Lys Gly Arg Val Val Asn Tyr
145 150 155 160

Val Lys Arg Ile Lys Leu Asn Lys Leu Asp Glu Phe Leu Lys Pro Asn
165 170 175

Glu Lys Ser Arg Val Leu Leu Val Thr Ser Lys Ser Thr Leu Ser Pro
180 185 190

Val Phe Lys Ser Leu Ser Ile Asp Phe Leu Asp Ser Val Thr Leu Ala
195 200 205

Tyr Leu Thr Leu Ser Glu Asn Asp Ser Glu Gly Arg Asp Lys Leu Leu
210 215 220

Glu Lys Ile Pro Ala Leu Lys Ala Asp Phe Lys Val Pro Thr Leu Leu
225 230 235 240

Ala Ile Asp Lys Gly Thr Lys Asn Val Thr Val Tyr Asp Ser Glu Ser
245 250 255

Met Ser Lys Lys Glu Leu Thr Lys Phe Met Ser Lys Phe Gly Gln Pro
260 265 270

Gln Glu Gly Ala Met Ser Glu Arg Gly Gly Ile Leu Lys Gly Ile Lys
275 280 285

Lys Gly Ala Tyr Lys Ser Phe Lys Asp Tyr Lys Lys Lys Met Gln Gln
290 295 300

Ala Leu Glu Lys Asp Glu Leu
305 310

<210> 5
<211> 930
5 <212> ADN
<213> *Ogataea minuta*

<220>
10 <221> CDS
<222> (1) .. (930)

<400> 5
atg ttt atg gag atc gga gag gcg tac gag gtg ctg atg gat tca gaa 48
Met Phe Met Glu Ile Gly Glu Ala Tyr Glu Val Leu Met Asp Ser Glu
1 5 10 15

aag aga tcc ata tat gac agg tac gga gag gaa ggc ttg aaa ggc ggt 96
Lys Arg Ser Ile Tyr Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Gly
20 25 30

gca ggg ggc gga gga gga gga caa cac cac gat ccg ttc gac atg ttt 144
Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln His His Asp Pro Phe Asp Met Phe
35 40 45

gcc aac ttt ttc ggc ggc gcc ggt ggg cgt caa caa gca cgg gga gtt	192
Ala Asn Phe Phe Gly Gly Ala Gly Gly Arg Gln Gln Ala Arg Gly Val	
50 55 60	
cca aga ggg tcg gac att gcc acg gag atg gag ttt acc ttg aaa gag	240
Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Thr Glu Met Glu Phe Thr Leu Lys Glu	
65 70 75 80	
ttt tac aac gga gtg aat agc gac ttt tca ctc gaa ctg caa gac atc	288
Phe Tyr Asn Gly Val Asn Ser Asp Phe Ser Leu Glu Leu Gln Asp Ile	
85 90 95	
tgt gac cgt tgt gac gga agc ggg tcg cag gac ggg aaa gtg cac aag	336
Cys Asp Arg Cys Asp Gly Ser Gly Ser Gln Asp Gly Lys Val His Lys	
100 105 110	
tgt tct cga tgc aat ggt cgt ggc cgg gtg tta gtg aag aga cag ttg	384
Cys Ser Arg Cys Asn Gly Arg Gly Arg Val Leu Val Lys Arg Gln Leu	
115 120 125	
ggc cct ggc atg ttc cag cag atg gag tcg gcg tgt ccc gac tgt cgt	432
Gly Pro Gly Met Phe Gln Gln Met Glu Ser Ala Cys Pro Asp Cys Arg	
130 135 140	
gga gca gga aaa cag att act cac cat tgc aag aag tgt cgg ggt ggc	480
Gly Ala Gly Lys Gln Ile Thr His His Cys Lys Lys Cys Arg Gly Gly	
145 150 155 160	
ggg gtt gtc cgt gga att cgc aac ttc aac atc cac ctt gag cca gga	528
Gly Val Val Arg Gly Ile Arg Asn Phe Asn Ile His Leu Glu Pro Gly	
165 170 175	
act ccg cgc gac cac gtc gaa gtg tac gag ggt cag tcc gac agg tct	576
Thr Pro Arg Asp His Val Glu Val Tyr Glu Gly Gln Ser Asp Arg Ser	
180 185 190	
ccg gag tgg gag gct ggt aac tta cgt ctg agc gtc aga gag aag aaa	624
Pro Glu Trp Glu Ala Gly Asn Leu Arg Leu Ser Val Arg Glu Lys Lys	
195 200 205	
agc gga aac ctt ggg tat cgt cgg atc gga aac aat ctg tac cgc aca	672

Ser Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Arg Ile Gly Asn Asn Leu Tyr Arg Thr
 210 215 220

gag atc ttg acg ctg agc gag tct ctg aag ggt ggt tgg gtc cgc gag 720
 Glu Ile Leu Thr Leu Ser Glu Ser Leu Lys Gly Gly Trp Val Arg Glu
 225 230 235 240

atc ccg ttt ctg gac aac tac gac gcc gtc tta aag ctg gaa aga cca 768
 Ile Pro Phe Leu Asp Asn Tyr Asp Ala Val Leu Lys Leu Glu Arg Pro
 245 250 255

ctc gga agt gtt gtt acc agc ggg gaa gtg cag gtg gtg aaa gga aag 816
 Leu Gly Ser Val Val Thr Ser Gly Glu Val Gln Val Val Lys Gly Lys
 260 265 270

ggt atg ccg att gcc aac tcc gtg gat cag ttt ggc gat ctg tat gtg 864
 Gly Met Pro Ile Ala Asn Ser Val Asp Gln Phe Gly Asp Leu Tyr Val
 275 280 285

gag tat gtg gtg ttg tat ccg gga gga agc ccg aag aag gtg agc aag 912
 Glu Tyr Val Val Leu Tyr Pro Gly Gly Ser Pro Lys Lys Val Ser Lys
 290 295 300

ttg cac gac gag ctg tga 930
 Leu His Asp Glu Leu
 305

<210> 6
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> *Ogataea minuta*

<400> 6
 Met Phe Met Glu Ile Gly Glu Ala Tyr Glu Val Leu Met Asp Ser Glu
 1 5 10 15

Lys Arg Ser Ile Tyr Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Gly
 20 25 30

5

ES 2 537 806 T3

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln His His Asp Pro Phe Asp Met Phe
35 40 45

Ala Asn Phe Phe Gly Gly Ala Gly Gly Arg Gln Gln Ala Arg Gly Val
50 55 60

Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Thr Glu Met Glu Phe Thr Leu Lys Glu
65 70 75 80

Phe Tyr Asn Gly Val Asn Ser Asp Phe Ser Leu Glu Leu Gln Asp Ile
85 90 95

Cys Asp Arg Cys Asp Gly Ser Gly Ser Gln Asp Gly Lys Val His Lys
100 105 110

Cys Ser Arg Cys Asn Gly Arg Gly Arg Val Leu Val Lys Arg Gln Leu
115 120 125

Gly Pro Gly Met Phe Gln Gln Met Glu Ser Ala Cys Pro Asp Cys Arg
130 135 140

Gly Ala Gly Lys Gln Ile Thr His His Cys Lys Lys Cys Arg Gly Gly
145 150 155 160

Gly Val Val Arg Gly Ile Arg Asn Phe Asn Ile His Leu Glu Pro Gly
165 170 175

Thr Pro Arg Asp His Val Glu Val Tyr Glu Gly Gln Ser Asp Arg Ser
180 185 190

Pro Glu Trp Glu Ala Gly Asn Leu Arg Leu Ser Val Arg Glu Lys Lys

195

200

205

Ser Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Arg Ile Gly Asn Asn Leu Tyr Arg Thr
210 215 220

Glu Ile Leu Thr Leu Ser Glu Ser Leu Lys Gly Gly Trp Val Arg Glu
225 230 235 240

Ile Pro Phe Leu Asp Asn Tyr Asp Ala Val Leu Lys Leu Glu Arg Pro
245 250 255

Leu Gly Ser Val Val Thr Ser Gly Glu Val Gln Val Val Lys Gly Lys
260 265 270

Gly Met Pro Ile Ala Asn Ser Val Asp Gln Phe Gly Asp Leu Tyr Val
275 280 285

Glu Tyr Val Val Leu Tyr Pro Gly Gly Ser Pro Lys Lys Val Ser Lys
290 295 300

Leu His Asp Glu Leu
305

<210> 7

<211> 1137

5 <212> ADN

<213> *Ogataea minuta*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1137)

<400> 7

atg aaa gtc acg tct atc tgg caa gtc ctg ttt atg ttg atc gcc ggc	48
Met Lys Val Thr Ser Ile Trp Gln Val Leu Phe Met Leu Ile Ala Gly	
1 5 10 15	
gtt atg gcg tca gcg tcc aaa gtg atg gag ctg aac gac aag aac ttt	96
Val Met Ala Ser Ala Ser Lys Val Met Glu Leu Asn Asp Lys Asn Phe	
20 25 30	
gac gag gtg gtt ctc aac tcc gga aag acc tcg cta gtg gaa ttc tac	144
Asp Glu Val Val Leu Asn Ser Gly Lys Thr Ser Leu Val Glu Phe Tyr	
35 40 45	
gcg tcg tgg tgc agt cac tgc aag aag ttg gag cct act tgg gaa gag	192
Ala Ser Trp Cys Ser His Cys Lys Lys Leu Glu Pro Thr Trp Glu Glu	
50 55 60	
ctg gcc tcg gcg tac gga aac aag aac gat atc cag atc gtc aag atc	240
Leu Ala Ser Ala Tyr Gly Asn Lys Asn Asp Ile Gln Ile Val Lys Ile	
65 70 75 80	
gac gct gac gaa aac gga aac gtg gga aga aaa ttc gga atc aag gga	288
Asp Ala Asp Glu Asn Gly Asn Val Gly Arg Lys Phe Gly Ile Lys Gly	
85 90 95	
ttt ccc acg ctg aaa ctg ttc aaa aaa gat gat ctc aac aac cca gtg	336
Phe Pro Thr Leu Lys Leu Phe Lys Lys Asp Asp Leu Asn Asn Pro Val	
100 105 110	
gaa ttt gaa ggc tcc agg gac ttc cat tct ttc acc aac ttc att gct	384
Glu Phe Glu Gly Ser Arg Asp Phe His Ser Phe Thr Asn Phe Ile Ala	
115 120 125	
gca cac acg ggt atc aag gct gcc aac gcg gtt ccc act gag ccg tcc	432
Ala His Thr Gly Ile Lys Ala Ala Asn Ala Val Pro Thr Glu Pro Ser	
130 135 140	
aaa gtg gtg gaa ctg cac gat gga aat ttg gag gag ctt gtt aag gag	480
Lys Val Val Glu Leu His Asp Gly Asn Leu Glu Glu Leu Val Lys Glu	
145 150 155 160	
cag gga aaa aat gct ctt ttt gca atc acc gca gag tgg tgt ggt tac	528
Gln Gly Lys Asn Ala Leu Phe Ala Ile Thr Ala Glu Trp Cys Gly Tyr	

165	170	175	
tgc aag aag ctc aag cct aca tgg gag cag ctg gct gcc gtt ttc caa			576
Cys Lys Lys Leu Lys Pro Thr Trp Glu Gln Leu Ala Ala Val Phe Gln			
180	185	190	
ggc gac gag gaa aac atc ttg att gga cag gtc caa acc acc ggc gat			624
Gly Asp Glu Glu Asn Ile Leu Ile Gly Gln Val Gln Thr Thr Gly Asp			
195	200	205	
aac cca aca gaa tgg atc cag gag aaa tac aac ctc cag tcg ttc ccc			672
Asn Pro Thr Glu Trp Ile Gln Glu Lys Tyr Asn Leu Gln Ser Phe Pro			
210	215	220	
aca ata gtc ttc atc gag aag ggc aac ctg gac gag cct gtg ttc tat			720
Thr Ile Val Phe Ile Glu Lys Gly Asn Leu Asp Glu Pro Val Phe Tyr			
225	230	235	240
ccg tac gga aga gag ctg gga gac ctg gtt gag ttc gtt aac acc cag			768
Pro Tyr Gly Arg Glu Leu Gly Asp Leu Val Glu Phe Val Asn Thr Gln			
245	250	255	
gcc gga act cac cgg aac gag aaa ggc gag ctg gac tcc gag gcc ggc			816
Ala Gly Thr His Arg Asn Glu Lys Gly Glu Leu Asp Ser Glu Ala Gly			
260	265	270	
ctg ata cac gca gtc gac gag ctg gtt gag cag ttt gtc ggt tcc tcg			864
Leu Ile His Ala Val Asp Glu Leu Val Glu Gln Phe Val Gly Ser Ser			
275	280	285	
agc agc ggc aga aaa aat ctg gtt ccg aaa ttc ttg gaa gct ttg aaa			912
Ser Ser Gly Arg Lys Asn Leu Val Pro Lys Phe Leu Glu Ala Leu Lys			
290	295	300	
tcg gct gac acc gac aat gca ttg tcg aaa gaa gtg aaa tac tac aac			960
Ser Ala Asp Thr Asp Asn Ala Leu Ser Lys Glu Val Lys Tyr Tyr Asn			
305	310	315	320
aag atc atc cat acg atg gtc aac ggt ccc ttt gac ttc gtc gcg aaa			1008
Lys Ile Ile His Thr Met Val Asn Gly Pro Phe Asp Phe Val Ala Lys			
325	330	335	

gaa acc gct aga ctg gag tcg cta ctg aag tcg gat ctg tct tcc cga 1056
 Glu Thr Ala Arg Leu Glu Ser Leu Leu Lys Ser Asp Leu Ser Ser Arg
 340 345 350

gcc aga gac tca gct tcc ttt aga ctc aac atc ctc aag ttt ttc agc 1104
 Ala Arg Asp Ser Ala Ser Phe Arg Leu Asn Ile Leu Lys Phe Phe Ser
 355 360 365

gat cct gcc cct cca gcc aag gat gag ctg tga 1137
 Asp Pro Ala Pro Pro Ala Lys Asp Glu Leu
 370 375

<210> 8
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> *Ogataea minuta*

<400> 8
 Met Lys Val Thr Ser Ile Trp Gln Val Leu Phe Met Leu Ile Ala Gly
 1 5 10 15

Val Met Ala Ser Ala Ser Lys Val Met Glu Leu Asn Asp Lys Asn Phe
 20 25 30

Asp Glu Val Val Leu Asn Ser Gly Lys Thr Ser Leu Val Glu Phe Tyr
 35 40 45

Ala Ser Trp Cys Ser His Cys Lys Lys Leu Glu Pro Thr Trp Glu Glu
 50 55 60

Leu Ala Ser Ala Tyr Gly Asn Lys Asn Asp Ile Gln Ile Val Lys Ile
 65 70 75 80

Asp Ala Asp Glu Asn Gly Asn Val Gly Arg Lys Phe Gly Ile Lys Gly
 85 90 95

Phe Pro Thr Leu Lys Leu Phe Lys Lys Asp Asp Leu Asn Asn Pro Val
 100 105 110

Glu Phe Glu Gly Ser Arg Asp Phe His Ser Phe Thr Asn Phe Ile Ala
 115 120 125

Ala His Thr Gly Ile Lys Ala Ala Asn Ala Val Pro Thr Glu Pro Ser
 130 135 140

Lys Val Val Glu Leu His Asp Gly Asn Leu Glu Glu Leu Val Lys Glu
 145 150 155 160

Gln Gly Lys Asn Ala Leu Phe Ala Ile Thr Ala Glu Trp Cys Gly Tyr
 165 170 175

Cys Lys Lys Leu Lys Pro Thr Trp Glu Gln Leu Ala Ala Val Phe Gln
 180 185 190

Gly Asp Glu Glu Asn Ile Leu Ile Gly Gln Val Gln Thr Thr Gly Asp
 195 200 205

Asn Pro Thr Glu Trp Ile Gln Glu Lys Tyr Asn Leu Gln Ser Phe Pro
 210 215 220

Thr Ile Val Phe Ile Glu Lys Gly Asn Leu Asp Glu Pro Val Phe Tyr
 225 230 235 240

Pro Tyr Gly Arg Glu Leu Gly Asp Leu Val Glu Phe Val Asn Thr Gln
 245 250 255

Ala Gly Thr His Arg Asn Glu Lys Gly Glu Leu Asp Ser Glu Ala Gly
260 265 270

Leu Ile His Ala Val Asp Glu Leu Val Glu Gln Phe Val Gly Ser Ser
275 280 285

Ser Ser Gly Arg Lys Asn Leu Val Pro Lys Phe Leu Glu Ala Leu Lys
290 295 300

Ser Ala Asp Thr Asp Asn Ala Leu Ser Lys Glu Val Lys Tyr Tyr Asn
305 310 315 320

Lys Ile Ile His Thr Met Val Asn Gly Pro Phe Asp Phe Val Ala Lys
325 330 335

Glu Thr Ala Arg Leu Glu Ser Leu Leu Lys Ser Asp Leu Ser Ser Arg
340 345 350

Ala Arg Asp Ser Ala Ser Phe Arg Leu Asn Ile Leu Lys Phe Phe Ser
355 360 365

Asp Pro Ala Pro Pro Ala Lys Asp Glu Leu
370 375

<210> 9
<211> 1728
5 <212> ADN
<213> *Ogataea minuta*

<220>
<221> CDS
10 <222> (1).. (1728)

<400> 9

atg aag cac gtg ata agt ggc cga tcc cgg gtg gcg ttg ggc tgg att	48
Met Lys His Val Ile Ser Gly Arg Ser Arg Val Ala Leu Gly Trp Ile	
1 5 10 15	
ctg acg tgg ttg atc tgt gcg att tgc gct gtt ccc gga gct ggg ttg	96
Leu Thr Trp Leu Ile Cys Ala Ile Cys Ala Val Pro Gly Ala Gly Leu	
20 25 30	
cag gag att tcg tcc ttg gag agg aaa ccg gct tac ctg tcg ccg cag	144
Gln Glu Ile Ser Ser Leu Glu Arg Lys Pro Ala Tyr Leu Ser Pro Gln	
35 40 45	
tat gag tac gac aac att cac gag ttt gag tcg acg cct ttc cgc gat	192
Tyr Glu Tyr Asp Asn Ile His Glu Phe Glu Ser Thr Pro Phe Arg Asp	
50 55 60	
tac gag acg ttc acg ggg tcc aag gtg agt gag agt tcg aac gtg act	240
Tyr Glu Thr Phe Thr Gly Ser Lys Val Ser Glu Ser Ser Asn Val Thr	
65 70 75 80	
ttt ggc cag atc aac gcg ctc aac aac gaa atc aga ccg gtt ttg cac	288
Phe Gly Gln Ile Asn Ala Leu Asn Asn Glu Ile Arg Pro Val Leu His	
85 90 95	
gat ctg att aac gag aac ttc ttc aaa atc ttt cga ctc aac ctg tac	336
Asp Leu Ile Asn Glu Asn Phe Phe Lys Ile Phe Arg Leu Asn Leu Tyr	
100 105 110	
aag gag tgt ccg ttc tgg tcg agt tcg gag gga ttt tgc atg cac aag	384
Lys Glu Cys Pro Phe Trp Ser Ser Ser Glu Gly Phe Cys Met His Lys	
115 120 125	
agc tgt gcc gtg gac acc att gac gac tgg aaa gat ctt ccg gag ata	432
Ser Cys Ala Val Asp Thr Ile Asp Asp Trp Lys Asp Leu Pro Glu Ile	
130 135 140	
tgg cag ccc gag gct ctg ggt cgg atc gag tcg ttg acg cga gaa ccg	480
Trp Gln Pro Glu Ala Leu Gly Arg Ile Glu Ser Leu Thr Arg Glu Pro	
145 150 155 160	
cct acg acg ata tct gac gcg gga aat ggc tcg tgt gtc gct gca ggc	528

Pro Thr Thr Ile Ser Asp Ala Gly Asn Gly Ser Cys Val Ala Ala Gly	
165 170 175	
gga cgg agc acg cgg gat tac tgc gaa ctg gac gag gtc aac gag gac	576
Gly Arg Ser Thr Arg Asp Tyr Cys Glu Leu Asp Glu Val Asn Glu Asp	
180 185 190	
tcg gta tac gtg aat ctg gtg gac aat ccc gag aga ttc acg ggg tac	624
Ser Val Tyr Val Asn Leu Val Asp Asn Pro Glu Arg Phe Thr Gly Tyr	
195 200 205	
gga gga gat cag tcg ttc caa att tgg cgc agc att tac aac gag aac	672
Gly Gly Asp Gln Ser Phe Gln Ile Trp Arg Ser Ile Tyr Asn Glu Asn	
210 215 220	
tgt ttc aat ttg ggc tcg gat caa tgt ctc gag aag aac ttt ttc tac	720
Cys Phe Asn Leu Gly Ser Asp Gln Cys Leu Glu Lys Asn Phe Phe Tyr	
225 230 235 240	
aag ttg atc agt gga atg cac tcg tcg atc tcg act cat ctg acc aac	768
Lys Leu Ile Ser Gly Met His Ser Ser Ile Ser Thr His Leu Thr Asn	
245 250 255	
gag tac ctg aac ttc aag acc aag cag tat gga cag gat ctc aag cag	816
Glu Tyr Leu Asn Phe Lys Thr Lys Gln Tyr Gly Gln Asp Leu Lys Gln	
260 265 270	
ttc atg atc cgg gtg ggg gac ttc cct gac cgg ttc gag aac ttg tat	864
Phe Met Ile Arg Val Gly Asp Phe Pro Asp Arg Phe Glu Asn Leu Tyr	
275 280 285	
ctg aac tac gtt ctg gtg gtg aag tcc ttg atc aag ctg gag cag tcg	912
Leu Asn Tyr Val Leu Val Val Lys Ser Leu Ile Lys Leu Glu Gln Ser	
290 295 300	
ggt gtg ctg gac aac ctc cag ttc tgt gac gag gag gtg ttt cag acg	960
Gly Val Leu Asp Asn Leu Gln Phe Cys Asp Glu Glu Val Phe Gln Thr	
305 310 315 320	
aag gag aag gag cta aaa cgc gag ctg aag gag atg att tct ccg ttc	1008
Lys Glu Lys Glu Leu Lys Arg Glu Leu Lys Glu Met Ile Ser Pro Phe	
325 330 335	

tac cag ctg gcg gaa ggt ggg aaa gtg gac gag tgt ctg ttc aac gag Tyr Gln Leu Ala Glu Gly Gly Lys Val Asp Glu Cys Leu Phe Asn Glu 340 345 350	1056
cac tcg ctg ttc cag agc gag gac tcg acg tat ctg aag gac gag ttc His Ser Leu Phe Gln Ser Glu Asp Ser Thr Tyr Leu Lys Asp Glu Phe 355 360 365	1104
agt gag aac ttc agg aac gtg tcg cgg atc atg gat tgt gtc cac tgc Ser Glu Asn Phe Arg Asn Val Ser Arg Ile Met Asp Cys Val His Cys 370 375 380	1152
gac agg tgc aga ctg tgg ggg aag gtg cag acc acc ggg tac gga act Asp Arg Cys Arg Leu Trp Gly Lys Val Gln Thr Thr Gly Tyr Gly Thr 385 390 395 400	1200
gcg ctg aag att ttg ttt gag ctg gat gca agc gac agc cac gag ctg Ala Leu Lys Ile Leu Phe Glu Leu Asp Ala Ser Asp Ser His Glu Leu 405 410 415	1248
ggc aag aat ttc cag atc tcc aaa atc gag ctg gtc gcc ctg atc aac Gly Lys Asn Phe Gln Ile Ser Lys Ile Glu Leu Val Ala Leu Ile Asn 420 425 430	1296
acg ttt gac agg ctg tcc aag agc gtg cac gcc atc gga aac ttc aaa Thr Phe Asp Arg Leu Ser Lys Ser Val His Ala Ile Gly Asn Phe Lys 435 440 445	1344
caa ctg tac gat ctg aga atg aaa cag gag gaa gaa ggg ggg tcc atg Gln Leu Tyr Asp Leu Arg Met Lys Gln Glu Glu Glu Gly Gly Ser Met 450 455 460	1392
att act gca gac acg ttt gac ttg gag caa ttg ctg ttg aca gac cag Ile Thr Ala Asp Thr Phe Asp Leu Glu Gln Leu Leu Leu Thr Asp Gln 465 470 475 480	1440
acg gtg gac gta ttc ggc cag agc act tct gag cca gaa acc ccg tcg Thr Val Asp Val Phe Gly Gln Ser Thr Ser Glu Pro Glu Thr Pro Ser 485 490 495	1488
gac gtt aga tat ccc gac aga aca cgg ggc tcg ctc gtt ccc gag ggg	1536

Asp Val Arg Tyr Pro Asp Arg Thr Arg Gly Ser Leu Val Pro Glu Gly
500 505 510

ctc ggc gag gcg ttc aag aca gag ctg tac agc gtt tat cag gcg ttc 1584
Leu Gly Glu Ala Phe Lys Thr Glu Leu Tyr Ser Val Tyr Gln Ala Phe
515 520 525

tac ttt gtc gtg acc agc tac acc atg ttc ccc aag ctg atc tac aac 1632
Tyr Phe Val Val Thr Ser Tyr Thr Met Phe Pro Lys Leu Ile Tyr Asn
530 535 540

tac ctg ctg atc cgg gtg gtg tac tgg tgg aac atc ttt gtg ggt cat 1680
Tyr Leu Leu Ile Arg Val Val Tyr Trp Trp Asn Ile Phe Val Gly His
545 550 555 560

gta cac gag gac ttt gac gtg gat cgc ctg tat cgt ttg gag cta taa 1728
Val His Glu Asp Phe Asp Val Asp Arg Leu Tyr Arg Leu Glu Leu
565 570 575

<210> 10
<211> 575
<212> PRT
<213> *Ogataea minuta*

<400> 10
Met Lys His Val Ile Ser Gly Arg Ser Arg Val Ala Leu Gly Trp Ile
1 5 10 15

Leu Thr Trp Leu Ile Cys Ala Ile Cys Ala Val Pro Gly Ala Gly Leu
20 25 30

Gln Glu Ile Ser Ser Leu Glu Arg Lys Pro Ala Tyr Leu Ser Pro Gln
35 40 45

Tyr Glu Tyr Asp Asn Ile His Glu Phe Glu Ser Thr Pro Phe Arg Asp
50 55 60

Tyr Glu Thr Phe Thr Gly Ser Lys Val Ser Glu Ser Ser Asn Val Thr
65 70 75 80

Phe Gly Gln Ile Asn Ala Leu Asn Asn Glu Ile Arg Pro Val Leu His
85 90 95

Asp Leu Ile Asn Glu Asn Phe Phe Lys Ile Phe Arg Leu Asn Leu Tyr
100 105 110

Lys Glu Cys Pro Phe Trp Ser Ser Ser Glu Gly Phe Cys Met His Lys
115 120 125

Ser Cys Ala Val Asp Thr Ile Asp Asp Trp Lys Asp Leu Pro Glu Ile
130 135 140

Trp Gln Pro Glu Ala Leu Gly Arg Ile Glu Ser Leu Thr Arg Glu Pro
145 150 155 160

Pro Thr Thr Ile Ser Asp Ala Gly Asn Gly Ser Cys Val Ala Ala Gly
165 170 175

Gly Arg Ser Thr Arg Asp Tyr Cys Glu Leu Asp Glu Val Asn Glu Asp
180 185 190

Ser Val Tyr Val Asn Leu Val Asp Asn Pro Glu Arg Phe Thr Gly Tyr
195 200 205

Gly Gly Asp Gln Ser Phe Gln Ile Trp Arg Ser Ile Tyr Asn Glu Asn
210 215 220

Cys Phe Asn Leu Gly Ser Asp Gln Cys Leu Glu Lys Asn Phe Phe Tyr

225	230	235	240
Lys Leu Ile Ser Gly Met His Ser Ser Ile Ser Thr His Leu Thr Asn			
	245	250	255
Glu Tyr Leu Asn Phe Lys Thr Lys Gln Tyr Gly Gln Asp Leu Lys Gln			
	260	265	270
Phe Met Ile Arg Val Gly Asp Phe Pro Asp Arg Phe Glu Asn Leu Tyr			
	275	280	285
Leu Asn Tyr Val Leu Val Val Lys Ser Leu Ile Lys Leu Glu Gln Ser			
	290	295	300
Gly Val Leu Asp Asn Leu Gln Phe Cys Asp Glu Glu Val Phe Gln Thr			
305	310	315	320
Lys Glu Lys Glu Leu Lys Arg Glu Leu Lys Glu Met Ile Ser Pro Phe			
	325	330	335
Tyr Gln Leu Ala Glu Gly Gly Lys Val Asp Glu Cys Leu Phe Asn Glu			
	340	345	350
His Ser Leu Phe Gln Ser Glu Asp Ser Thr Tyr Leu Lys Asp Glu Phe			
	355	360	365
Ser Glu Asn Phe Arg Asn Val Ser Arg Ile Met Asp Cys Val His Cys			
	370	375	380
Asp Arg Cys Arg Leu Trp Gly Lys Val Gln Thr Thr Gly Tyr Gly Thr			
385	390	395	400

Ala Leu Lys Ile Leu Phe Glu Leu Asp Ala Ser Asp Ser His Glu Leu
405 410 415

Gly Lys Asn Phe Gln Ile Ser Lys Ile Glu Leu Val Ala Leu Ile Asn
420 425 430

Thr Phe Asp Arg Leu Ser Lys Ser Val His Ala Ile Gly Asn Phe Lys
435 440 445

Gln Leu Tyr Asp Leu Arg Met Lys Gln Glu Glu Glu Gly Gly Ser Met
450 455 460

Ile Thr Ala Asp Thr Phe Asp Leu Glu Gln Leu Leu Leu Thr Asp Gln
465 470 475 480

Thr Val Asp Val Phe Gly Gln Ser Thr Ser Glu Pro Glu Thr Pro Ser
485 490 495

Asp Val Arg Tyr Pro Asp Arg Thr Arg Gly Ser Leu Val Pro Glu Gly
500 505 510

Leu Gly Glu Ala Phe Lys Thr Glu Leu Tyr Ser Val Tyr Gln Ala Phe
515 520 525

Tyr Phe Val Val Thr Ser Tyr Thr Met Phe Pro Lys Leu Ile Tyr Asn
530 535 540

Tyr Leu Leu Ile Arg Val Val Tyr Trp Trp Asn Ile Phe Val Gly His
545 550 555 560

Val His Glu Asp Phe Asp Val Asp Arg Leu Tyr Arg Leu Glu Leu
565 570 575

<210> 11
 <211> 2700
 <212> ADN
 <213> *Ogataea minuta*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2700)

10

<400> 11
 atg gat tct acg caa ttt aca gac aga gct cta gac ata gtg acg acg 48
 Met Asp Ser Thr Gln Phe Thr Asp Arg Ala Leu Asp Ile Val Thr Thr
 1 5 10 15

 gct cag aag cta tgt cag cag aac tca aac gca cag ata gtg cca ttg 96
 Ala Gln Lys Leu Cys Gln Gln Asn Ser Asn Ala Gln Ile Val Pro Leu
 20 25 30

 cac ttt ctg gcg gca atg act ccg acc tcc agt gag ggg gag gca atc 144
 His Phe Leu Ala Ala Met Thr Pro Thr Ser Ser Glu Gly Glu Ala Ile
 35 40 45

 tat ctc aag acg ttg att gag aga ggt cga ttt gac tgg act gct ttt 192
 Tyr Leu Lys Thr Leu Ile Glu Arg Gly Arg Phe Asp Trp Thr Ala Phe
 50 55 60

 gaa aga gcc gtt aat aaa gca gtg gtg cgg ctc cca agc gtg gcc ggt 240
 Glu Arg Ala Val Asn Lys Ala Val Val Arg Leu Pro Ser Val Ala Gly
 65 70 75 80

 tcc aac acc gag cca agc att tcc gcc tcc gcc gcc agc att atc acc 288
 Ser Asn Thr Glu Pro Ser Ile Ser Ala Ser Ala Ala Ser Ile Ile Thr
 85 90 95

 aac gca tcc aag atc aag gca cag cag aaa gac tcg tac atc ggc caa 336
 Asn Ala Ser Lys Ile Lys Ala Gln Gln Lys Asp Ser Tyr Ile Gly Gln
 100 105 110

gac cac att ctc tcg gcc ctt ttg gac gat tct agt atc cag gct gtg Asp His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Asp Asp Ser Ser Ile Gln Ala Val 115 120 125	384
ctg aag gaa gcg aac gtc aag ccc gac gca ttg aag aca cag atc gtt Leu Lys Glu Ala Asn Val Lys Pro Asp Ala Leu Lys Thr Gln Ile Val 130 135 140	432
gaa ctc aga ggc aat cag aga att gat tct cgt caa gct gat tcg tct Glu Leu Arg Gly Asn Gln Arg Ile Asp Ser Arg Gln Ala Asp Ser Ser 145 150 155 160	480
cag aag ttt gag ttt ctg tcc aag tac gcc ctt gat ctt acc gag cag Gln Lys Phe Glu Phe Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Asp Leu Thr Glu Gln 165 170 175	528
gcg ttg cag ggt aag att gac cct gtg ata ggc aga gag gag gag atc Ala Leu Gln Gly Lys Ile Asp Pro Val Ile Gly Arg Glu Glu Glu Ile 180 185 190	576
aga agg gcc att cgg gtt ctt tcg aga cgg gcc aag tcg aac ccg tgt Arg Arg Ala Ile Arg Val Leu Ser Arg Arg Ala Lys Ser Asn Pro Cys 195 200 205	624
ctg att gga gat cct ggt gtt ggt aag act agt att gtt gag gga gtc Leu Ile Gly Asp Pro Gly Val Gly Lys Thr Ser Ile Val Glu Gly Val 210 215 220	672
gca cag agg ata gtg gac aac gat gtt cct acc gtt tta cag ggg tgc Ala Gln Arg Ile Val Asp Asn Asp Val Pro Thr Val Leu Gln Gly Cys 225 230 235 240	720
aag ctg tac tcg ctg gac ttg ggt gcg ttg aaa gcg gga gcc aag tac Lys Leu Tyr Ser Leu Asp Leu Gly Ala Leu Lys Ala Gly Ala Lys Tyr 245 250 255	768
cag ggt gag ttc gag gaa aga ttg aag gga gtt ttg agc gac atc gaa Gln Gly Glu Phe Glu Glu Arg Leu Lys Gly Val Leu Ser Asp Ile Glu 260 265 270	816
agc tcg aac tcg atg atc atc ttg ttc atc gac gag atc cac atg ttg Ser Ser Asn Ser Met Ile Ile Leu Phe Ile Asp Glu Ile His Met Leu	864

275	280	285	
atg ggc gat gga aag tcg gac gct gcc aac ttg ctg aag cct gct ctg			912
Met Gly Asp Gly Lys Ser Asp Ala Ala Asn Leu Leu Lys Pro Ala Leu			
290	295	300	
gcg aga ggt cag ttc cac tgc atc ggt gcg act acc gtg acc gag tac			960
Ala Arg Gly Gln Phe His Cys Ile Gly Ala Thr Thr Val Thr Glu Tyr			
305	310	315	320
aga aag cac atc gag aag gac ggt gct ttc gag aga aga ttt cag aga			1008
Arg Lys His Ile Glu Lys Asp Gly Ala Phe Glu Arg Arg Phe Gln Arg			
325	330	335	
atc gac gtg aga gag ccg acc atc aga gaa acc gtt gcc att ctc aga			1056
Ile Asp Val Arg Glu Pro Thr Ile Arg Glu Thr Val Ala Ile Leu Arg			
340	345	350	
gga ctg cag cca agg tac gag atc cac cac ggt gtc cga atc ctg gac			1104
Gly Leu Gln Pro Arg Tyr Glu Ile His His Gly Val Arg Ile Leu Asp			
355	360	365	
agt gcc ctg gtg acg gct gct caa ctg gcc tcc aga tac ctc acc tac			1152
Ser Ala Leu Val Thr Ala Ala Gln Leu Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Tyr			
370	375	380	
aga aag ctt ccg gac tct gca gtg gat ctg att gac gag tcc gcc gcg			1200
Arg Lys Leu Pro Asp Ser Ala Val Asp Leu Ile Asp Glu Ser Ala Ala			
385	390	395	400
gga gtc gct gtt gcc agg gac tcc aag ccg gag gag ctg gac tcc aag			1248
Gly Val Ala Val Ala Arg Asp Ser Lys Pro Glu Glu Leu Asp Ser Lys			
405	410	415	
gag aga cag cta cag ctg atc gag gtt gag atc aat gct ctg gaa aga			1296
Glu Arg Gln Leu Gln Leu Ile Glu Val Glu Ile Asn Ala Leu Glu Arg			
420	425	430	
gac cag gac gcc gac acg tcc acc aag gag aga ctg gag cag gcc aga			1344
Asp Gln Asp Ala Asp Thr Ser Thr Lys Glu Arg Leu Glu Gln Ala Arg			
435	440	445	

cag aga aga cag aac ctg gag gaa gag ctg gct cca ttg agg gag aag	1392
Gln Arg Arg Gln Asn Leu Glu Glu Glu Leu Ala Pro Leu Arg Glu Lys	
450 455 460	
tac cag cag gaa aga gcg ggc cac gag gag ctg act gct gcc aag aga	1440
Tyr Gln Gln Glu Arg Ala Gly His Glu Glu Leu Thr Ala Ala Lys Arg	
465 470 475 480	
aag tta gac gac ctc gaa gtt aag gcg caa gat gcg gag aga aga cac	1488
Lys Leu Asp Asp Leu Glu Val Lys Ala Gln Asp Ala Glu Arg Arg His	
485 490 495	
gac tct cag acc att gcg gac ctg cgg atg ttt gcc att ccg gac gtg	1536
Asp Ser Gln Thr Ile Ala Asp Leu Arg Met Phe Ala Ile Pro Asp Val	
500 505 510	
aaa cgc aga att gag gag ttg gaa cag aaa gtg gtt gaa gaa gag gcc	1584
Lys Arg Arg Ile Glu Glu Leu Glu Gln Lys Val Val Glu Glu Glu Ala	
515 520 525	
act tct gaa gat ttc atg gtg aag aac gtt gtt ggt tcg gag caa gtt	1632
Thr Ser Glu Asp Phe Met Val Lys Asn Val Val Gly Ser Glu Gln Val	
530 535 540	
tcc gag acc gcg gcc agg ttg acc ggt att ccg gtc agc aag ctg acg	1680
Ser Glu Thr Ala Ala Arg Leu Thr Gly Ile Pro Val Ser Lys Leu Thr	
545 550 555 560	
cag gca gaa aat gct aag ctg atc acc atg gag aag gag ctg tcc gct	1728
Gln Ala Glu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Met Glu Lys Glu Leu Ser Ala	
565 570 575	
gcc gtt gtc gga cag ggc gag gct gtc aag gct gtt tcg aac tcg atc	1776
Ala Val Val Gly Gln Gly Glu Ala Val Lys Ala Val Ser Asn Ser Ile	
580 585 590	
aga ttg tcg aga tct ggt ctg gcc aat cct aac cag ccg gcc tcg ttc	1824
Arg Leu Ser Arg Ser Gly Leu Ala Asn Pro Asn Gln Pro Ala Ser Phe	
595 600 605	
ctg ttc ctg gga ctc tcg ggt tcc ggt aag acg gag ctg gcc aaa aag	1872
Leu Phe Leu Gly Leu Ser Gly Ser Gly Lys Thr Glu Leu Ala Lys Lys	

610	615	620	
ctg gca ggg ttc ctg ttc tcg gat gag aag gcc atg atc aga atc gac			1920
Leu Ala Gly Phe Leu Phe Ser Asp Glu Lys Ala Met Ile Arg Ile Asp			
625	630	635	640
tgt tca gaa ctg atg gag aag tac tcg gtt tcc aag ctg ctg ggc tcc			1968
Cys Ser Glu Leu Met Glu Lys Tyr Ser Val Ser Lys Leu Leu Gly Ser			
645	650	655	
acc gcc ggt tac gtt ggc tac gag gag ggt ggt atg ttg acc aac cag			2016
Thr Ala Gly Tyr Val Gly Tyr Glu Glu Gly Gly Met Leu Thr Asn Gln			
660	665	670	
ctt ttg aga aga ccg tac tct gtg gtg ttg ttc gac gag gtc gag aag			2064
Leu Leu Arg Arg Pro Tyr Ser Val Val Leu Phe Asp Glu Val Glu Lys			
675	680	685	
gcc gct ccc gag gtg ctg aac att ctc ctg cag atg ttg gac gac gga			2112
Ala Ala Pro Glu Val Leu Asn Ile Leu Leu Gln Met Leu Asp Asp Gly			
690	695	700	
aga atc acc gcc gcc aac ggt act ctc gtc aac tgc tcg aac gct atc			2160
Arg Ile Thr Ala Ala Asn Gly Thr Leu Val Asn Cys Ser Asn Ala Ile			
705	710	715	720
gtg atc atg acg tcc aac ctc ggc gcg gag tac atc aac gca tca aag			2208
Val Ile Met Thr Ser Asn Leu Gly Ala Glu Tyr Ile Asn Ala Ser Lys			
725	730	735	
gga acg aag gtg acc gac gag gtc aga agc ctg gtg atg aac act gtc			2256
Gly Thr Lys Val Thr Asp Glu Val Arg Ser Leu Val Met Asn Thr Val			
740	745	750	
aag gga cat ttc aga ccg gag ttc ctc aac aga atc tcg gcc acc gtg			2304
Lys Gly His Phe Arg Pro Glu Phe Leu Asn Arg Ile Ser Ala Thr Val			
755	760	765	
gtg ttc aac aga ctc tcc aga cat gcc atc gcc aag atc gtg cgg ctg			2352
Val Phe Asn Arg Leu Ser Arg His Ala Ile Ala Lys Ile Val Arg Leu			
770	775	780	

aga ctg aag gaa atc gaa gag agg ttc gag gcc aac ggc aag tcg atc 2400
 Arg Leu Lys Glu Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ser Ile
 785 790 795 800

aaa ctg aac gtg gac gat ggg gca ctc gag tac ctg tgc aaa aag gga 2448
 Lys Leu Asn Val Asp Asp Gly Ala Leu Glu Tyr Leu Cys Lys Lys Gly
 805 810 815

tac tct ccc gac ttg ggc gct aga ccg ctg aac aga ctg atc cag agt 2496
 Tyr Ser Pro Asp Leu Gly Ala Arg Pro Leu Asn Arg Leu Ile Gln Ser
 820 825 830

gaa atc ctg aac cat ctg gcg gtg atg gtg ttg aac gga cag gtg ttg 2544
 Glu Ile Leu Asn His Leu Ala Val Met Val Leu Asn Gly Gln Val Leu
 835 840 845

gac aaa gag gaa gtt cag att acg acg ggc agc aag gga ctg tct gtg 2592
 Asp Lys Glu Glu Val Gln Ile Thr Thr Gly Ser Lys Gly Leu Ser Val
 850 855 860

gtt cct aac cat gac atc gag gac gaa gct atg gac gtg gac gtg gac 2640
 Val Pro Asn His Asp Ile Glu Asp Glu Ala Met Asp Val Asp Val Asp
 865 870 875 880

gag tgg acc gac gcc gcc gac gac gac gac tcg ggc tac ggc agt cct 2688
 Glu Trp Thr Asp Ala Ala Asp Asp Asp Asp Ser Gly Tyr Gly Ser Pro
 885 890 895

gat ctc gat taa 2700
 Asp Leu Asp

<210> 12
 <211> 899
 <212> PRT
 <213> *Ogataea minuta*

<400> 12
 Met Asp Ser Thr Gln Phe Thr Asp Arg Ala Leu Asp Ile Val Thr Thr
 1 5 10 15

Ala Gln Lys Leu Cys Gln Gln Asn Ser Asn Ala Gln Ile Val Pro Leu
20 25 30

His Phe Leu Ala Ala Met Thr Pro Thr Ser Ser Glu Gly Glu Ala Ile
35 40 45

Tyr Leu Lys Thr Leu Ile Glu Arg Gly Arg Phe Asp Trp Thr Ala Phe
50 55 60

Glu Arg Ala Val Asn Lys Ala Val Val Arg Leu Pro Ser Val Ala Gly
65 70 75 80

Ser Asn Thr Glu Pro Ser Ile Ser Ala Ser Ala Ala Ser Ile Ile Thr
85 90 95

Asn Ala Ser Lys Ile Lys Ala Gln Gln Lys Asp Ser Tyr Ile Gly Gln
100 105 110

Asp His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Asp Asp Ser Ser Ile Gln Ala Val
115 120 125

Leu Lys Glu Ala Asn Val Lys Pro Asp Ala Leu Lys Thr Gln Ile Val
130 135 140

Glu Leu Arg Gly Asn Gln Arg Ile Asp Ser Arg Gln Ala Asp Ser Ser
145 150 155 160

Gln Lys Phe Glu Phe Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Asp Leu Thr Glu Gln
165 170 175

Ala Leu Gln Gly Lys Ile Asp Pro Val Ile Gly Arg Glu Glu Glu Ile
180 185 190

Arg Arg Ala Ile Arg Val Leu Ser Arg Arg Ala Lys Ser Asn Pro Cys
195 200 205

Leu Ile Gly Asp Pro Gly Val Gly Lys Thr Ser Ile Val Glu Gly Val
210 215 220

Ala Gln Arg Ile Val Asp Asn Asp Val Pro Thr Val Leu Gln Gly Cys
225 230 235 240

Lys Leu Tyr Ser Leu Asp Leu Gly Ala Leu Lys Ala Gly Ala Lys Tyr
245 250 255

Gln Gly Glu Phe Glu Glu Arg Leu Lys Gly Val Leu Ser Asp Ile Glu
260 265 270

Ser Ser Asn Ser Met Ile Ile Leu Phe Ile Asp Glu Ile His Met Leu
275 280 285

Met Gly Asp Gly Lys Ser Asp Ala Ala Asn Leu Leu Lys Pro Ala Leu
290 295 300

Ala Arg Gly Gln Phe His Cys Ile Gly Ala Thr Thr Val Thr Glu Tyr
305 310 315 320

Arg Lys His Ile Glu Lys Asp Gly Ala Phe Glu Arg Arg Phe Gln Arg
325 330 335

Ile Asp Val Arg Glu Pro Thr Ile Arg Glu Thr Val Ala Ile Leu Arg
340 345 350

Gly Leu Gln Pro Arg Tyr Glu Ile His His Gly Val Arg Ile Leu Asp
 355 360 365

Ser Ala Leu Val Thr Ala Ala Gln Leu Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Tyr
 370 375 380

Arg Lys Leu Pro Asp Ser Ala Val Asp Leu Ile Asp Glu Ser Ala Ala
 385 390 395 400

Gly Val Ala Val Ala Arg Asp Ser Lys Pro Glu Glu Leu Asp Ser Lys
 405 410 415

Glu Arg Gln Leu Gln Leu Ile Glu Val Glu Ile Asn Ala Leu Glu Arg
 420 425 430

Asp Gln Asp Ala Asp Thr Ser Thr Lys Glu Arg Leu Glu Gln Ala Arg
 435 440 445

Gln Arg Arg Gln Asn Leu Glu Glu Glu Leu Ala Pro Leu Arg Glu Lys
 450 455 460

Tyr Gln Gln Glu Arg Ala Gly His Glu Glu Leu Thr Ala Ala Lys Arg
 465 470 475 480

Lys Leu Asp Asp Leu Glu Val Lys Ala Gln Asp Ala Glu Arg Arg His
 485 490 495

Asp Ser Gln Thr Ile Ala Asp Leu Arg Met Phe Ala Ile Pro Asp Val
 500 505 510

Lys Arg Arg Ile Glu Glu Leu Glu Gln Lys Val Val Glu Glu Glu Ala
515 520 525

Thr Ser Glu Asp Phe Met Val Lys Asn Val Val Gly Ser Glu Gln Val
530 535 540

Ser Glu Thr Ala Ala Arg Leu Thr Gly Ile Pro Val Ser Lys Leu Thr
545 550 555 560

Gln Ala Glu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Met Glu Lys Glu Leu Ser Ala
565 570 575

Ala Val Val Gly Gln Gly Glu Ala Val Lys Ala Val Ser Asn Ser Ile
580 585 590

Arg Leu Ser Arg Ser Gly Leu Ala Asn Pro Asn Gln Pro Ala Ser Phe
595 600 605

Leu Phe Leu Gly Leu Ser Gly Ser Gly Lys Thr Glu Leu Ala Lys Lys
610 615 620

Leu Ala Gly Phe Leu Phe Ser Asp Glu Lys Ala Met Ile Arg Ile Asp
625 630 635 640

Cys Ser Glu Leu Met Glu Lys Tyr Ser Val Ser Lys Leu Leu Gly Ser
645 650 655

Thr Ala Gly Tyr Val Gly Tyr Glu Glu Gly Gly Met Leu Thr Asn Gln
660 665 670

Leu Leu Arg Arg Pro Tyr Ser Val Val Leu Phe Asp Glu Val Glu Lys
675 680 685

Ala Ala Pro Glu Val Leu Asn Ile Leu Leu Gln Met Leu Asp Asp Gly
690 695 700

Arg Ile Thr Ala Ala Asn Gly Thr Leu Val Asn Cys Ser Asn Ala Ile
705 710 715 720

Val Ile Met Thr Ser Asn Leu Gly Ala Glu Tyr Ile Asn Ala Ser Lys
725 730 735

Gly Thr Lys Val Thr Asp Glu Val Arg Ser Leu Val Met Asn Thr Val
740 745 750

Lys Gly His Phe Arg Pro Glu Phe Leu Asn Arg Ile Ser Ala Thr Val
755 760 765

Val Phe Asn Arg Leu Ser Arg His Ala Ile Ala Lys Ile Val Arg Leu
770 775 780

Arg Leu Lys Glu Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ser Ile
785 790 795 800

Lys Leu Asn Val Asp Asp Gly Ala Leu Glu Tyr Leu Cys Lys Lys Gly
805 810 815

Tyr Ser Pro Asp Leu Gly Ala Arg Pro Leu Asn Arg Leu Ile Gln Ser
820 825 830

Glu Ile Leu Asn His Leu Ala Val Met Val Leu Asn Gly Gln Val Leu
835 840 845

Asp Lys Glu Glu Val Gln Ile Thr Thr Gly Ser Lys Gly Leu Ser Val
850 855 860

Val Pro Asn His Asp Ile Glu Asp Glu Ala Met Asp Val Asp Val Asp
865 870 875 880

Glu Trp Thr Asp Ala Ala Asp Asp Asp Ser Gly Tyr Gly Ser Pro
885 890 895

Asp Leu Asp

<210> 13
<211> 1998
5 <212> ADN
<213> *Ogataea minuta*

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(1998)

<400> 13
atg ttt aag ttc aac cgc tct gtg cta tct ata gct acg ata ctg tat 48
Met Phe Lys Phe Asn Arg Ser Val Leu Ser Ile Ala Thr Ile Leu Tyr
1 5 10 15

gca gtg ctg ttg gta gtc cta cct ttg gct tca caa caa ttc gtg gaa 96
Ala Val Leu Leu Val Val Leu Pro Leu Ala Ser Gln Gln Phe Val Glu
20 25 30

gca gag gcg aac gac aac tat ggt act gtt atc ggt atc gat ttg gga 144
Ala Glu Ala Asn Asp Asn Tyr Gly Thr Val Ile Gly Ile Asp Leu Gly
35 40 45

acc act tac tca tgt gtg ggt gtg atg aaa gct ggt aga gtt gag atc 192
Thr Thr Tyr Ser Cys Val Gly Val Met Lys Ala Gly Arg Val Glu Ile
50 55 60

ctt gcc aat gac cag ggt aac aga att act cca tct tat gtg gca ttt	240
Leu Ala Asn Asp Gln Gly Asn Arg Ile Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe	
65 70 75 80	
act gat gaa gag aga ctt gtc gga gat gcc gca aag aac cag att gcc	288
Thr Asp Glu Glu Arg Leu Val Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Ile Ala	
85 90 95	
tcc aac cca agc aac aca atc ttc gat atc aag aga ctc ata gga cac	336
Ser Asn Pro Ser Asn Thr Ile Phe Asp Ile Lys Arg Leu Ile Gly His	
100 105 110	
aga ttt gac gat aag gtt gtg caa aaa gag att gca cac ctc cct tac	384
Arg Phe Asp Asp Lys Val Val Gln Lys Glu Ile Ala His Leu Pro Tyr	
115 120 125	
aag atc aga aac caa gag ggc aga ccg gtc gtt gag gcc act gtc aat	432
Lys Ile Arg Asn Gln Glu Gly Arg Pro Val Val Glu Ala Thr Val Asn	
130 135 140	
gga gag gtg acc acg ttc acg gcc gaa gaa gtt tcg gcc atg atc ttg	480
Gly Glu Val Thr Thr Phe Thr Ala Glu Glu Val Ser Ala Met Ile Leu	
145 150 155 160	
gga aag atg aag caa att gct gaa gat tat ctc gga aag aag gtt acc	528
Gly Lys Met Lys Gln Ile Ala Glu Asp Tyr Leu Gly Lys Lys Val Thr	
165 170 175	
cat gct gtt gtc acg gtt cct gca tac ttt aac gac gcc caa aga cag	576
His Ala Val Val Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ala Gln Arg Gln	
180 185 190	
gcc act aag gat gct ggt acc att gcc ggt ctg gaa gtt ttg aga att	624
Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly Leu Glu Val Leu Arg Ile	
195 200 205	
gtt aac gag cct act gcc gct gca att gct tac ggt ctc gac aag acg	672
Val Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Lys Thr	
210 215 220	
gac gaa gag aag cat atc att gtt tac gat ttg ggt gga gga act ttt	720

Asp Glu Glu Lys His Ile Ile Val Tyr Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe		
225	230	235 240
gat gtt tct ctg ttg aca att gca ggt gga gct ttc gag gtt cgt gcc		768
Asp Val Ser Leu Leu Thr Ile Ala Gly Gly Ala Phe Glu Val Arg Ala		
245	250	255
acc gct ggt gat acc cat ctt ggt ggt gag gac ttt gat tac aga gtt		816
Thr Ala Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Tyr Arg Val		
260	265	270
gtc aga cat ttc atc aag gtg ttt aag aag aag cat ggc att gat atc		864
Val Arg His Phe Ile Lys Val Phe Lys Lys Lys His Gly Ile Asp Ile		
275	280	285
agt gat aat cca aag gct ctt gct aaa ttg aag aga gaa gtt gaa aaa		912
Ser Asp Asn Pro Lys Ala Leu Ala Lys Leu Lys Arg Glu Val Glu Lys		
290	295	300
gct aag aga acc ttg tct tct caa atg tcc acc aga att gag att gac		960
Ala Lys Arg Thr Leu Ser Ser Gln Met Ser Thr Arg Ile Glu Ile Asp		
305	310	315 320
tcg ttc gct gac ggt att gac ttc tcc gag tcc tta tcc agg gcc aag		1008
Ser Phe Ala Asp Gly Ile Asp Phe Ser Glu Ser Leu Ser Arg Ala Lys		
325	330	335
ttc gag gaa ttg aac att gag ttg ttc aaa aag acc ttg aag cct gtt		1056
Phe Glu Glu Leu Asn Ile Glu Leu Phe Lys Lys Thr Leu Lys Pro Val		
340	345	350
caa cgt gtt ctt gaa gac gcc aaa ttc aag gtt tca gaa att gat gac		1104
Gln Arg Val Leu Glu Asp Ala Lys Phe Lys Val Ser Glu Ile Asp Asp		
355	360	365
att gtc ttg gtt ggt ggt tcc acg aga att cca aag gtg caa gag ttg		1152
Ile Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Glu Leu		
370	375	380
ctg gaa agt tac ttc aac ggc aag caa gtg tcc aag gga att aac cca		1200
Leu Glu Ser Tyr Phe Asn Gly Lys Gln Val Ser Lys Gly Ile Asn Pro		
385	390	395 400

gat gaa gct gtt gct tac ggt gcg gct gtt caa gct ggt gtc ctc tct	1248
Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Gly Val Leu Ser	
405 410 415	
ggt gaa gaa ggc gtt gaa gac att gtt ttg att gat gtg aat cca tta	1296
Gly Glu Glu Gly Val Glu Asp Ile Val Leu Ile Asp Val Asn Pro Leu	
420 425 430	
act ttg ggt atc gag acc tcc ggc ggt gtc atg acc act ttg att aag	1344
Thr Leu Gly Ile Glu Thr Ser Gly Gly Val Met Thr Thr Leu Ile Lys	
435 440 445	
aga aac act gca att cca acc aag aag tct caa att ttc tct act gct	1392
Arg Asn Thr Ala Ile Pro Thr Lys Lys Ser Gln Ile Phe Ser Thr Ala	
450 455 460	
gct gac aat caa cct gtt gtc ttg atc caa gtc tat gaa ggt gag aga	1440
Ala Asp Asn Gln Pro Val Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg	
465 470 475 480	
gcc atg gca aag gat aac aat ttg cta gga aag ttc gag ttg aag gat	1488
Ala Met Ala Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Lys Phe Glu Leu Lys Asp	
485 490 495	
att cct cca gcc cca aga ggt acc cca caa att gag gtg act ttc act	1536
Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Thr Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Thr	
500 505 510	
ctg gac tcc aac gga atc ctg aag gtt gct gcc act gat aaa ggt act	1584
Leu Asp Ser Asn Gly Ile Leu Lys Val Ala Ala Thr Asp Lys Gly Thr	
515 520 525	
ggt aag tct aac tct atc aca atc aca aac gac aag ggt aga ctt tcg	1632
Gly Lys Ser Asn Ser Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser	
530 535 540	
aag gag gag att gag aag aag gtt gag gag gcc gaa cag tat gct caa	1680
Lys Glu Glu Ile Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Gln Tyr Ala Gln	
545 550 555 560	
caa gat aag gag gtc aga gag aag atc gag agc aga aac gga ctt gag	1728

Gln Asp Lys Glu Val Arg Glu Lys Ile Glu Ser Arg Asn Gly Leu Glu
565 570 575

aac tac gcc cac tcg ttg aaa aac caa gtg aac gat gag acc gga ttc 1776
Asn Tyr Ala His Ser Leu Lys Asn Gln Val Asn Asp Glu Thr Gly Phe
580 585 590

ggc tcc aag ctt gat gag gat gac aag gaa act ttg ttg gat gcc atc 1824
Gly Ser Lys Leu Asp Glu Asp Asp Lys Glu Thr Leu Leu Asp Ala Ile
595 600 605

aac gag gca ttg gag tac ttg gac gac aac ttt gag acc gca aca aag 1872
Asn Glu Ala Leu Glu Tyr Leu Asp Asp Asn Phe Glu Thr Ala Thr Lys
610 615 620

caa gac ttt gag gat cag aag gaa aaa ttg agt aag gtt gct tac cca 1920
Gln Asp Phe Glu Asp Gln Lys Glu Lys Leu Ser Lys Val Ala Tyr Pro
625 630 635 640

att act tca aag ttg tat gat acg cca cct act agt gac gaa gat gat 1968
Ile Thr Ser Lys Leu Tyr Asp Thr Pro Pro Thr Ser Asp Glu Asp Asp
645 650 655

gag gat gac tgg gat cat gat gag ctg tga 1998
Glu Asp Asp Trp Asp His Asp Glu Leu
660 665

<210> 14
<211> 665
5 <212> PRT
<213> *Ogataea minuta*

<400> 14
Met Phe Lys Phe Asn Arg Ser Val Leu Ser Ile Ala Thr Ile Leu Tyr
1 5 10 15

Ala Val Leu Leu Val Val Leu Pro Leu Ala Ser Gln Gln Phe Val Glu
20 25 30

Ala Glu Ala Asn Asp Asn Tyr Gly Thr Val Ile Gly Ile Asp Leu Gly
35 40 45

Thr Thr Tyr Ser Cys Val Gly Val Met Lys Ala Gly Arg Val Glu Ile
50 55 60

Leu Ala Asn Asp Gln Gly Asn Arg Ile Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe
65 70 75 80

Thr Asp Glu Glu Arg Leu Val Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Ile Ala
85 90 95

Ser Asn Pro Ser Asn Thr Ile Phe Asp Ile Lys Arg Leu Ile Gly His
100 105 110

Arg Phe Asp Asp Lys Val Val Gln Lys Glu Ile Ala His Leu Pro Tyr
115 120 125

Lys Ile Arg Asn Gln Glu Gly Arg Pro Val Val Glu Ala Thr Val Asn
130 135 140

Gly Glu Val Thr Thr Phe Thr Ala Glu Glu Val Ser Ala Met Ile Leu
145 150 155 160

Gly Lys Met Lys Gln Ile Ala Glu Asp Tyr Leu Gly Lys Lys Val Thr
165 170 175

His Ala Val Val Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ala Gln Arg Gln
180 185 190

Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly Leu Glu Val Leu Arg Ile

195	200	205
Val Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Lys Thr		
210	215	220
Asp Glu Glu Lys His Ile Ile Val Tyr Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe		
225	230	235 240
Asp Val Ser Leu Leu Thr Ile Ala Gly Gly Ala Phe Glu Val Arg Ala		
245	250	255
Thr Ala Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Tyr Arg Val		
260	265	270
Val Arg His Phe Ile Lys Val Phe Lys Lys Lys His Gly Ile Asp Ile		
275	280	285
Ser Asp Asn Pro Lys Ala Leu Ala Lys Leu Lys Arg Glu Val Glu Lys		
290	295	300
Ala Lys Arg Thr Leu Ser Ser Gln Met Ser Thr Arg Ile Glu Ile Asp		
305	310	315 320
Ser Phe Ala Asp Gly Ile Asp Phe Ser Glu Ser Leu Ser Arg Ala Lys		
325	330	335
Phe Glu Glu Leu Asn Ile Glu Leu Phe Lys Lys Thr Leu Lys Pro Val		
340	345	350
Gln Arg Val Leu Glu Asp Ala Lys Phe Lys Val Ser Glu Ile Asp Asp		
355	360	365

Ile Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Glu Leu
370 375 380

Leu Glu Ser Tyr Phe Asn Gly Lys Gln Val Ser Lys Gly Ile Asn Pro
385 390 395 400

Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Gly Val Leu Ser
405 410 415

Gly Glu Glu Gly Val Glu Asp Ile Val Leu Ile Asp Val Asn Pro Leu
420 425 430

Thr Leu Gly Ile Glu Thr Ser Gly Gly Val Met Thr Thr Leu Ile Lys
435 440 445

Arg Asn Thr Ala Ile Pro Thr Lys Lys Ser Gln Ile Phe Ser Thr Ala
450 455 460

Ala Asp Asn Gln Pro Val Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg
465 470 475 480

Ala Met Ala Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Lys Phe Glu Leu Lys Asp
485 490 495

Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Thr Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Thr
500 505 510

Leu Asp Ser Asn Gly Ile Leu Lys Val Ala Ala Thr Asp Lys Gly Thr
515 520 525

Gly Lys Ser Asn Ser Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser

530

535

540

Lys Glu Glu Ile Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Gln Tyr Ala Gln
545 550 555 560

Gln Asp Lys Glu Val Arg Glu Lys Ile Glu Ser Arg Asn Gly Leu Glu
565 570 575

Asn Tyr Ala His Ser Leu Lys Asn Gln Val Asn Asp Glu Thr Gly Phe
580 585 590

Gly Ser Lys Leu Asp Glu Asp Asp Lys Glu Thr Leu Leu Asp Ala Ile
595 600 605

Asn Glu Ala Leu Glu Tyr Leu Asp Asp Asn Phe Glu Thr Ala Thr Lys
610 615 620

Gln Asp Phe Glu Asp Gln Lys Glu Lys Leu Ser Lys Val Ala Tyr Pro
625 630 635 640

Ile Thr Ser Lys Leu Tyr Asp Thr Pro Pro Thr Ser Asp Glu Asp Asp
645 650 655

Glu Asp Asp Trp Asp His Asp Glu Leu
660 665

<210> 15
<211> 1929
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 15

ggtacccgat cccccacaca ccatagcttc aaaatgtttc tactcctttt ttactcttcc 60
 agatttttctc ggactccgcg catcgccgta ccacttcaaa acaccaagc acagcatact 120
 aaattttccc tctttcttcc tctaggggtgt cgttaattac cgttactaaa ggtttggaag 180
 agaaaaaaga gaccgcctcg tttctttttc ttcgtcgaaa aaggcaataa aaatttttat 240
 cacgtttctt tttcttgaaa tttttttttt tagttttttt ctctttcagt gacctccatt 300
 gatatttaag ttaataaacg gtcttcaatt tctcaagttt cagtttcatt tttcttggtc 360
 tattacaact ttttttactt cttgttcatt agaaagaaag catagcaatc taatctaagg 420
 ggcggtgttg acaattaatc atcggcatag tatatcgga tagtataata cgacaagggtg 480
 aggaactaaa ccatggccaa gttgaccagt gccgttcggg tgctcaccgc gcgcgacgtc 540
 gccggagcgg tcgagttctg gaccgaccgg ctcggttctt ccggggactt cgtggaggac 600
 gacttcgccc gtgtgggtcc ggacgacgtg accctgttca tcagcgoggt ccaggaccag 660
 gtggtgccgg acaacaccct gccctgggtg tgggtgcgcg gcctggacga gctgtacgcc 720
 gagtggtcgg aggtcgtgtc cacgaacttc cgggacgcct cggggccggc catgaccgag 780
 atcggcgagc agccgtgggg gcgggagttc gccctgcgcg acccgccggg caactgcgtg 840
 cacttcgtgg ccgaggagca ggactgacac gtccgacggc ggcccacggg tccaggcct 900
 cggagatccg tccccctttt cctttgtcga tatcatgtaa ttagttatgt cacgcttaca 960
 ttcacgcct cccccacat ccgtctaac cgaaaaggaa ggagttagac aacctgaagt 1020
 ctaggtccct atttatttt ttatagttat gttagtatta agaacgttat ttatatttca 1080
 aatttttctt tttttctgt acagacgcgt gtacgcatgt aacattatac tgaaaacctt 1140
 gcttgagaag gttttgggac gctcgaaggc ttttaatttc aagctggaga ccaacatgtg 1200

agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 1260
taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 1320
cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 1380
tgttccgacc ctgccgctta ccgataacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 1440
gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtcggtc gctccaagct 1500
gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 1560
tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 1620
gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta 1680
cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 1740
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtgggttttt 1800
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 1860
ttctacgggg tctgacgctc agtggaaaga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag 1920
atcaagctt 1929

<210> 16
<211> 40
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> cebador

<400> 16
ggagctcaaa aagctagcac caagggtcca tccgttttcc 40

<210> 17
15 <211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> cebador

<400> 17
cagatcttta cttacctggg gacaaggaca ag 32

<210> 18
25 <211> 42

	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
5	<223> cebador		
	<400> 18		
	gactagtaaa aacgtacggt tgctgctcca tccgttttca to		42
10	<210> 19		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 19		
	cagatcttta gcactcacct ctgttgaagg ac		32
20	<210> 20		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 20		
30	ggagctcatg ttttaagttca accgctc		27
	<210> 21		
	<211> 32		
	<212> ADN		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
40	<400> 21		
	caacgagttg aacctccgcc tctgcttcca cg		32
	<210> 22		
	<211> 32		
45	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
50	<400> 22		
	cgtggaagca gaggcggagg ttcaactcgt tg		32
	<210> 23		
55	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> cebador		
	<400> 23		
	ggctagcgga ggaaacggta ac		22

5	<210> 24 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
10	<400> 24 gactagtatg ttttaagttca accgctc	27
15	<210> 25 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
20	<400> 25 gggtcatctg gatgtccgcc tctgcttcca cg	32
25	<210> 26 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
30	<400> 26 cgttgaagca gaggcggaca tccagatgac cc	32
35	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
40	<400> 27 gcgtacgctt gatctcaacc	20
45	<210> 28 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
50	<400> 28 ggtcgacatg aagttatttg gattgac	27
55	<210> 29 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
60	<400> 29	

	gatgcattta caactcgtcg tgagccac	28
	<210> 30	
	<211> 25	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 30	
	gagatacggg atgcacgcc aagaac	25
	<210> 31	
15	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> cebador	
	<400> 31	
	gttcttggcg tgcataccgt atctc	25
25	<210> 32	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 32	
	gttgccgggtg ttgacatcgc cgg	23
35	<210> 33	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 33	
45	ccggcgatgt caacaccggc aac	23
	<210> 34	
	<211> 25	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
55	<400> 34	
	ggtcgacatg aaagtggcaa gtttg	25
	<210> 35	
	<211> 25	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	

	<400> 35 gatgcattca tagctcatct ttttc	25
5	<210> 36 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 36 ggtcgacatg tttatggaga tcggag	26
15	<210> 37 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 37 gatgcattca cagctcgtcg tgcaac	26
25	<210> 38 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 38 ggtcgacatg aaagtcacgt ctatctgg	28
35	<210> 39 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 39 gatgcattca cagctcatcc ttggctgg	28
45	<210> 40 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador	
	<400> 40 gatacacgca gttgacgagc tg	22
55	<210> 41 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
60		

	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 41		
5	cagctcgtca actgcgtgta tc		22
	<210> 42		
	<211> 22		
	<212> ADN		
10	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
15	<400> 42		
	gacaacgcat tgtcgaaaga ag		22
	<210> 43		
	<211> 22		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
25	<400> 43		
	cttttttcca caatgogttg tc		22
	<210> 44		
30	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> cebador		
	<400> 44		
	ggtcgacatg aagcacgtga taagtggc		28
40	<210> 45		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 45		
	gatgcattta tagctccaaa cgatacag		28
50	<210> 46		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 46		
60	gagtttgagt ccacgccttt cgcgcg		25
	<210> 47		
	<211> 25		

	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
5	<223> cebador		
	<400> 47		
	cgcggaagg cgtggactca aactc	25	
10	<210> 48		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 48		
	ggtcgacatg gattctacgc aatttac	27	
20	<210> 49		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 49		
	gatgcattta atcgagatca ggactgc	27	
30	<210> 50		
	<211> 29		
	<212> ADN		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
40	<400> 50		
	ggtcgacatg ttttaagttca accgctctg	29	
	<210> 51		
	<211> 29		
45	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
50	<400> 51		
	gatgcattca cagctcatca tgatcccag	29	
	<210> 52		
55	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> cebador		
	<400> 52		

	cactaaggat gctggaacca ttgccggtct ggaag	35
	<210> 53	
	<211> 35	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 53	
	cttccagacc ggcaatggtt ccagcatcct tagtg	35
	<210> 54	
15	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> cebador	
	<400> 54	
	ccagcccca gaggaacccc acaaattgag gtgac	35
25	<210> 55	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 55	
	gtcacctcaa tttgtggggt tcctcttggg gctgg	35
35	<210> 56	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 56	
45	oggattcggc tccaaacttg atgaggatga caagg	35
	<210> 57	
	<211> 35	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
55	<400> 57	
	ccttgcatac ctcatcaagt ttggagccga atccg	35
	<210> 58	
	<211> 26	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	

	<223> cebador	
	<400> 58	
5	ggtcgacatg aagttttctg ctggtg	26
	<210> 59	
	<211> 26	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 59	
15	gatgcattta caattcatcg tgaatg	26
	<210> 60	
	<211> 26	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
25	<400> 60	
	ggtcgacatg ctgcgccgcg ctctgc	26
	<210> 61	
	<211> 27	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
35	<400> 61	
	gatgcattta cagttcatct ttcacag	27
	<210> 62	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> cebador	
	<400> 62	
	gcagggccct actggttcaa gg	22
50	<210> 63	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 63	
60	gcagggcccg ctogaatcga c	21
	<210> 64	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador		
5	<400> 64		
	gngtngaytt yaaygtncn ttrga		25
	<210> 65		
	<211> 26		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador		
15	<400> 65		
	gynacdcng gyaaytcytt dccyt		26
	<210> 66		
20	<211> 9046		
	<212> ADN		
	<213> <i>Ogataea minuta</i>		
	<220>		
25	<221> CDS		
	<222> (4766)..(6016)		
	<400> 66		

ggatcccgcc ctcgacgggtt gttgggtcgg gataatgttc gttgatgagc caacttcgat 60
 ttttgctgaa acgactgaga cagatccgac agacgaggtg tagttgcgga tcagattttg 120
 catcactctg ctgtttcttt tgatgtgtct ttcgtcgtcc tggaaccccc aactcgatag 180
 cagcgaaagg actttgtcgt ctgctccac aagcgatagt ttggacgag ctagatatgg 240
 attgacgtag cttcttgcg aggtggcgga ctcttttttg atgtgggttt cggtaacgga 300
 ttccgacttg gcatgtgatt caatcactcc ctgtagtgg gacgacacca cgctcatgtt 360
 gtcgtcgtcc tgttgtccgc tgaagtcaaa cggattgctt tttctgtcaa cgggtgctgac 420
 gacagcgtca acgctcaaca gatctgagtc cacagtctcg acgctggaga cgtccgactc 480
 atgaacagga tacctgaaat tcacttgggt cccaagaaac gtgtctgtgt gtgtctttct 540
 gtgtctgttt ttcgtcattg cttgatattc ccctaaata gttatcacgt acggaactct 600
 ggtaaaaaaa cctgatccgt ttcagatcaa ctacatttaa aatcaggttg ttctccagc 660
 cccggcgga gctaaagatg gctgggtttt tcaatcagat ggtgaaatat taattttttt 720
 gagccgcaac ccagccccag atccgaggct gtgcagcaga ttcggtcgat aaatgtacaa 780
 cgactatgct aaatagggag tgaaaagcag caaaaaaat gtcttagagg tagtaccttg 840
 gttcttcaaa gacatggaat ttgtggtctc tgaccccatc tccatagaac atcgatggga 900
 atcggaggtc tggatcaacg gtttcctcgt ctatccgctg ttgcgagtag ctttcgtcgt 960
 agtctccatt ggagggtatg ataaatttac ccacctgaac ctcaagtgcg gtgatggacc 1020
 cacgactgat ccgagcatac ccggttcttt tgagtttctt gtacaagatg tactcgcacc 1080
 aacgatcgtc atcagtagcg tcgatatcgt gcattcctga cttgtcgtc acgtaggtgt 1140

tghtaattccc cttgaggggt tcggtcacca agtagtcaa caggatcatt ggcctttctg 1200
 aactgcccatt aatttcggaa acaccgagag attgtaaaac ggggtcctca acgtcctctt 1260
 cttgtcccga atggaaaacg acaacgtcca cgagctctcc gtaacagtcc agagtagcgt 1320
 ggatggcagg agccaattcg cccacaggag acggaagcaa gtgatgcgtg gaattgatga 1380
 tcggaaaactt ggacaaaagg gccgcacccc aggtatgttt cgttgggttc ggaccgaaat 1440
 cggegtacat gccgagttct tcggcaattc tttgggtgag atctctgttt cccatgatga 1500
 ttctttgagt gtccgattct aataaaccca caacgtccaa ctccaggtct ttgatcaggt 1560
 ctctcattct gtgctcagat gccacatgt cgttatcgag accaaagtga atggtccaaa 1620
 taccagccgt gacaagtctg gactggggat ggtagggtct tggtttttcg aactggaatc 1680
 tgttgaaagc gataaatccc gagagcagtg taaagaaaat gaggttaattt gtgatttttt 1740
 tcaacgacga cttcagtcgc tttgaatgcg aaacttcaga ctgctttag ttgaaaacaa 1800
 gaccgcaaat catcagaact gaaacagaca ggatgataac tgttctttct ctcaacaatg 1860
 gtccaccggg aacaaaggca tatgcgacaa ccagacgtg agccaaagag agcactatgt 1920
 caaacaggaa cgaaagacca aacactagag ccacgccgtc cactttggaa acctgatcaa 1980
 aacaaacagg agtgatgaaa cacagccaga aagcgtagc cagcccacca gcgtaactga 2040
 tccagccgtt gaaatagtac aggaacaaag ctccgagaac tccgcataa gtgacagact 2100
 tgtaggaact ggaccggtag aatccgaaaa aggctcctag acacatgaaa atcaccgtca 2160
 ccgcaccgtg gggaacaggg atcgcccggt tgataggata gccctcccat gtccacagaa 2220
 caatggtaga agagtcggta agcatggcac taatcgagaa aatcagagat ccaaaaccca 2280
 tggctgacag cataagagaa ggcttttgag tcttaagtgg gcctttctca gatacagtcc 2340
 cctgtggtag ctttgtgaaa gctgcagctg tcaatccgac aactagaccg gtgaggttcc 2400

acccaccggt gtcgctgttc atgatgggcc aaataggatt attggtccag aacgcaaact 2460
 tggcgagact ggacagaatg agccccattg taaacgaggt tgcaaacgtt ttcgtagcca 2520
 gttgatcatt cagtttgcca atggcagcca cttcggtact taaggcaatg gttggaacg 2580
 aaacagccgc gccataaacc atcaatctgc aggcagggtc taccaccaag taagccccca 2640
 caccgaacaa acaggtgagc gttctagcga cttgaggacg ttttgtgaaa aacagcttca 2700
 cctttggaac tgccaagaca aacggagtca atagaaggac acagactgcc tcgtatcccg 2760
 agattcccat gtaccacagc gggaagtacc agatacagag gaacaatgag gagtagacag 2820
 accagaaaac gaaccaattg atggtgtcga cagtgagttg ccagaaagag ctgctgaact 2880
 gagtcgactt cggtaatagc ttcccgtgg aggttggggc cgaggaactt gaagtgccgt 2940
 ttattctgtc ttgaatgagc ttgatgtcga aattggcact gaaaaattcg tctcttgttg 3000
 ctgaaggtct gagtcgatg atcaggtctt tgaagtccaa gatggaccag gcatcaaagc 3060
 caacatcaag aaagatcaac gccattcgc agtatgcgta gtaagaataa gctcccttga 3120
 cgtgatgaac cttgtgctgg ataaaaagat acaccagagg gacaagtga ccaaaaaatg 3180
 tccatgcggt gtacttctg gctcttctga tcttgaccg tgggtggggac agcttggtga 3240
 tagcgaggtc ccacgggata gtcaggacaa tgtaggagat cataaacaca tcgtgcgcgt 3300
 cgtgatcatc cgtagaagta atataaacc agcctccaca cgtgatggtt ctgatgaagc 3360
 ccgatatcag ggcaagtta gggtacactg aattggcctt gtgcagacga acatacgta 3420
 gtagcagtag taagaacga ggaccagctg taagcgcat caaatctgg aagattgacc 3480
 gttcaggata tctgtacca atggtggccg agacactcg gaaccactcg tctggatacc 3540
 cataatactc gttctcaacg attttgtaaa aatggagcca gcaccaaca gccaaaggcag 3600
 ctaaaaaggc agagagcgag cacacagagt gtgcgatgc aatggcctgt gagttcaacc 3660

gcactagagg ctgcgagttg ggcccgtctg gaactgccat gatgataaat tgcgagcaaa 3720
 ttgggtgaac atcagcacta aagcgacttg ttcccatcag aatctttaaa aacaacacct 3780
 gaaatggacg ttttcagaga tcaggtgtaa ggggtgttgc ttggaaaaac acgaggaaaa 3840
 gagcttgggc tgggaacacc cgtacaccgg atctagctcc tggctgcggg atctggattt 3900
 aggaaaaaaaa caaacgcac gaatgagctt tgctgccttt agcagagggt agaggtgata 3960
 cactagacag caagagattg gaaaatggcg ggtaagtcgg ctgttgatga aatcttgatg 4020
 acaactactg acatggaaca gaaatcaaag agaaacctga atttagaaag tcgccagacg 4080
 tttcgttcga cgagattgat tacagagacc cgcttgctct aaaaaaggca caggagtcga 4140
 tgctgagaga gcagttcatc agaattgagg ttctgaaggt ggtgagaaaa gcgctagaga 4200
 attgctggag ggtgaacggg cccaacggac acgaagagtg ccgggacctg gccgacaagt 4260
 acctagacat gctgccaac tcccggggcc agggatacat gggataccaa agaaacgacc 4320
 cgtccaaata ggctggctgc ggctggctgc ggctggctgc agaccgaccg caaaccaact 4380
 gcaggcttgt tgtaggctga ttatttattg actatttatt gaatatttat tgcaccactt 4440
 gtgtgttccc cttgaccatg cgtcgatcga cgcgcgaggc ttaggaagcc cggagcgggg 4500
 aattcacgtg gtgtacgggt gtggaggtct agcacccgag ttttcggaga ggcagatgat 4560
 gcatctccgg ggagtgtcag gcaaggagga atgggcagat cgacggaaga aagggatata 4620
 aatgttata ttgcacttg tttttgtgaa tatcagcacc caaacaaaat aagacaactt 4680
 atcagtttct taagtattac aagtgagtaa ttgtcaacca gcacagctgt cgtagtgtaa 4740
 acactaacgc cgcatagaac tagca atg tcg tta tcc agc aag ctg tca gtt 4792
 Met Ser Leu Ser Ser Lys Leu Ser Val
 1 5
 aag gac ttg gac gtc tcg ggc aag aga gtg ttc ata aga gtg gac ttc 4840

Lys	Asp	Leu	Asp	Val	Ser	Gly	Lys	Arg	Val	Phe	Ile	Arg	Val	Asp	Phe	
10					15				20						25	
aat	gtt	cca	ttg	gac	gga	gac	aag	atc	acc	aac	aac	caa	aga	att	gtc	4888
Asn	Val	Pro	Leu	Asp	Gly	Asp	Lys	Ile	Thr	Asn	Asn	Gln	Arg	Ile	Val	
				30					35					40		
gct	gct	ttg	cca	acc	att	cag	tac	gtt	ctt	gag	aac	aag	cca	aag	gtg	4936
Ala	Ala	Leu	Pro	Thr	Ile	Gln	Tyr	Val	Leu	Glu	Asn	Lys	Pro	Lys	Val	
				45				50					55			
gtt	gtt	ttg	gcc	tcc	cac	ttg	ggc	aga	ccc	aac	gga	gag	aag	aac	ctc	4984
Val	Val	Leu	Ala	Ser	His	Leu	Gly	Arg	Pro	Asn	Gly	Glu	Lys	Asn	Leu	
		60					65					70				
aag	tac	aca	ttg	aag	cct	gtc	gcc	aag	gaa	ctg	gag	act	ctt	ttg	ggc	5032
Lys	Tyr	Thr	Leu	Lys	Pro	Val	Ala	Lys	Glu	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Gly	
	75					80					85					
cag	aaa	gtg	acc	ttc	ttg	gac	gac	tgt	gtt	ggc	tct	gag	gtc	gaa	tct	5080
Gln	Lys	Val	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Cys	Val	Gly	Ser	Glu	Val	Glu	Ser	
90					95				100						105	
acc	gtc	aac	tct	gcc	cct	gct	ggc	tgc	gtg	att	ttg	cta	gaa	aat	ttg	5128
Thr	Val	Asn	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly	Ser	Val	Ile	Leu	Leu	Glu	Asn	Leu	
				110					115					120		
aga	ttc	cac	att	gag	gag	gaa	ggc	tgc	aaa	aag	act	tca	gag	gga	aaa	5176
Arg	Phe	His	Ile	Glu	Glu	Glu	Gly	Ser	Lys	Lys	Thr	Ser	Glu	Gly	Lys	
				125				130					135			
gtt	aag	gct	tcc	aaa	gag	gac	gtt	gaa	aaa	ttc	aga	aag	caa	ctc	act	5224
Val	Lys	Ala	Ser	Lys	Glu	Asp	Val	Glu	Lys	Phe	Arg	Lys	Gln	Leu	Thr	
				140				145					150			
gct	ctg	gct	gat	gtc	tac	gtt	aac	gac	gct	ttc	ggc	act	gct	cac	aga	5272
Ala	Leu	Ala	Asp	Val	Tyr	Val	Asn	Asp	Ala	Phe	Gly	Thr	Ala	His	Arg	
				155			160				165					
gcc	cac	tcc	tcc	atg	gtc	ggc	ttc	gag	ctc	gag	gac	aga	gct	gct	ggc	5320
Ala	His	Ser	Ser	Met	Val	Gly	Phe	Glu	Leu	Glu	Asp	Arg	Ala	Ala	Gly	
170					175					180					185	

ttc ctg atg gcc aag gag ctg gag tac ttc tcc aag gct ctg gag aac	5368
Phe Leu Met Ala Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Ser Lys Ala Leu Glu Asn	
190 195 200	
ccg gtg aga ccg ttt ttg gct atc ctt ggt ggt gca aag gtg tct gac	5416
Pro Val Arg Pro Phe Leu Ala Ile Leu Gly Gly Ala Lys Val Ser Asp	
205 210 215	
aaa att cag ctg att gac aat ttg ctc gac aag gtc gat ctc ttg att	5464
Lys Ile Gln Leu Ile Asp Asn Leu Leu Asp Lys Val Asp Leu Leu Ile	
220 225 230	
gtc ggt gga gga atg gcc ttc act ttc aac aag gtg ttg aac gac atg	5512
Val Gly Gly Gly Met Ala Phe Thr Phe Asn Lys Val Leu Asn Asp Met	
235 240 245	
aag atc ggt aag tct ttg ttc gac gag act gga gct gag att gtt cca	5560
Lys Ile Gly Lys Ser Leu Phe Asp Glu Thr Gly Ala Glu Ile Val Pro	
250 255 260 265	
aag ctc gtg gag aag gcc aag aag aac ggc gtc aag atc gtt ttg cca	5608
Lys Leu Val Glu Lys Ala Lys Lys Asn Gly Val Lys Ile Val Leu Pro	
270 275 280	
gtg gac ttt gtc act gcc gat gcg ttc tcg cca gat gcc aag gtt ggc	5656
Val Asp Phe Val Thr Ala Asp Ala Phe Ser Pro Asp Ala Lys Val Gly	
285 290 295	
tac gcc acc ctt gag gag ggt att gcc gac gat ttg caa ggt ctg gac	5704
Tyr Ala Thr Leu Glu Glu Gly Ile Ala Asp Asp Leu Gln Gly Leu Asp	
300 305 310	
ggt ggt gaa aag acc cgt aag ctg ttt gcc gac acc atc gcg cag gcc	5752
Gly Gly Glu Lys Thr Arg Lys Leu Phe Ala Asp Thr Ile Ala Gln Ala	
315 320 325	
aag acc atc gtc tgg aac ggt cca cct ggt gtg ttt gag ttc gag agc	5800
Lys Thr Ile Val Trp Asn Gly Pro Pro Gly Val Phe Glu Phe Glu Ser	
330 335 340 345	
ttt gcc agc ggt acc aag tcg atg ttg caa gct tgt gtc gag tct gcc	5848

Phe	Ala	Ser	Gly	Thr	Lys	Ser	Met	Leu	Gln	Ala	Cys	Val	Glu	Ser	Ala	
					350				355						360	

cag	gcc	gga	aac	acc	gtt	att	atc	ggg	ggg	gga	gac	act	gcc	acc	gtg	5896
Gln	Ala	Gly	Asn	Thr	Val	Ile	Ile	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Val	
			365					370							375	

gca	aag	aag	ttt	ggc	ggg	gcc	gac	aag	ctg	toc	cac	gtt	tcc	act	gga	5944
Ala	Lys	Lys	Phe	Gly	Gly	Ala	Asp	Lys	Leu	Ser	His	Val	Ser	Thr	Gly	
			380					385							390	

gga	ggg	gct	tcc	ctg	gaa	ttg	ttg	gag	ggg	aag	gag	ctt	cct	ggg	gtt	5992
Gly	Gly	Ala	Ser	Leu	Glu	Leu	Leu	Glu	Gly	Lys	Glu	Leu	Pro	Gly	Val	
			395				400								405	

gct	gct	ttg	aag	agc	aag	act	gct	taggtgggat	ttgcgtgatc	tacgtagtgg	6046
Ala	Ala	Leu	Lys	Ser	Lys	Thr	Ala				
			410				415				

ttatttttgt agttagtttg actgtctaga aatactcttt gcacagcccc aaataaatta 6106

cactgccgtg aaattcatga gaaaaaagta ccaaagataa acaggggaga aagtgatcgg 6166

gtgttcctc ttgtgtgatc cagtcgtgaa cagtactgat caccaccca gatgactaaa 6226

cacaggcgca aaaacattcc actgacttac atcacacaga gcctagacaa ttccaggacc 6286

aatcagggtt ctctgtttga taaggctcta gtgaacaaac acaacaaca cagatcaaag 6346

actcacaatt ctgtcaaatt ggccagtcta accaagtctt acttgtctgc caagccggtc 6406

caggcaacaa agagcccaac agttgacaaa atcaccaaaa ggatcaaccg aaagtccac 6466

tcgaccaaga aaatcgacc cgtgcctctt ttctcagggc cctgggggct tcttaccggc 6526

caacttaacg actatttaac gtgcattcgc tcaatgaact ctgttttga ttacgaccag 6586

cccttgacca cggctcagaa gtgcgtcgtc tcgattttgg acatcaaacc gatttcagac 6646

catttgaacg tggtcagggt cgcagagctc gatagcgtga tgctggggtc gttccaaaac 6706

caccagtcga gactcaaggc tggogaccaa attcacattg gagacgatta ctacaatgtt 6766

ccgtacaacg gaaagtatct cagatgttac tatcgatggg ttaaagtgat atgaggtata 6826
 tacaggatgc cgactagacg gtgaactgtt cgcgcagttg agagtactgg ctggaacggt 6886
 ccggatcaca cttttccaac agttgcgaca caaatgggcc gtgcacagtt tttccagag 6946
 tgtttgaaat actcaacaaa ggcatgtact cgtccaggaa ctccttgac atgggtggcat 7006
 cgcctttcac tgccaggaat tgaagagcaa ccagcgacgg ggtcaaactc tcccgtttca 7066
 atgcaccgtc aaggactttc ttcattgtaca ccagttgtt gcggttgga aaaatggga 7126
 ggaaaacaac atccaatctg gaacgaaatt gggcagcagc caggtcgtgt tcgaacattc 7186
 ggggtggacag ttggtacagc ttgtgaacca ttggagagta cttgaagctg taattagggt 7246
 ctgcagttag cgaaccgatc gtaaggaagt tttcgttatc gatctgcgag cccgagatga 7306
 ctaatagagg tattagtttt tgaacgtcct ccgttgacaa aacagggtta taagtgtga 7366
 gaatccggaa gatacgtgcg tatctcttgt tgaacacctc cgcctctgtc tctactgatt 7426
 tgtgaaattc agacgactgt agcacgagat caatatatct gaacacctc tcaacagtaa 7486
 cgggtttccc gttggcttgc atggcittga aatggttctc gatcttgttc agagggttaag 7546
 tggctgggtc cttcaaatgc agtggtttta aagcctcaaa tcgctgggtg tagttctccg 7606
 aggttaagag ttccggtcta aaagcgctcg agctcgcttg ggtggtgtag agatgtagcc 7666
 ggttcagctg caaaatagtt tgaagattcg agatcctcg cggggcagtg tgatagtatc 7726
 tgatcccggc aaagatatcg tcgttgtagc cacggcact tctggctgga tactttgtct 7786
 tctctttcga ccacaggttc tccaagcaca tgacttctct tctctccgc gtcagaaagt 7846
 ggacgtaaat gttatcgatt ttgcagtcca tcatcatcca ggtatttgct gaggccccgt 7906
 aatcattgct ggcgtacga ggggtctctc tacccttttt caacagtctt ctgtgatact 7966
 tggctagctg gccactgctc agaagacctt ctgccagagg gatggttttc agagtgtgtt 8026

tgatgaaaag attgagctcc gccgtagctt tctggagatg cttcgaactc tttcctgttc 8086
 caatgatcat gaagtcggcg atctcttggg ctcttcgtt gacctctgcc cgggtgctat 8146
 cgcgcaagtc gaacagggcc agatcgggtca ttcccagctt ctccgcgata aactcgagaa 8206
 ctggctgcaa gctggccgga gagttgggcg gaagatccgg aatctgaatc tgtctaggct 8266
 gcgaggccaa atccgcagac tcttcagctc tcatgtacca cgggagagct gccgttttga 8326
 cttcttgggtg gctgactgga actgacgaga agtcggcgac cagttgctgg gaactggcag 8386
 cgttgtgagg gaagaagccg ctccgaaggc cgcggggcac aggacgcgac accggacaca 8446
 accgacaccg tctccacatt atggctgtat ttggaaaaga ttgagtagtc gatagtttct 8506
 gcaaaagctt tagcaaacaa caaacacgcg acgtttgaag acagtttttt ggcagcttcg 8566
 atctgtcgat agttcagtgg tgatctcagt ggtcgtttcg tctaccttga atctctcacc 8626
 ccagatgttg tctctgtgtg aagtttttgt gaatttttca tctttctttt tactcgattt 8686
 tttcctcttc cagtcgata gtcgcgagac gccttgcgac gcgccgtttt aatttcccaa 8746
 aatttgcaca aacaaaagat aaaaacagga ctgtcgattt gggttttgtg ggaacagaaa 8806
 agaggaaccg tttgaacaat aaagcaacgg tcttccaaaa tcatcctcta cactcattc 8866
 tcaacacgtg accatcggga acaagttctg gagctctctt caaaccgga ctcaacatag 8926
 tgttttgtgc caggcccgtg ttttactata aaggtgccct caagaaccat tagttcgtgc 8986
 tacttgctc cgatttgtgc ttctaacgg tgtttcaaca atcatgacag gccgggatcc 9046

<210> 67
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> *Ogataea minuta*

<400> 67
 Met Ser Leu Ser Ser Lys Leu Ser Val Lys Asp Leu Asp Val Ser Gly

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

225		230		235		240									
Thr	Phe	Asn	Lys	Val	Leu	Asn	Asp	Met	Lys	Ile	Gly	Lys	Ser	Leu	Phe
				245					250					255	
Asp	Glu	Thr	Gly	Ala	Glu	Ile	Val	Pro	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ala	Lys
			260					265					270		
Lys	Asn	Gly	Val	Lys	Ile	Val	Leu	Pro	Val	Asp	Phe	Val	Thr	Ala	Asp
		275					280						285		
Ala	Phe	Ser	Pro	Asp	Ala	Lys	Val	Gly	Tyr	Ala	Thr	Leu	Glu	Glu	Gly
	290					295					300				
Ile	Ala	Asp	Asp	Leu	Gln	Gly	Leu	Asp	Gly	Gly	Glu	Lys	Thr	Arg	Lys
305					310					315					320
Leu	Phe	Ala	Asp	Thr	Ile	Ala	Gln	Ala	Lys	Thr	Ile	Val	Trp	Asn	Gly
			325						330					335	
Pro	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Phe	Glu	Ser	Phe	Ala	Ser	Gly	Thr	Lys	Ser
			340					345					350		
Met	Leu	Gln	Ala	Cys	Val	Glu	Ser	Ala	Gln	Ala	Gly	Asn	Thr	Val	Ile
		355					360					365			
Ile	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Val	Ala	Lys	Lys	Phe	Gly	Gly	Ala
	370					375					380				
Asp	Lys	Leu	Ser	His	Val	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Leu	Glu	Leu
385					390					395					400
Leu	Glu	Gly	Lys	Glu	Leu	Pro	Gly	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Ser	Lys	Thr
			405						410					415	

Ala

<210> 68

<211> 42

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador

10

	<400> 68		
	aagcttgaca atgtaggaga tcataaacac atcgtgcgcg tc	42	
5	<210> 69 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador		
	<400> 69		
	ggatccagat ctcatatgac tagttgctag ttctatgcgg cgtagtggt tacactacga	60	
	cagct	65	
15	<210> 70 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador		
	<400> 70		
25	ggatccgtgg gatttgcgtg atctacgtag tggttatttt	40	
30	<210> 71 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador		
	<400> 71		
	ggtaccgcag tgaaggcga tgccaccatg tgcaaggagt tc	42	
40	<210> 72 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador		
45	<400> 72		
	ggaagcttga caatgtagga gatcataaac a	31	
50	<210> 73 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador		
	<400> 73		
	ggtcgactgc tagttctatg cggc	24	
60	<210> 74 <211> 28 <212> ADN		

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
5	<400> 74	
	ggatgcatgt gggatttgcg tgatctac	28
10	<210> 75	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 75	
	gggtaccagg gtcgattttc ttggtcg	27
20	<210> 76	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 76	
	gatctcaggc cgagtcaaga c	21
30	<210> 77	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 77	
40	taacgccgca tagaactagc	20
	<210> 78	
	<211> 25	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 78	
	gatgcattta caactcgtcc ttaac	25
	<210> 79	
	<211> 23	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
60	<400> 79	
	atgtcctcga ctaagacata cgc	23

5	<210> 80 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
10	<400> 80 tcatgcgaca cgactcaaat aag .	23
15	<210> 81 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
20	<400> 81 gtctagatgt ttttcaacag actaag	26
25	<210> 82 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
30	<400> 82 gactccacca gctgtacttc agttccgtag tttctacat c	41
35	<210> 83 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador <400> 83 gatgtagaaa actacggaac tgaagtacag ctggtggagt c	41
45	<210> 84 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador <400> 84 ggtcgactca tttaccggg gacag	25
55	<210> 85 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador	

	<400> 85 gtctagatgt ttttcaacag actaag	26
5	<210> 86 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 86 gattgggtca tctgaatgtc agtttcgtag ttttctacat c	41
15	<210> 87 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 87 gatgtagaaa actacggaac tgacattcag atgacccaat c	41
25	<210> 88 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 88 ggtcgaccta acactctccc ctgt	24
40	<210> 89 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<400> 89 caaatgaag cacagatgc	19
50	<210> 90 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador	
	<400> 90 cgagctcatg aagttttctg ctggtg	26
60	<210> 91 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	

	<220> <223> cebador	
5	<400> 91 gcccgggtta caattcatcg tgaatg	26
	<210> 92 <211> 31 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
15	<400> 92 cgagctcatg ttatttctta stattattaa g	31
20	<210> 93 <211> 31 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador	
	<400> 93 gcccgggcta caattcgtcg tgcttgtttc c	31
30	<210> 94 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
	<400> 94 cgagctcatg attccaaaat tatatatac	29
40	<210> 95 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<400> 95 gcccgggcta caactcatct ttgagc	26
50	<210> 96 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador	
60	<400> 96 cgagctcatg agattaagaa ccgocattg	29
	<210> 97	

	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 97		
10	gcccgggtta ttgtatatct agcttatag	29	
	<210> 98		
	<211> 26		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 98		
20	cgagctcatg atgtttaata tttacc	26	
	<210> 99		
	<211> 26		
	<212> ADN		
25	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
30	<400> 99		
	gcccgggcta ggcggctgat ttcacg	26	
	<210> 100		
	<211> 32		
35	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
40	<400> 100		
	cgagctcatg atactgatct cgggatactg tc	32	
	<210> 101		
45	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
50	<223> cebador		
	<400> 101		
	gcccgggtca aagcccaaaa ttcatttta ag	32	
55	<210> 102		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
60	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 102		

	cgagctcatg cgaaacgttt taaggcttt	29
	<210> 103	
	<211> 29	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 103	
	gcccgggcta taattcatca tgcaaatg	29
	<210> 104	
15	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> cebador	
	<400> 104	
	cgagctcatg aaattgcacg gctttttatt ttc	33
25	<210> 105	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 105	
	gcccgggtca aagctogtca tgactactgg	30
35	<210> 106	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 106	
45	cgagctcatg aacggttact ggaaac	26
	<210> 107	
	<211> 26	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
55	<400> 107	
	gcccgggtca tttacgtgaa tagatc	26
	<210> 108	
	<211> 27	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	

	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 108		
5	cgagctcatg caagtgacca caagatt		27
	<210> 109		
	<211> 27		
	<212> ADN		
10	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
15	<400> 109		
	gcccggtta taattcatca tgtacgg		27
	<210> 110		
	<211> 35		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
25	<400> 110		
	atcatcatca tgcccgggcc gactacaaag accat		35
	<210> 111		
30	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> cebador		
	<400> 111		
	gcaccgtctc ggatcccttg tcatcgtcat cctt		34
40	<210> 112		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 112		
	gatgacgatg acaagggatc caactactcc cacaccatgg		40
50	<210> 113		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 113		
60	gcaccgtctc ggatcctcat ctccccttga agatccggat		40

	<210> 114	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 114	
10	accctcgaga tgaagttccc tatggtgg .	28
	<210> 115	
	<211> 23	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
20	<400> 115	
	accgcgccg cctacaactc atc	23
	<210> 116	
	<211> 25	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
30	<400> 116	
	accctcgaga tgctgagccg ttctc	25
	<210> 117	
35	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 117	
	accgcgccg cctacaattc gtcctttac	29
45	<210> 118	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	
	<400> 118	
	accctcgaga tgagccaagg g	21
55	<210> 119	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador	

<400> 119

accctcgagt tacctactgt gttgtaataa gac

33

5

<210> 120

<211> 1569

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

10

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1569)

<400> 120

atg aag ttt tct gct ggt gcc gtc ctg tca tgg tcc tcc ctg ctg ctc	48
Met Lys Phe Ser Ala Gly Ala Val Leu Ser Trp Ser Ser Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
gcc tcc tct gtt ttc gcc caa caa gag gct gtg gcc cct gaa gac tcc	96
Ala Ser Ser Val Phe Ala Gln Gln Glu Ala Val Ala Pro Glu Asp Ser	
20 25 30	
gct gtc gtt aag ttg gcc acc gac tcc ttc aat gag tac att cag tgc	144
Ala Val Val Lys Leu Ala Thr Asp Ser Phe Asn Glu Tyr Ile Gln Ser	
35 40 45	
cac gac ttg gtg ctt gcg gag ttt ttt gct cca tgg tgt ggc cac tgt	192
His Asp Leu Val Leu Ala Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys	
50 55 60	
aag aac atg gct cct gaa tac gtt aaa gcc gcc gag act tta gtt gag	240
Lys Asn Met Ala Pro Glu Tyr Val Lys Ala Ala Glu Thr Leu Val Glu	
65 70 75 80	
aaa aac att acc ttg gcc cag atc gac tgt act gaa aac cag gat ctg	288
Lys Asn Ile Thr Leu Ala Gln Ile Asp Cys Thr Glu Asn Gln Asp Leu	
85 90 95	
tgt atg gaa cac aac att cca ggg ttc cca agc ttg aag att ttc aaa	336
Cys Met Glu His Asn Ile Pro Gly Phe Pro Ser Leu Lys Ile Phe Lys	
100 105 110	
aac agc gat gtt aac aac tcg atc gat tac gag gga cct aga act gcc	384
Asn Ser Asp Val Asn Asn Ser Ile Asp Tyr Glu Gly Pro Arg Thr Ala	
115 120 125	
gag gcc att gtc caa ttc atg atc aag caa agc caa ccg gct gtc gcc	432
Glu Ala Ile Val Gln Phe Met Ile Lys Gln Ser Gln Pro Ala Val Ala	
130 135 140	
gtt gtt gct gat cta cca gct tac ctt gct aac gag act ttt gtc act	480
Val Val Ala Asp Leu Pro Ala Tyr Leu Ala Asn Glu Thr Phe Val Thr	
145 150 155 160	
cca gtt atc gtc caa tcc ggt aag att gac gcc gac ttc aac gcc acc	528

Pro Val Ile Val Gln Ser Gly Lys Ile Asp Ala Asp Phe Asn Ala Thr	
165 170 175	
ttt tac tcc atg gcc aac aaa cac ttc aac gac tac gac ttt gtc tcc	576
Phe Tyr Ser Met Ala Asn Lys His Phe Asn Asp Tyr Asp Phe Val Ser	
180 185 190	
gct gaa aac gca gac gat gat ttc aag ctt tct att tac ttg ccc tcc	624
Ala Glu Asn Ala Asp Asp Asp Phe Lys Leu Ser Ile Tyr Leu Pro Ser	
195 200 205	
gcc atg gac gag cct gta gta tac aac ggt aag aaa gcc gat atc gct	672
Ala Met Asp Glu Pro Val Val Tyr Asn Gly Lys Lys Ala Asp Ile Ala	
210 215 220	
gac gct gat gtt ttt gaa aaa tgg ttg caa gtg gaa gcc ttg ccc tac	720
Asp Ala Asp Val Phe Glu Lys Trp Leu Gln Val Glu Ala Leu Pro Tyr	
225 230 235 240	
ttt ggt gaa atc gac ggt tcc gtt ttc gcc caa tac gtc gaa agc ggt	768
Phe Gly Glu Ile Asp Gly Ser Val Phe Ala Gln Tyr Val Glu Ser Gly	
245 250 255	
ttg cct ttg ggt tac tta ttc tac aat gac gag gaa gaa ttg gaa gaa	816
Leu Pro Leu Gly Tyr Leu Phe Tyr Asn Asp Glu Glu Glu Leu Glu Glu	
260 265 270	
tac aag cct ctc ttt acc gag ttg gcc aaa aag aac aga ggt cta atg	864
Tyr Lys Pro Leu Phe Thr Glu Leu Ala Lys Lys Asn Arg Gly Leu Met	
275 280 285	
aac ttt gtt agc atc gat gcc aga aaa ttc ggc aga cac gcc ggc aac	912
Asn Phe Val Ser Ile Asp Ala Arg Lys Phe Gly Arg His Ala Gly Asn	
290 295 300	
ttg aac atg aag gaa caa ttc cct cta ttt gcc atc cac gac atg act	960
Leu Asn Met Lys Glu Gln Phe Pro Leu Phe Ala Ile His Asp Met Thr	
305 310 315 320	
gaa gac ttg aag tac ggt ttg cct caa ctc tct gaa gag gcg ttt gac	1008
Glu Asp Leu Lys Tyr Gly Leu Pro Gln Leu Ser Glu Glu Ala Phe Asp	
325 330 335	

gaa ttg agc gac aag atc gtg ttg gag tct aag gct att gaa tct ttg	1056
Glu Leu Ser Asp Lys Ile Val Leu Glu Ser Lys Ala Ile Glu Ser Leu	
340 345 350	
gtt aag gac ttc ttg aaa ggt gat gcc tcc cca atc gtg aag tcc caa	1104
Val Lys Asp Phe Leu Lys Gly Asp Ala Ser Pro Ile Val Lys Ser Gln	
355 360 365	
gag atc ttc gag aac caa gat tcc tct gtc ttc caa ttg gtc ggt aag	1152
Glu Ile Phe Glu Asn Gln Asp Ser Ser Val Phe Gln Leu Val Gly Lys	
370 375 380	
aac cat gac gaa atc gtc aac gac cca aag aag gac gtt ctt gtt ttg	1200
Asn His Asp Glu Ile Val Asn Asp Pro Lys Lys Asp Val Leu Val Leu	
385 390 395 400	
tac tat gcc cca tgg tgt ggt cac tgt aag aga ttg gcc cca act tac	1248
Tyr Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Arg Leu Ala Pro Thr Tyr	
405 410 415	
caa gaa cta gct gat acc tac gcc aac gcc aca tcc gac gtt ttg att	1296
Gln Glu Leu Ala Asp Thr Tyr Ala Asn Ala Thr Ser Asp Val Leu Ile	
420 425 430	
gct aaa cta gac cac act gaa aac gat gtc aga ggc gtc gta att gaa	1344
Ala Lys Leu Asp His Thr Glu Asn Asp Val Arg Gly Val Val Ile Glu	
435 440 445	
ggt tac cca aca atc gtc tta tac cca ggt ggt aag aag tcc gaa tct	1392
Gly Tyr Pro Thr Ile Val Leu Tyr Pro Gly Gly Lys Lys Ser Glu Ser	
450 455 460	
gtt gtg tac caa ggt tca aga tcc ttg gac tct tta ttc gac ttc atc	1440
Val Val Tyr Gln Gly Ser Arg Ser Leu Asp Ser Leu Phe Asp Phe Ile	
465 470 475 480	
aag gaa aac ggt cac ttc gac gtc gac ggt aag gcc ttg tac gaa gaa	1488
Lys Glu Asn Gly His Phe Asp Val Asp Gly Lys Ala Leu Tyr Glu Glu	
485 490 495	
gcc cag gaa aaa gct gct gag gaa gcc gat gct gac gct gaa ttg gct	1536

Ala Gln Glu Lys Ala Ala Glu Glu Ala Asp Ala Asp Ala Glu Leu Ala
 500 505 510

gac gaa gaa gat gcc att cac gat gaa ttg taa 1569
 Asp Glu Glu Asp Ala Ile His Asp Glu Leu
 515 520

<210> 121
 <211> 522
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 121
 Met Lys Phe Ser Ala Gly Ala Val Leu Ser Trp Ser Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Ser Val Phe Ala Gln Gln Glu Ala Val Ala Pro Glu Asp Ser
 20 25 30

Ala Val Val Lys Leu Ala Thr Asp Ser Phe Asn Glu Tyr Ile Gln Ser
 35 40 45

His Asp Leu Val Leu Ala Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys
 50 55 60

Lys Asn Met Ala Pro Glu Tyr Val Lys Ala Ala Glu Thr Leu Val Glu
 65 70 75 80

Lys Asn Ile Thr Leu Ala Gln Ile Asp Cys Thr Glu Asn Gln Asp Leu
 85 90 95

Cys Met Glu His Asn Ile Pro Gly Phe Pro Ser Leu Lys Ile Phe Lys
 100 105 110

Asn Ser Asp Val Asn Asn Ser Ile Asp Tyr Glu Gly Pro Arg Thr Ala
115 120 125

Glu Ala Ile Val Gln Phe Met Ile Lys Gln Ser Gln Pro Ala Val Ala
130 135 140

Val Val Ala Asp Leu Pro Ala Tyr Leu Ala Asn Glu Thr Phe Val Thr
145 150 155 160

Pro Val Ile Val Gln Ser Gly Lys Ile Asp Ala Asp Phe Asn Ala Thr
165 170 175

Phe Tyr Ser Met Ala Asn Lys His Phe Asn Asp Tyr Asp Phe Val Ser
180 185 190

Ala Glu Asn Ala Asp Asp Asp Phe Lys Leu Ser Ile Tyr Leu Pro Ser
195 200 205

Ala Met Asp Glu Pro Val Val Tyr Asn Gly Lys Lys Ala Asp Ile Ala
210 215 220

Asp Ala Asp Val Phe Glu Lys Trp Leu Gln Val Glu Ala Leu Pro Tyr
225 230 235 240

Phe Gly Glu Ile Asp Gly Ser Val Phe Ala Gln Tyr Val Glu Ser Gly
245 250 255

Leu Pro Leu Gly Tyr Leu Phe Tyr Asn Asp Glu Glu Glu Leu Glu Glu
260 265 270

Tyr Lys Pro Leu Phe Thr Glu Leu Ala Lys Lys Asn Arg Gly Leu Met

275		280		285
Asn Phe Val Ser Ile Asp Ala Arg Lys Phe Gly Arg His Ala Gly Asn				
290		295		300
Leu Asn Met Lys Glu Gln Phe Pro Leu Phe Ala Ile His Asp Met Thr				
305		310		315
				320
Glu Asp Leu Lys Tyr Gly Leu Pro Gln Leu Ser Glu Glu Ala Phe Asp				
	325		330	335
Glu Leu Ser Asp Lys Ile Val Leu Glu Ser Lys Ala Ile Glu Ser Leu				
	340		345	350
Val Lys Asp Phe Leu Lys Gly Asp Ala Ser Pro Ile Val Lys Ser Gln				
355		360		365
Glu Ile Phe Glu Asn Gln Asp Ser Ser Val Phe Gln Leu Val Gly Lys				
370		375		380
Asn His Asp Glu Ile Val Asn Asp Pro Lys Lys Asp Val Leu Val Leu				
385		390		395
				400
Tyr Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Arg Leu Ala Pro Thr Tyr				
	405		410	415
Gln Glu Leu Ala Asp Thr Tyr Ala Asn Ala Thr Ser Asp Val Leu Ile				
	420		425	430
Ala Lys Leu Asp His Thr Glu Asn Asp Val Arg Gly Val Val Ile Glu				
435		440		445

Gly Tyr Pro Thr Ile Val Leu Tyr Pro Gly Gly Lys Lys Ser Glu Ser
450 455 460

Val Val Tyr Gln Gly Ser Arg Ser Leu Asp Ser Leu Phe Asp Phe Ile
465 470 475 480

Lys Glu Asn Gly His Phe Asp Val Asp Gly Lys Ala Leu Tyr Glu Glu
485 490 495

Ala Gln Glu Lys Ala Ala Glu Glu Ala Asp Ala Asp Ala Glu Leu Ala
500 505 510

Asp Glu Glu Asp Ala Ile His Asp Glu Leu
515 520

<210> 122
<211> 957
5 <212> ADN
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(957)

<400> 122
atg tta ttt ctt aat att att aag ctc ctt ttg gga ctt ttt att atg 48
Met Leu Phe Leu Asn Ile Ile Lys Leu Leu Leu Gly Leu Phe Ile Met
1 5 10 15

aat gaa gta aag gcg caa aac ttt tac gat tcc gat cct cat ata tca 96
Asn Glu Val Lys Ala Gln Asn Phe Tyr Asp Ser Asp Pro His Ile Ser
20 25 30

gag tta acg cca aaa agc ttc gat aaa gcg atc cat aac aca aat tac 144
Glu Leu Thr Pro Lys Ser Phe Asp Lys Ala Ile His Asn Thr Asn Tyr

35	40	45	
aca tca tta gtg gaa ttt tat gct ccg tgg tgc ggc cat tgt aag aag			192
Thr Ser Leu Val Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Lys			
50	55	60	
ctc tct agt acg ttc cgc aag gca gca aaa aga ttg gat ggt gta gtc			240
Leu Ser Ser Thr Phe Arg Lys Ala Ala Lys Arg Leu Asp Gly Val Val			
65	70	75	80
caa gtt gct gct gta aac tgt gac ctt aac aag aat aag gct ttg tgt			288
Gln Val Ala Ala Val Asn Cys Asp Leu Asn Lys Asn Lys Ala Leu Cys			
85	90	95	
gct aaa tac gac gta aac gga ttt ccc acg tta atg gta ttt agg ccc			336
Ala Lys Tyr Asp Val Asn Gly Phe Pro Thr Leu Met Val Phe Arg Pro			
100	105	110	
cca aaa att gac cta tct aag cca ata gat aac gcc aaa aaa agt ttc			384
Pro Lys Ile Asp Leu Ser Lys Pro Ile Asp Asn Ala Lys Lys Ser Phe			
115	120	125	
agc gct cat gcc aat gaa gtg tac tca ggt gca aga act ctc gcg cct			432
Ser Ala His Ala Asn Glu Val Tyr Ser Gly Ala Arg Thr Leu Ala Pro			
130	135	140	
att gtt gat ttt tct ctt tca aga ata agg tca tat gtc aaa aag ttt			480
Ile Val Asp Phe Ser Leu Ser Arg Ile Arg Ser Tyr Val Lys Lys Phe			
145	150	155	160
gtc cgt ata gat aca ctt ggc tct tta ctt aga aag tca ccc aaa ctt			528
Val Arg Ile Asp Thr Leu Gly Ser Leu Leu Arg Lys Ser Pro Lys Leu			
165	170	175	
tcc gtg gtg ttg ttt tcc aaa caa gac aaa att tca ccg gtt tat aaa			576
Ser Val Val Leu Phe Ser Lys Gln Asp Lys Ile Ser Pro Val Tyr Lys			
180	185	190	
agc att gcc ctt gat tgg tta gga aag ttc gat ttt tat tca att tca			624
Ser Ile Ala Leu Asp Trp Leu Gly Lys Phe Asp Phe Tyr Ser Ile Ser			
195	200	205	

aac aaa aaa ctc aag caa cta acc gat atg aac cca aca tat gaa aaa 672
 Asn Lys Lys Leu Lys Gln Leu Thr Asp Met Asn Pro Thr Tyr Glu Lys
 210 215 220

act cct gag att ttc aaa tat ttg cag aag gtc att cct gaa cag cga 720
 Thr Pro Glu Ile Phe Lys Tyr Leu Gln Lys Val Ile Pro Glu Gln Arg
 225 230 235 240

cag agc gat aaa agt aag ctt gtc gtt ttt gat gca gac aaa gat aaa 768
 Gln Ser Asp Lys Ser Lys Leu Val Val Phe Asp Ala Asp Lys Asp Lys
 245 250 255

ttt tgg gag tat gaa ggg aac tca atc aac aaa aat gac att tcc aaa 816
 Phe Trp Glu Tyr Glu Gly Asn Ser Ile Asn Lys Asn Asp Ile Ser Lys
 260 265 270

ttt ctg cgg gac act ttt agt att acc ccc aat gag ggt cct ttt agt 864
 Phe Leu Arg Asp Thr Phe Ser Ile Thr Pro Asn Glu Gly Pro Phe Ser
 275 280 285

aga cgt tct gaa tat att gct tac tta aaa act ggc aag aag cca att 912
 Arg Arg Ser Glu Tyr Ile Ala Tyr Leu Lys Thr Gly Lys Lys Pro Ile
 290 295 300

aaa aag aac cat tcc tcc tca gga aac aag cac gac gaa ttg tag 957
 Lys Lys Asn His Ser Ser Ser Gly Asn Lys His Asp Glu Leu
 305 310 315

<210> 123

<211> 318

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 123

Met Leu Phe Leu Asn Ile Ile Lys Leu Leu Leu Gly Leu Phe Ile Met
 1 5 10 15

Asn Glu Val Lys Ala Gln Asn Phe Tyr Asp Ser Asp Pro His Ile Ser
 20 25 30

Glu Leu Thr Pro Lys Ser Phe Asp Lys Ala Ile His Asn Thr Asn Tyr
 35 40 45

Thr Ser Leu Val Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Lys
 50 55 60

Leu Ser Ser Thr Phe Arg Lys Ala Ala Lys Arg Leu Asp Gly Val Val
 65 70 75 80

Gln Val Ala Ala Val Asn Cys Asp Leu Asn Lys Asn Lys Ala Leu Cys
 85 90 95

Ala Lys Tyr Asp Val Asn Gly Phe Pro Thr Leu Met Val Phe Arg Pro
 100 105 110

Pro Lys Ile Asp Leu Ser Lys Pro Ile Asp Asn Ala Lys Lys Ser Phe
 115 120 125

Ser Ala His Ala Asn Glu Val Tyr Ser Gly Ala Arg Thr Leu Ala Pro
 130 135 140

Ile Val Asp Phe Ser Leu Ser Arg Ile Arg Ser Tyr Val Lys Lys Phe
 145 150 155 160

Val Arg Ile Asp Thr Leu Gly Ser Leu Leu Arg Lys Ser Pro Lys Leu
 165 170 175

Ser Val Val Leu Phe Ser Lys Gln Asp Lys Ile Ser Pro Val Tyr Lys
 180 185 190

Ser Ile Ala Leu Asp Trp Leu Gly Lys Phe Asp Phe Tyr Ser Ile Ser
195 200 205

Asn Lys Lys Leu Lys Gln Leu Thr Asp Met Asn Pro Thr Tyr Glu Lys
210 215 220

Thr Pro Glu Ile Phe Lys Tyr Leu Gln Lys Val Ile Pro Glu Gln Arg
225 230 235 240

Gln Ser Asp Lys Ser Lys Leu Val Val Phe Asp Ala Asp Lys Asp Lys
245 250 255

Phe Trp Glu Tyr Glu Gly Asn Ser Ile Asn Lys Asn Asp Ile Ser Lys
260 265 270

Phe Leu Arg Asp Thr Phe Ser Ile Thr Pro Asn Glu Gly Pro Phe Ser
275 280 285

Arg Arg Ser Glu Tyr Ile Ala Tyr Leu Lys Thr Gly Lys Lys Pro Ile
290 295 300

Lys Lys Asn His Ser Ser Ser Gly Asn Lys His Asp Glu Leu
305 310 315

<210> 124

<211> 1134

5 <212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1).. (1134)

<400> 124

atg att cca aaa tta tat ata cat ttg ata cta tct tta ttg ttg ttg	48
Met Ile Pro Lys Leu Tyr Ile His Leu Ile Leu Ser Leu Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
ccg cta att ttg gcg cag gat tat tat gca ata cta gag ata gac aaa	96
Pro Leu Ile Leu Ala Gln Asp Tyr Tyr Ala Ile Leu Glu Ile Asp Lys	
20 25 30	
gat gcc act gag aag gaa atc aaa tca gcg tac aga caa ttg tct aag	144
Asp Ala Thr Glu Lys Glu Ile Lys Ser Ala Tyr Arg Gln Leu Ser Lys	
35 40 45	
aag tac cat ccg gat aaa aat gct ggg agc gaa gaa gcc cat caa aaa	192
Lys Tyr His Pro Asp Lys Asn Ala Gly Ser Glu Glu Ala His Gln Lys	
50 55 60	
ttc att gaa gtc ggc gag gca tac gat gta ttg agc gat cct gaa aag	240
Phe Ile Glu Val Gly Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Glu Lys	
65 70 75 80	
aaa aag att tat gac cag ttt ggt gca gat gct gta aag aat ggc ggt	288
Lys Lys Ile Tyr Asp Gln Phe Gly Ala Asp Ala Val Lys Asn Gly Gly	
85 90 95	
ggc ggt ggc ggt cca gga ggc cct ggc gca ggt gga ttc cac gat ccg	336
Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ala Gly Gly Phe His Asp Pro	
100 105 110	
ttt gac ata ttc gaa cgg atg ttt caa gga ggt cat gga ggt cct ggc	384
Phe Asp Ile Phe Glu Arg Met Phe Gln Gly Gly His Gly Gly Pro Gly	
115 120 125	
ggc gga ttt ggc cag aga cag agg cag cgt ggt cca atg atc aag gtc	432
Gly Gly Phe Gly Gln Arg Gln Arg Gln Arg Gly Pro Met Ile Lys Val	
130 135 140	
cag gaa aaa cta tct tta aag cag ttt tat tcc ggg tcc tcg ata gaa	480
Gln Glu Lys Leu Ser Leu Lys Gln Phe Tyr Ser Gly Ser Ser Ile Glu	
145 150 155 160	
ttt act tta aac cta aac gat gaa tgt gat gca tgc cat ggt agt ggc	528

Phe Thr Leu Asn Leu Asn Asp Glu Cys Asp Ala Cys His Gly Ser Gly	
165 170 175	
tct gca gat ggt aag ctg gcc caa tgt ccc gat tgt caa ggt cgt ggg	576
Ser Ala Asp Gly Lys Leu Ala Gln Cys Pro Asp Cys Gln Gly Arg Gly	
180 185 190	
ggt ata ata caa gtg ctg cgc atg ggt att atg acg cag cag att caa	624
Val Ile Ile Gln Val Leu Arg Met Gly Ile Met Thr Gln Gln Ile Gln	
195 200 205	
cag atg tgt ggt agg tgt ggt ggt acg gga caa att atc aaa aat gaa	672
Gln Met Cys Gly Arg Cys Gly Gly Thr Gly Gln Ile Ile Lys Asn Glu	
210 215 220	
tgc aaa aca tgt cac ggc aaa aaa gtt acc aaa aag aac aag ttc ttc	720
Cys Lys Thr Cys His Gly Lys Lys Val Thr Lys Lys Asn Lys Phe Phe	
225 230 235 240	
cac gtt gac gtt cca cca ggc gca cca aga aac tac atg gac aca aga	768
His Val Asp Val Pro Pro Gly Ala Pro Arg Asn Tyr Met Asp Thr Arg	
245 250 255	
gtc ggc gag gct gaa aaa ggg cct gac ttt gac gcc ggt gac ttg gtc	816
Val Gly Glu Ala Glu Lys Gly Pro Asp Phe Asp Ala Gly Asp Leu Val	
260 265 270	
ata gaa ttc aag gaa aag gat act gag aac atg ggt tac aga aga aga	864
Ile Glu Phe Lys Glu Lys Asp Thr Glu Asn Met Gly Tyr Arg Arg Arg	
275 280 285	
ggc gac aat ctg tac aga aca gaa gtt ctt tct gct gcg gaa gcg cta	912
Gly Asp Asn Leu Tyr Arg Thr Glu Val Leu Ser Ala Ala Glu Ala Leu	
290 295 300	
tac ggc gga tgg caa aga acg ata gaa ttc ctt gat gag aac aag ccc	960
Tyr Gly Gly Trp Gln Arg Thr Ile Glu Phe Leu Asp Glu Asn Lys Pro	
305 310 315 320	
ggt aag tta tct aga ccc gct cat gta gtt gtc tcc aat ggc gaa gtt	1008
Val Lys Leu Ser Arg Pro Ala His Val Val Val Ser Asn Gly Glu Val	
325 330 335	

gaa gtc gtg aag gga ttc ggc atg ccc aag ggt agc aag ggt tac ggt 1056
 Glu Val Val Lys Gly Phe Gly Met Pro Lys Gly Ser Lys Gly Tyr Gly
 340 345 350

gat ttg tac ata gac tac gtc gtt gtc atg cca aag act ttc aaa tct 1104
 Asp Leu Tyr Ile Asp Tyr Val Val Val Met Pro Lys Thr Phe Lys Ser
 355 360 365

ggg caa aat atg ctc aaa gat gag ttg tag 1134
 Gly Gln Asn Met Leu Lys Asp Glu Leu
 370 375

<210> 125

<211> 377

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 125

Met Ile Pro Lys Leu Tyr Ile His Leu Ile Leu Ser Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Leu Ile Leu Ala Gln Asp Tyr Tyr Ala Ile Leu Glu Ile Asp Lys
 20 25 30

Asp Ala Thr Glu Lys Glu Ile Lys Ser Ala Tyr Arg Gln Leu Ser Lys
 35 40 45

Lys Tyr His Pro Asp Lys Asn Ala Gly Ser Glu Glu Ala His Gln Lys
 50 55 60

Phe Ile Glu Val Gly Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Glu Lys
 65 70 75 80

Lys Lys Ile Tyr Asp Gln Phe Gly Ala Asp Ala Val Lys Asn Gly Gly

85	90	95
Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ala Gly Gly Phe His Asp Pro		
100	105	110
Phe Asp Ile Phe Glu Arg Met Phe Gln Gly Gly His Gly Gly Pro Gly		
115	120	125
Gly Gly Phe Gly Gln Arg Gln Arg Gln Arg Gly Pro Met Ile Lys Val		
130	135	140
Gln Glu Lys Leu Ser Leu Lys Gln Phe Tyr Ser Gly Ser Ser Ile Glu		
145	150	155
Phe Thr Leu Asn Leu Asn Asp Glu Cys Asp Ala Cys His Gly Ser Gly		
165	170	175
Ser Ala Asp Gly Lys Leu Ala Gln Cys Pro Asp Cys Gln Gly Arg Gly		
180	185	190
Val Ile Ile Gln Val Leu Arg Met Gly Ile Met Thr Gln Gln Ile Gln		
195	200	205
Gln Met Cys Gly Arg Cys Gly Gly Thr Gly Gln Ile Ile Lys Asn Glu		
210	215	220
Cys Lys Thr Cys His Gly Lys Lys Val Thr Lys Lys Asn Lys Phe Phe		
225	230	235
His Val Asp Val Pro Pro Gly Ala Pro Arg Asn Tyr Met Asp Thr Arg		
245	250	255

Val Gly Glu Ala Glu Lys Gly Pro Asp Phe Asp Ala Gly Asp Leu Val
 260 265 270

Ile Glu Phe Lys Glu Lys Asp Thr Glu Asn Met Gly Tyr Arg Arg Arg
 275 280 285

Gly Asp Asn Leu Tyr Arg Thr Glu Val Leu Ser Ala Ala Glu Ala Leu
 290 295 300

Tyr Gly Gly Trp Gln Arg Thr Ile Glu Phe Leu Asp Glu Asn Lys Pro
 305 310 315 320

Val Lys Leu Ser Arg Pro Ala His Val Val Val Ser Asn Gly Glu Val
 325 330 335

Glu Val Val Lys Gly Phe Gly Met Pro Lys Gly Ser Lys Gly Tyr Gly
 340 345 350

Asp Leu Tyr Ile Asp Tyr Val Val Val Met Pro Lys Thr Phe Lys Ser
 355 360 365

Gly Gln Asn Met Leu Lys Asp Glu Leu
 370 375

<210> 126

<211> 1692

5 <212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1692)

<400> 126

atg aga tta aga acc gcc att gcc aca ctg tgc ctc acg gct ttt aca	48
Met Arg Leu Arg Thr Ala Ile Ala Thr Leu Cys Leu Thr Ala Phe Thr	
1 5 10 15	
tct gca act tca aac aat agc tac atc gcc acc gac caa aca caa aat	96
Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Tyr Ile Ala Thr Asp Gln Thr Gln Asn	
20 25 30	
gcc ttt aat gac act cac ttt tgt aag gtc gac agg aat gat cac gtt	144
Ala Phe Asn Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asp Arg Asn Asp His Val	
35 40 45	
agt ccc agt tgt aac gta aca ttc aat gaa tta aat gcc ata aat gaa	192
Ser Pro Ser Cys Asn Val Thr Phe Asn Glu Leu Asn Ala Ile Asn Glu	
50 55 60	
aac att aga gat gat ctt tcg gcg tta tta aaa tct gat ttc ttc aaa	240
Asn Ile Arg Asp Asp Leu Ser Ala Leu Leu Lys Ser Asp Phe Phe Lys	
65 70 75 80	
tac ttt cgg ctg gat tta tac aag caa tgt tca ttt tgg gac gcc aac	288
Tyr Phe Arg Leu Asp Leu Tyr Lys Gln Cys Ser Phe Trp Asp Ala Asn	
85 90 95	
gat ggt ctg tgc tta aac cgc gct tgc tct gtt gat gtc gta gag gac	336
Asp Gly Leu Cys Leu Asn Arg Ala Cys Ser Val Asp Val Val Glu Asp	
100 105 110	
tgg gat aca ctg cct gag tac tgg cag cct gag atc ttg ggt agt ttc	384
Trp Asp Thr Leu Pro Glu Tyr Trp Gln Pro Glu Ile Leu Gly Ser Phe	
115 120 125	
aat aat gat aca atg aag gaa gcg gat gat agc gat gac gaa tgt aag	432
Asn Asn Asp Thr Met Lys Glu Ala Asp Asp Ser Asp Asp Glu Cys Lys	
130 135 140	
ttc tta gat caa cta tgt caa acc agt aaa aaa cct gta gat atc gaa	480
Phe Leu Asp Gln Leu Cys Gln Thr Ser Lys Lys Pro Val Asp Ile Glu	
145 150 155 160	

gac acc atc aac tac tgt gat gta aat gac ttt aac ggt aaa aac gcc	528
Asp Thr Ile Asn Tyr Cys Asp Val Asn Asp Phe Asn Gly Lys Asn Ala	
165 170 175	
ggt ctg att gat tta aca gca aat ccg gaa cga ttt aca ggt tat ggt	576
Val Leu Ile Asp Leu Thr Ala Asn Pro Glu Arg Phe Thr Gly Tyr Gly	
180 185 190	
ggt aag caa gct ggt caa att tgg tct act atc tac caa gac aac tgt	624
Gly Lys Gln Ala Gly Gln Ile Trp Ser Thr Ile Tyr Gln Asp Asn Cys	
195 200 205	
ttt aca att ggc gaa act ggt gaa tca ttg gcc aaa gat gca ttt tat	672
Phe Thr Ile Gly Glu Thr Gly Glu Ser Leu Ala Lys Asp Ala Phe Tyr	
210 215 220	
aga ctt gta tcc ggt ttc cat gcc tct atc ggt act cac tta tca aag	720
Arg Leu Val Ser Gly Phe His Ala Ser Ile Gly Thr His Leu Ser Lys	
225 230 235 240	
gaa tat ttg aac acg aaa act ggt aaa tgg gag ccc aat ctg gat ttg	768
Glu Tyr Leu Asn Thr Lys Thr Gly Lys Trp Glu Pro Asn Leu Asp Leu	
245 250 255	
ttt atg gca aga atc ggg aac ttt cct gat aga gtg aca aac atg tat	816
Phe Met Ala Arg Ile Gly Asn Phe Pro Asp Arg Val Thr Asn Met Tyr	
260 265 270	
ttc aat tat gct gtt gta gct aag gct ctc tgg aaa att caa cca tat	864
Phe Asn Tyr Ala Val Val Ala Lys Ala Leu Trp Lys Ile Gln Pro Tyr	
275 280 285	
tta cca gaa ttt tca ttc tgt gat cta gtc aat aaa gaa atc aaa aac	912
Leu Pro Glu Phe Ser Phe Cys Asp Leu Val Asn Lys Glu Ile Lys Asn	
290 295 300	
aaa atg gat aac gtt att tcc cag ctg gac aca aaa att ttt aac gaa	960
Lys Met Asp Asn Val Ile Ser Gln Leu Asp Thr Lys Ile Phe Asn Glu	
305 310 315 320	
gac tta gtt ttt gcc aac gac cta agt ttg act ttg aag gac gaa ttc	1008
Asp Leu Val Phe Ala Asn Asp Leu Ser Leu Thr Leu Lys Asp Glu Phe	

325	330	335	
aga tct cgc ttc aag aat gtc acg aag att atg gat tgt gtg caa tgt			1056
Arg Ser Arg Phe Lys Asn Val Thr Lys Ile Met Asp Cys Val Gln Cys			
340	345	350	
gat aga tgt aga ttg tgg ggc aaa att caa act acc ggt tac gca act			1104
Asp Arg Cys Arg Leu Trp Gly Lys Ile Gln Thr Thr Gly Tyr Ala Thr			
355	360	365	
gcc ttg aaa att ttg ttt gaa atc aac gac gct gat gaa ttc acc aaa			1152
Ala Leu Lys Ile Leu Phe Glu Ile Asn Asp Ala Asp Glu Phe Thr Lys			
370	375	380	
caa cat att gtt ggt aag tta acc aaa tat gag ttg att gca cta tta			1200
Gln His Ile Val Gly Lys Leu Thr Lys Tyr Glu Leu Ile Ala Leu Leu			
385	390	395	400
cag act ttc ggt aga tta tct gaa tct att gaa tct gtt aac atg ttc			1248
Gln Thr Phe Gly Arg Leu Ser Glu Ser Ile Glu Ser Val Asn Met Phe			
405	410	415	
gaa aaa atg tac ggg aaa agg tta aac ggt tct gaa aac agg tta agc			1296
Glu Lys Met Tyr Gly Lys Arg Leu Asn Gly Ser Glu Asn Arg Leu Ser			
420	425	430	
tca ttc ttc caa aat aac ttc ttc aac att ttg aag gag gca ggc aaa			1344
Ser Phe Phe Gln Asn Asn Phe Phe Asn Ile Leu Lys Glu Ala Gly Lys			
435	440	445	
tcg att cgt tac acc ata gag aac atc aat tcc act aaa gaa gga aag			1392
Ser Ile Arg Tyr Thr Ile Glu Asn Ile Asn Ser Thr Lys Glu Gly Lys			
450	455	460	
aaa aag act aac aat tct caa tca cat gta ttt gat gat tta aaa atg			1440
Lys Lys Thr Asn Asn Ser Gln Ser His Val Phe Asp Asp Leu Lys Met			
465	470	475	480
ccc aaa gca gaa ata gtt cca agg ccc tct aac ggt aca gta aat aaa			1488
Pro Lys Ala Glu Ile Val Pro Arg Pro Ser Asn Gly Thr Val Asn Lys			
485	490	495	

tgg aag aaa gct tgg aat act gaa gtt aac aac gtt tta gaa gca ttc 1536
 Trp Lys Lys Ala Trp Asn Thr Glu Val Asn Asn Val Leu Glu Ala Phe
 500 505 510

aga ttt att tat aga agc tat ttg gat tta ccc agg aac atc tgg gaa 1584
 Arg Phe Ile Tyr Arg Ser Tyr Leu Asp Leu Pro Arg Asn Ile Trp Glu
 515 520 525

tta tct ttg atg aag gta tac aaa ttt tgg aat aaa ttc atc ggt gtt 1632
 Leu Ser Leu Met Lys Val Tyr Lys Phe Trp Asn Lys Phe Ile Gly Val
 530 535 540

gct gat tac gtt agt gag gag aca cga gag cct att tcc tat aag cta 1680
 Ala Asp Tyr Val Ser Glu Glu Thr Arg Glu Pro Ile Ser Tyr Lys Leu
 545 550 555 560

gat ata caa taa 1692
 Asp Ile Gln

<210> 127
 <211> 563
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 127

Met Arg Leu Arg Thr Ala Ile Ala Thr Leu Cys Leu Thr Ala Phe Thr
 1 5 10 15

Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Tyr Ile Ala Thr Asp Gln Thr Gln Asn
 20 25 30

Ala Phe Asn Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asp Arg Asn Asp His Val
 35 40 45

Ser Pro Ser Cys Asn Val Thr Phe Asn Glu Leu Asn Ala Ile Asn Glu
 50 55 60

5

Asn Ile Arg Asp Asp Leu Ser Ala Leu Leu Lys Ser Asp Phe Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Phe Arg Leu Asp Leu Tyr Lys Gln Cys Ser Phe Trp Asp Ala Asn
85 90 95

Asp Gly Leu Cys Leu Asn Arg Ala Cys Ser Val Asp Val Val Glu Asp
100 105 110

Trp Asp Thr Leu Pro Glu Tyr Trp Gln Pro Glu Ile Leu Gly Ser Phe
115 120 125

Asn Asn Asp Thr Met Lys Glu Ala Asp Asp Ser Asp Asp Glu Cys Lys
130 135 140

Phe Leu Asp Gln Leu Cys Gln Thr Ser Lys Lys Pro Val Asp Ile Glu
145 150 155 160

Asp Thr Ile Asn Tyr Cys Asp Val Asn Asp Phe Asn Gly Lys Asn Ala
165 170 175

Val Leu Ile Asp Leu Thr Ala Asn Pro Glu Arg Phe Thr Gly Tyr Gly
180 185 190

Gly Lys Gln Ala Gly Gln Ile Trp Ser Thr Ile Tyr Gln Asp Asn Cys
195 200 205

Phe Thr Ile Gly Glu Thr Gly Glu Ser Leu Ala Lys Asp Ala Phe Tyr
210 215 220

Arg Leu Val Ser Gly Phe His Ala Ser Ile Gly Thr His Leu Ser Lys
225 230 235 240

Glu Tyr Leu Asn Thr Lys Thr Gly Lys Trp Glu Pro Asn Leu Asp Leu
245 250 255

Phe Met Ala Arg Ile Gly Asn Phe Pro Asp Arg Val Thr Asn Met Tyr
260 265 270

Phe Asn Tyr Ala Val Val Ala Lys Ala Leu Trp Lys Ile Gln Pro Tyr
275 280 285

Leu Pro Glu Phe Ser Phe Cys Asp Leu Val Asn Lys Glu Ile Lys Asn
290 295 300

Lys Met Asp Asn Val Ile Ser Gln Leu Asp Thr Lys Ile Phe Asn Glu
305 310 315 320

Asp Leu Val Phe Ala Asn Asp Leu Ser Leu Thr Leu Lys Asp Glu Phe
325 330 335

Arg Ser Arg Phe Lys Asn Val Thr Lys Ile Met Asp Cys Val Gln Cys
340 345 350

Asp Arg Cys Arg Leu Trp Gly Lys Ile Gln Thr Thr Gly Tyr Ala Thr
355 360 365

Ala Leu Lys Ile Leu Phe Glu Ile Asn Asp Ala Asp Glu Phe Thr Lys
370 375 380

Gln His Ile Val Gly Lys Leu Thr Lys Tyr Glu Leu Ile Ala Leu Leu
385 390 395 400

Gln Thr Phe Gly Arg Leu Ser Glu Ser Ile Glu Ser Val Asn Met Phe
 405 410 415

Glu Lys Met Tyr Gly Lys Arg Leu Asn Gly Ser Glu Asn Arg Leu Ser
 420 425 430

Ser Phe Phe Gln Asn Asn Phe Phe Asn Ile Leu Lys Glu Ala Gly Lys
 435 440 445

Ser Ile Arg Tyr Thr Ile Glu Asn Ile Asn Ser Thr Lys Glu Gly Lys
 450 455 460

Lys Lys Thr Asn Asn Ser Gln Ser His Val Phe Asp Asp Leu Lys Met
 465 470 475 480

Pro Lys Ala Glu Ile Val Pro Arg Pro Ser Asn Gly Thr Val Asn Lys
 485 490 495

Trp Lys Lys Ala Trp Asn Thr Glu Val Asn Asn Val Leu Glu Ala Phe
 500 505 510

Arg Phe Ile Tyr Arg Ser Tyr Leu Asp Leu Pro Arg Asn Ile Trp Glu
 515 520 525

Leu Ser Leu Met Lys Val Tyr Lys Phe Trp Asn Lys Phe Ile Gly Val
 530 535 540

Ala Asp Tyr Val Ser Glu Glu Thr Arg Glu Pro Ile Ser Tyr Lys Leu
 545 550 555 560
 Asp Ile Gln

<210> 128

5 <211> 408

<212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(408)

<400> 128
 atg atg ttt aat att tac ctt ttc gtc act ttt ttt tcc acc att ctt 48
 Met Met Phe Asn Ile Tyr Leu Phe Val Thr Phe Phe Ser Thr Ile Leu
 1 5 10 15

 gca ggt tcc ctg tca gat ttg gaa atc ggt att atc aag aga ata ccg 96
 Ala Gly Ser Leu Ser Asp Leu Glu Ile Gly Ile Ile Lys Arg Ile Pro
 20 25 30

 gta gaa gat tgc tta att aag gca atg cca ggt gat aaa gtt aag gtt 144
 Val Glu Asp Cys Leu Ile Lys Ala Met Pro Gly Asp Lys Val Lys Val
 35 40 45

 cat tat aca gga tct tta tta gaa tcg gga act gta ttt gac tca agt 192
 His Tyr Thr Gly Ser Leu Leu Glu Ser Gly Thr Val Phe Asp Ser Ser
 50 55 60

 tat tca aga ggc tct cct atc gct ttt gaa ctt ggc gtt ggc aga gta 240
 Tyr Ser Arg Gly Ser Pro Ile Ala Phe Glu Leu Gly Val Gly Arg Val
 65 70 75 80

 att aaa ggt tgg gat caa ggt gtt gcc ggc atg tgc gtt ggc gaa aaa 288
 Ile Lys Gly Trp Asp Gln Gly Val Ala Gly Met Cys Val Gly Glu Lys
 85 90 95

 aga aag ctg caa att cca agt tct ttg gcc tac gga gaa aga ggt gtc 336
 Arg Lys Leu Gln Ile Pro Ser Ser Leu Ala Tyr Gly Glu Arg Gly Val
 100 105 110

 cca ggc gtc att cct cca agt gct gat ttg gtg ttt gat gtc gaa ttg 384
 Pro Gly Val Ile Pro Pro Ser Ala Asp Leu Val Phe Asp Val Glu Leu
 115 120 125

 gta gac gtg aaa tca gcc gcc tag 408
 Val Asp Val Lys Ser Ala Ala
 130 135

<210> 129
 <211> 135
 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 129

Met Met Phe Asn Ile Tyr Leu Phe Val Thr Phe Phe Ser Thr Ile Leu
1 5 10 15

Ala Gly Ser Leu Ser Asp Leu Glu Ile Gly Ile Ile Lys Arg Ile Pro
20 25 30

Val Glu Asp Cys Leu Ile Lys Ala Met Pro Gly Asp Lys Val Lys Val
35 40 45

His Tyr Thr Gly Ser Leu Leu Glu Ser Gly Thr Val Phe Asp Ser Ser
50 55 60

Tyr Ser Arg Gly Ser Pro Ile Ala Phe Glu Leu Gly Val Gly Arg Val
65 70 75 80

Ile Lys Gly Trp Asp Gln Gly Val Ala Gly Met Cys Val Gly Glu Lys
85 90 95

Arg Lys Leu Gln Ile Pro Ser Ser Leu Ala Tyr Gly Glu Arg Gly Val
100 105 110

Pro Gly Val Ile Pro Pro Ser Ala Asp Leu Val Phe Asp Val Glu Leu
115 120 125

Val Asp Val Lys Ser Ala Ala
130 135

<210> 130

<211> 1938

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1938)

<400> 130

atg	ata	ctg	atc	tcg	gga	tac	tgt	ctt	tta	gtg	tat	agc	ggt	att	ttg	48
Met	Ile	Leu	Ile	Ser	Gly	Tyr	Cys	Leu	Leu	Val	Tyr	Ser	Val	Ile	Leu	
1				5					10					15		

cca	gta	ctg	ata	tcg	gct	tct	aag	tta	tgt	gat	ttg	gct	gag	tta	caa	96
Pro	Val	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	Lys	Leu	Cys	Asp	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	
		20						25					30			

cga	ttg	aac	aag	aat	tta	aaa	gta	gac	act	gaa	tcc	ttg	cca	aaa	tac	144
Arg	Leu	Asn	Lys	Asn	Leu	Lys	Val	Asp	Thr	Glu	Ser	Leu	Pro	Lys	Tyr	
		35					40					45				

caa	tgg	atc	gct	ggg	cag	ttg	gaa	caa	aac	tgc	atg	act	gog	gat	cca	192
Gln	Trp	Ile	Ala	Gly	Gln	Leu	Glu	Gln	Asn	Cys	Met	Thr	Ala	Asp	Pro	
	50					55					60					

gca	agt	gaa	aat	atg	tca	gac	gta	att	caa	cta	gcc	aat	caa	ata	tac	240
Ala	Ser	Glu	Asn	Met	Ser	Asp	Val	Ile	Gln	Leu	Ala	Asn	Gln	Ile	Tyr	
65					70					75				80		

tac aaa att ggg ctg atc caa tta tcc aac gat caa cat cta aga gct Tyr Lys Ile Gly Leu Ile Gln Leu Ser Asn Asp Gln His Leu Arg Ala 85 90 95	288
att aac aca ttt gaa aaa atc gtt ttt aat gaa act tac aaa ggt tct Ile Asn Thr Phe Glu Lys Ile Val Phe Asn Glu Thr Tyr Lys Gly Ser 100 105 110	336
ttt ggg aag ctg gcg gaa aag agg cta caa gag ctg tat gtc gat ttt Phe Gly Lys Leu Ala Glu Lys Arg Leu Gln Glu Leu Tyr Val Asp Phe 115 120 125	384
ggg atg tgg gac aag gtg cat cag aag gat gat cag tat gcg aaa tat Gly Met Trp Asp Lys Val His Gln Lys Asp Asp Gln Tyr Ala Lys Tyr 130 135 140	432
ctg tcc ttg aat gaa acc atc aga aac aaa ata tca tcc aaa gac gtt Leu Ser Leu Asn Glu Thr Ile Arg Asn Lys Ile Ser Ser Lys Asp Val 145 150 155 160	480
tct gtg gag gaa gat att tct gag ctg cta cgc ata acg ccg tac gat Ser Val Glu Glu Asp Ile Ser Glu Leu Leu Arg Ile Thr Pro Tyr Asp 165 170 175	528
gtt aac gtc ctc tcc acg cac atc gat gtt ctt ttt cac aaa cta gct Val Asn Val Leu Ser Thr His Ile Asp Val Leu Phe His Lys Leu Ala 180 185 190	576
gaa gaa att gac gtt tcg tta gct gct gct atc att ttg gat tac gaa Glu Glu Ile Asp Val Ser Leu Ala Ala Ala Ile Ile Leu Asp Tyr Glu 195 200 205	624
aca atc ctc gac aag cat ttg gct agc tta agc ata gat aca aga ctt Thr Ile Leu Asp Lys His Leu Ala Ser Leu Ser Ile Asp Thr Arg Leu 210 215 220	672
tcg att cat tat gtc ata tct gtt tta cag acc ttt gta ctt aac tca Ser Ile His Tyr Val Ile Ser Val Leu Gln Thr Phe Val Leu Asn Ser 225 230 235 240	720
gat gcg tcg ttc aat ata aga aaa tgc ctt tcc att gat atg gac tat Asp Ala Ser Phe Asn Ile Arg Lys Cys Leu Ser Ile Asp Met Asp Tyr	768

245	250	255	
gat aaa tgt aaa aaa cta agc ctg act att tcc aaa ttg aac aag gtg			816
Asp Lys Cys Lys Lys Leu Ser Leu Thr Ile Ser Lys Leu Asn Lys Val			
260	265	270	
aat cca tca aaa aga cag atc ctg gat cca gca aca tat gca ttt gag			864
Asn Pro Ser Lys Arg Gln Ile Leu Asp Pro Ala Thr Tyr Ala Phe Glu			
275	280	285	
aac aaa aag ttt aga agt tgg gat aga att att gaa ttt tat ttg aag			912
Asn Lys Lys Phe Arg Ser Trp Asp Arg Ile Ile Glu Phe Tyr Leu Lys			
290	295	300	
gat aag aag cca ttt att aca cca atg aaa att ctt aac aaa gat aca			960
Asp Lys Lys Pro Phe Ile Thr Pro Met Lys Ile Leu Asn Lys Asp Thr			
305	310	315	320
aac ttt aaa aac aac tac ttc ttt tta gag gaa att atc aaa caa ttg			1008
Asn Phe Lys Asn Asn Tyr Phe Phe Leu Glu Glu Ile Ile Lys Gln Leu			
325	330	335	
ata gaa gac gtt caa ctg tgg aga cct ttg gca aaa aat tta ttc gaa			1056
Ile Glu Asp Val Gln Leu Ser Arg Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe Glu			
340	345	350	
gat ccc cca ata acc gat ggt ttt gtc aaa cca aaa tca tac tat cat			1104
Asp Pro Pro Ile Thr Asp Gly Phe Val Lys Pro Lys Ser Tyr Tyr His			
355	360	365	
acc gat tat cta gta tac att gat tcc att ctt tgt cag gct tct agc			1152
Thr Asp Tyr Leu Val Tyr Ile Asp Ser Ile Leu Cys Gln Ala Ser Ser			
370	375	380	
atg agt ccg gac gtc aag aga gct aaa ctg gct gcg ccg ttc tgt aaa			1200
Met Ser Pro Asp Val Lys Arg Ala Lys Leu Ala Ala Pro Phe Cys Lys			
385	390	395	400
aag agt ttg agg cat tca cta aca cta gaa aca tgg aaa cac tat cag			1248
Lys Ser Leu Arg His Ser Leu Thr Leu Glu Thr Trp Lys His Tyr Gln			
405	410	415	

gat gct aag tcc gag caa aaa cct tta cct gag acg gta ttg agt gat	1296
Asp Ala Lys Ser Glu Gln Lys Pro Leu Pro Glu Thr Val Leu Ser Asp	
420 425 430	
gta tgg aat tcc aat cct cat ttg ctg atg tat atg gta aac tca ata	1344
Val Trp Asn Ser Asn Pro His Leu Leu Met Tyr Met Val Asn Ser Ile	
435 440 445	
ctt aat aaa agt agg tct aaa cct cat tca cag ttc aaa aag caa tta	1392
Leu Asn Lys Ser Arg Ser Lys Pro His Ser Gln Phe Lys Lys Gln Leu	
450 455 460	
tat gac cag ata aac aaa ttt ttc caa gat aac ggc ctc tca gag tcg	1440
Tyr Asp Gln Ile Asn Lys Phe Phe Gln Asp Asn Gly Leu Ser Glu Ser	
465 470 475 480	
acc aat cca tac gtg atg aag aac ttc cga tta tta cag aaa caa tta	1488
Thr Asn Pro Tyr Val Met Lys Asn Phe Arg Leu Leu Gln Lys Gln Leu	
485 490 495	
caa acc tat aaa gag cat aaa cat cgg aat ttc aac cag caa tat ttc	1536
Gln Thr Tyr Lys Glu His Lys His Arg Asn Phe Asn Gln Gln Tyr Phe	
500 505 510	
caa caa caa caa cag cag caa caa cac caa cga cat caa gca ccc cca	1584
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Gln Arg His Gln Ala Pro Pro	
515 520 525	
gca gcg cct aac tac gac cca aaa aag gac tat tat aaa att ctt gga	1632
Ala Ala Pro Asn Tyr Asp Pro Lys Lys Asp Tyr Tyr Lys Ile Leu Gly	
530 535 540	
gta tcg cct agt gct agt tcg aaa gaa ata agg aaa gca tat tta aat	1680
Val Ser Pro Ser Ala Ser Ser Lys Glu Ile Arg Lys Ala Tyr Leu Asn	
545 550 555 560	
tta acc aaa aaa tac cac cca gac aaa ata aag gcc aac cat aac gac	1728
Leu Thr Lys Lys Tyr His Pro Asp Lys Ile Lys Ala Asn His Asn Asp	
565 570 575	
aaa caa gaa tca att cac gaa act atg tca caa atc aat gaa gcg tac	1776
Lys Gln Glu Ser Ile His Glu Thr Met Ser Gln Ile Asn Glu Ala Tyr	

580	585	590	
gaa aca tta agt gat gac gat aaa agg aag gaa tac gat ctt tcc aga			1824
Glu Thr Leu Ser Asp Asp Asp Lys Arg Lys Glu Tyr Asp Leu Ser Arg			
595	600	605	

tca aac ccc cgc cgc aac act ttt cct cag ggg cct agg caa aat aac	1872
Ser Asn Pro Arg Arg Asn Thr Phe Pro Gln Gly Pro Arg Gln Asn Asn	
610 615 620	

atg ttc aaa aat cca gga agt ggc ttc cca ttc gga aat ggc ttt aaa	1920
Met Phe Lys Asn Pro Gly Ser Gly Phe Pro Phe Gly Asn Gly Phe Lys	
625 630 635 640	

atg aat ttt ggg ctt tga	1938
Met Asn Phe Gly Leu	
645	

<210> 131
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 131
Met Ile Leu Ile Ser Gly Tyr Cys Leu Leu Val Tyr Ser Val Ile Leu
1 5 10 15

Pro Val Leu Ile Ser Ala Ser Lys Leu Cys Asp Leu Ala Glu Leu Gln
20 25 30

Arg Leu Asn Lys Asn Leu Lys Val Asp Thr Glu Ser Leu Pro Lys Tyr
35 40 45

Gln Trp Ile Ala Gly Gln Leu Glu Gln Asn Cys Met Thr Ala Asp Pro
50 55 60

Ala Ser Glu Asn Met Ser Asp Val Ile Gln Leu Ala Asn Gln Ile Tyr
65 70 75 80

Tyr Lys Ile Gly Leu Ile Gln Leu Ser Asn Asp Gln His Leu Arg Ala
85 90 95

Ile Asn Thr Phe Glu Lys Ile Val Phe Asn Glu Thr Tyr Lys Gly Ser
100 105 110

Phe Gly Lys Leu Ala Glu Lys Arg Leu Gln Glu Leu Tyr Val Asp Phe
115 120 125

Gly Met Trp Asp Lys Val His Gln Lys Asp Asp Gln Tyr Ala Lys Tyr
130 135 140

Leu Ser Leu Asn Glu Thr Ile Arg Asn Lys Ile Ser Ser Lys Asp Val
145 150 155 160

Ser Val Glu Glu Asp Ile Ser Glu Leu Leu Arg Ile Thr Pro Tyr Asp
165 170 175

Val Asn Val Leu Ser Thr His Ile Asp Val Leu Phe His Lys Leu Ala
180 185 190

Glu Glu Ile Asp Val Ser Leu Ala Ala Ala Ile Ile Leu Asp Tyr Glu
195 200 205

Thr Ile Leu Asp Lys His Leu Ala Ser Leu Ser Ile Asp Thr Arg Leu
210 215 220

Ser Ile His Tyr Val Ile Ser Val Leu Gln Thr Phe Val Leu Asn Ser
225 230 235 240

Asp Ala Ser Phe Asn Ile Arg Lys Cys Leu Ser Ile Asp Met Asp Tyr
245 250 255

Asp Lys Cys Lys Lys Leu Ser Leu Thr Ile Ser Lys Leu Asn Lys Val
260 265 270

Asn Pro Ser Lys Arg Gln Ile Leu Asp Pro Ala Thr Tyr Ala Phe Glu
275 280 285

Asn Lys Lys Phe Arg Ser Trp Asp Arg Ile Ile Glu Phe Tyr Leu Lys
290 295 300

Asp Lys Lys Pro Phe Ile Thr Pro Met Lys Ile Leu Asn Lys Asp Thr
305 310 315 320

Asn Phe Lys Asn Asn Tyr Phe Phe Leu Glu Glu Ile Ile Lys Gln Leu
325 330 335

Ile Glu Asp Val Gln Leu Ser Arg Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe Glu
340 345 350

Asp Pro Pro Ile Thr Asp Gly Phe Val Lys Pro Lys Ser Tyr Tyr His
355 360 365

Thr Asp Tyr Leu Val Tyr Ile Asp Ser Ile Leu Cys Gln Ala Ser Ser
370 375 380

Met Ser Pro Asp Val Lys Arg Ala Lys Leu Ala Ala Pro Phe Cys Lys
385 390 395 400

Lys Ser Leu Arg His Ser Leu Thr Leu Glu Thr Trp Lys His Tyr Gln
405 410 415

Asp Ala Lys Ser Glu Gln Lys Pro Leu Pro Glu Thr Val Leu Ser Asp
420 425 430

Val Trp Asn Ser Asn Pro His Leu Leu Met Tyr Met Val Asn Ser Ile
435 440 445

Leu Asn Lys Ser Arg Ser Lys Pro His Ser Gln Phe Lys Lys Gln Leu
450 455 460

Tyr Asp Gln Ile Asn Lys Phe Phe Gln Asp Asn Gly Leu Ser Glu Ser
465 470 475 480

Thr Asn Pro Tyr Val Met Lys Asn Phe Arg Leu Leu Gln Lys Gln Leu
485 490 495

Gln Thr Tyr Lys Glu His Lys His Arg Asn Phe Asn Gln Gln Tyr Phe
500 505 510

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Gln Arg His Gln Ala Pro Pro
515 520 525

Ala Ala Pro Asn Tyr Asp Pro Lys Lys Asp Tyr Tyr Lys Ile Leu Gly
530 535 540

Val Ser Pro Ser Ala Ser Ser Lys Glu Ile Arg Lys Ala Tyr Leu Asn
545 550 555 560

Leu Thr Lys Lys Tyr His Pro Asp Lys Ile Lys Ala Asn His Asn Asp
565 570 575

Lys Gln Glu Ser Ile His Glu Thr Met Ser Gln Ile Asn Glu Ala Tyr
580 585 590

Glu Thr Leu Ser Asp Asp Asp Lys Arg Lys Glu Tyr Asp Leu Ser Arg
595 600 605

Ser Asn Pro Arg Arg Asn Thr Phe Pro Gln Gly Pro Arg Gln Asn Asn
610 615 620

Met Phe Lys Asn Pro Gly Ser Gly Phe Pro Phe Gly Asn Gly Phe Lys
625 630 635 640

Met Asn Phe Gly Leu
645

<210> 132
<211> 2646
5 <212> ADN
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
<221> CDS
10 <222> (1).. (2646)

<400> 132
atg cga aac gtt tta agg ctt tta ttt tta aca gct ttt gtt gct ata 48
Met Arg Asn Val Leu Arg Leu Leu Phe Leu Thr Ala Phe Val Ala Ile
1 5 10 15

ggg tct tta gca gcc gtt tta ggt gtt gat tac ggt cag caa aat atc 96
Gly Ser Leu Ala Ala Val Leu Gly Val Asp Tyr Gly Gln Gln Asn Ile
20 25 30

aag gcc att gtg gtt tct ccg caa gcc cca tta gaa ctt gtg ctc aca 144

Lys Ala Ile Val Val Ser Pro Gln Ala Pro Leu Glu Leu Val Leu Thr	
35 40 45	
cca gag gca aaa cgg aag gag ata tct ggt ctt tcg ata aaa aga tta	192
Pro Glu Ala Lys Arg Lys Glu Ile Ser Gly Leu Ser Ile Lys Arg Leu	
50 55 60	
cca ggt tat gga aag gat gat ccg aat ggg att gaa aga atc tac ggt	240
Pro Gly Tyr Gly Lys Asp Asp Pro Asn Gly Ile Glu Arg Ile Tyr Gly	
65 70 75 80	
tcc gct gtt ggc agt tta gca aca agg ttt ccc caa aac aca ttg ttg	288
Ser Ala Val Gly Ser Leu Ala Thr Arg Phe Pro Gln Asn Thr Leu Leu	
85 90 95	
cat ttg aaa ccg cta ctt ggg aaa tca cta gaa gat gaa acc act gta	336
His Leu Lys Pro Leu Leu Gly Lys Ser Leu Glu Asp Glu Thr Thr Val	
100 105 110	
act ttg tat tca aaa caa cac ccc ggt tta gaa atg gta tca aca aat	384
Thr Leu Tyr Ser Lys Gln His Pro Gly Leu Glu Met Val Ser Thr Asn	
115 120 125	
aga agt acc ata gcc ttt tta gtt gat aat gtg gaa tat cca ttg gaa	432
Arg Ser Thr Ile Ala Phe Leu Val Asp Asn Val Glu Tyr Pro Leu Glu	
130 135 140	
gag tta gtg gca atg aat gtc caa gag att gcc aat aga gcc aat tca	480
Glu Leu Val Ala Met Asn Val Gln Glu Ile Ala Asn Arg Ala Asn Ser	
145 150 155 160	
ctg ttg aag gat aga gat gca aga act gag gac ttt gta aac aag atg	528
Leu Leu Lys Asp Arg Asp Ala Arg Thr Glu Asp Phe Val Asn Lys Met	
165 170 175	
agt ttt aca att cct gac ttt ttt gac caa cat caa agg aaa gca ctt	576
Ser Phe Thr Ile Pro Asp Phe Phe Asp Gln His Gln Arg Lys Ala Leu	
180 185 190	
tta gat gcc agt tca ata acc aca gga atc gaa gag aca tat ctg gtt	624
Leu Asp Ala Ser Ser Ile Thr Thr Gly Ile Glu Glu Thr Tyr Leu Val	
195 200 205	

agt gaa ggg atg tct gtt gca gtt aac ttt gta tta aag cag cgc caa	672
Ser Glu Gly Met Ser Val Ala Val Asn Phe Val Leu Lys Gln Arg Gln	
210 215 220	
ttt cca cca ggt gaa cag cag cat tat atc gta tat gac atg ggg agc	720
Phe Pro Pro Gly Glu Gln Gln His Tyr Ile Val Tyr Asp Met Gly Ser	
225 230 235 240	
ggt tct att aag gcc tca atg ttc tct ata ttg cag ccg gag gac act	768
Gly Ser Ile Lys Ala Ser Met Phe Ser Ile Leu Gln Pro Glu Asp Thr	
245 250 255	
act cag ccc gtt aca ata gaa ttt gaa gga tat ggg tat aat cca cat	816
Thr Gln Pro Val Thr Ile Glu Phe Glu Gly Tyr Gly Tyr Asn Pro His	
260 265 270	
cta ggt ggt gca aag ttt aca atg gat att ggc agt ttg ata gag aat	864
Leu Gly Gly Ala Lys Phe Thr Met Asp Ile Gly Ser Leu Ile Glu Asn	
275 280 285	
aag ttt ttg gaa aca cac cca gcc ata aga act gat gaa ttg cac gct	912
Lys Phe Leu Glu Thr His Pro Ala Ile Arg Thr Asp Glu Leu His Ala	
290 295 300	
aat ccc aag gcc tta gca aaa atc aac caa gca gca gag aag gca aag	960
Asn Pro Lys Ala Leu Ala Lys Ile Asn Gln Ala Ala Glu Lys Ala Lys	
305 310 315 320	
tta att tta agc gcc aat tct gag gca agt att aac ata gaa tca ctg	1008
Leu Ile Leu Ser Ala Asn Ser Glu Ala Ser Ile Asn Ile Glu Ser Leu	
325 330 335	
atc aac gat att gat ttc cgt act tct ata act aga cag gaa ttc gaa	1056
Ile Asn Asp Ile Asp Phe Arg Thr Ser Ile Thr Arg Gln Glu Phe Glu	
340 345 350	
gaa ttt att gca gac tcg tta ttg gac att gtc aaa ccc ata aat gac	1104
Glu Phe Ile Ala Asp Ser Leu Leu Asp Ile Val Lys Pro Ile Asn Asp	
355 360 365	
gct gtt aca aaa caa ttc ggt ggc tat gga aca aat tta cct gag ata	1152

Ala Val Thr Lys Gln Phe Gly Gly Tyr Gly Thr Asn Leu Pro Glu Ile	
370 375 380	
aat ggg gtc att ttg gcg gga ggc tct tcc cga att ccc att gtg cag	1200
Asn Gly Val Ile Leu Ala Gly Gly Ser Ser Arg Ile Pro Ile Val Gln	
385 390 395 400	
gat caa tta atc aaa ctc gta tcc gaa gaa aaa gtg ttg aga aat gtc	1248
Asp Gln Leu Ile Lys Leu Val Ser Glu Glu Lys Val Leu Arg Asn Val	
405 410 415	
aat gct gat gaa tca gct gtg aat ggt gtt gtt atg aga ggg atc aag	1296
Asn Ala Asp Glu Ser Ala Val Asn Gly Val Val Met Arg Gly Ile Lys	
420 425 430	
tta tct aat tcg ttt aag acc aag ccg tta aat gtt gtt gac cgt tct	1344
Leu Ser Asn Ser Phe Lys Thr Lys Pro Leu Asn Val Val Asp Arg Ser	
435 440 445	
gta aat act tat tca ttc aaa tta tca aac gaa tct gaa ctg tat gat	1392
Val Asn Thr Tyr Ser Phe Lys Leu Ser Asn Glu Ser Glu Leu Tyr Asp	
450 455 460	
gtg ttc acg cgc gga agt gct tat cca aac aaa aca tct att ttg aca	1440
Val Phe Thr Arg Gly Ser Ala Tyr Pro Asn Lys Thr Ser Ile Leu Thr	
465 470 475 480	
aac acg act gat tcg att cct aat aat ttt acc att gac tta ttt gag	1488
Asn Thr Thr Asp Ser Ile Pro Asn Asn Phe Thr Ile Asp Leu Phe Glu	
485 490 495	
aat ggt aaa ttg ttc gaa act atc aca gtt aat tca gga gct ata aag	1536
Asn Gly Lys Leu Phe Glu Thr Ile Thr Val Asn Ser Gly Ala Ile Lys	
500 505 510	
aat tca tat tcc tct gat aag tgc tcg tca gga gtt gcg tat aac att	1584
Asn Ser Tyr Ser Ser Asp Lys Cys Ser Ser Gly Val Ala Tyr Asn Ile	
515 520 525	
act ttc gac ttg tcc agt gat aga tta ttc tct att caa gag gtt aac	1632
Thr Phe Asp Leu Ser Ser Asp Arg Leu Phe Ser Ile Gln Glu Val Asn	
530 535 540	

tgc att tgt cag agc gaa aat gac ata ggt aac tcc aag caa att aag	1680
Cys Ile Cys Gln Ser Glu Asn Asp Ile Gly Asn Ser Lys Gln Ile Lys	
545 550 555 560	
aac aaa ggc agc cgt ttg gct ttt act tct gag gat gtt gag atc aaa	1728
Asn Lys Gly Ser Arg Leu Ala Phe Thr Ser Glu Asp Val Glu Ile Lys	
565 570 575	
agg ctt tct cct tca gaa cgt tcg cgt ttg cat gag cat atc aag ttg	1776
Arg Leu Ser Pro Ser Glu Arg Ser Arg Leu His Glu His Ile Lys Leu	
580 585 590	
ctc gat aaa cag gat aag gaa aga ttt caa ttc caa gaa aat tta aac	1824
Leu Asp Lys Gln Asp Lys Glu Arg Phe Gln Phe Gln Glu Asn Leu Asn	
595 600 605	
gtt ctt gaa agt aac ttg tat gat gct aga aac ctg cta atg gat gat	1872
Val Leu Glu Ser Asn Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Leu Leu Met Asp Asp	
610 615 620	
gaa gtt atg caa aat gga cca aaa tcc caa gta gaa gag tta tcg gag	1920
Glu Val Met Gln Asn Gly Pro Lys Ser Gln Val Glu Glu Leu Ser Glu	
625 630 635 640	
atg gtt aaa gta tat ttg gat tgg ctc gaa gat gca tcc ttt gat act	1968
Met Val Lys Val Tyr Leu Asp Trp Leu Glu Asp Ala Ser Phe Asp Thr	
645 650 655	
gac cct gag gat ata gtt agc aga att aga gaa att gga ata tta aaa	2016
Asp Pro Glu Asp Ile Val Ser Arg Ile Arg Glu Ile Gly Ile Leu Lys	
660 665 670	
aag aaa ata gaa ctt tac atg gat tct gca aag gaa cct ttg aac tct	2064
Lys Lys Ile Glu Leu Tyr Met Asp Ser Ala Lys Glu Pro Leu Asn Ser	
675 680 685	
caa caa ttt aaa gga atg ctt gaa gaa ggc cat aag tta ctt cag gct	2112
Gln Gln Phe Lys Gly Met Leu Glu Glu Gly His Lys Leu Leu Gln Ala	
690 695 700	
ata gaa acc cat aag aat acc gtt gaa gaa ttt ttg agt caa ttt gaa	2160

Ile Glu Thr His Lys Asn Thr Val Glu Glu Phe Leu Ser Gln Phe Glu	
705	710 715 720
acc gag ttt gcg gat acc ata gat aat gtt aga gaa gaa ttt aaa aag	2208
Thr Glu Phe Ala Asp Thr Ile Asp Asn Val Arg Glu Glu Phe Lys Lys	
725 730 735	
att aag caa cca gcg tat gtg tcg aag gcg tta tct aca tgg gag gaa	2256
Ile Lys Gln Pro Ala Tyr Val Ser Lys Ala Leu Ser Thr Trp Glu Glu	
740 745 750	
acc tta acc tct ttt aaa aat tcc att agc gaa ata gag aag ttc ctg	2304
Thr Leu Thr Ser Phe Lys Asn Ser Ile Ser Glu Ile Glu Lys Phe Leu	
755 760 765	
gca aaa aac cta ttt ggc gaa gac ctt cgt gaa cat tta ttt gaa atc	2352
Ala Lys Asn Leu Phe Gly Glu Asp Leu Arg Glu His Leu Phe Glu Ile	
770 775 780	
aaa tta caa ttt gat atg tat cgt acg aaa cta gag gaa aaa ctg cgt	2400
Lys Leu Gln Phe Asp Met Tyr Arg Thr Lys Leu Glu Glu Lys Leu Arg	
785 790 795 800	
tta ata aaa agc ggt gat gaa agt cgc tta aat gaa ata aag aag tta	2448
Leu Ile Lys Ser Gly Asp Glu Ser Arg Leu Asn Glu Ile Lys Lys Leu	
805 810 815	
cat tta aga aac ttc cgc cta caa aag aga aag gag gaa aag ttg aaa	2496
His Leu Arg Asn Phe Arg Leu Gln Lys Arg Lys Glu Glu Lys Leu Lys	
820 825 830	
aga aag ctt gaa cag gaa aaa agc aga aac aac aat gaa aca gaa tcg	2544
Arg Lys Leu Glu Gln Glu Lys Ser Arg Asn Asn Asn Glu Thr Glu Ser	
835 840 845	
aca gta atc aac tcg gct gac gat aaa act act att gtc aat gac aag	2592
Thr Val Ile Asn Ser Ala Asp Asp Lys Thr Thr Ile Val Asn Asp Lys	
850 855 860	
acc acc gag tcg aat cca agt tct gag gaa gac att ttg cat gat gaa	2640
Thr Thr Glu Ser Asn Pro Ser Ser Glu Glu Asp Ile Leu His Asp Glu	
865 870 875 880	

tta tag

2646

Leu

<210> 133

<211> 881

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 133

Met Arg Asn Val Leu Arg Leu Leu Phe Leu Thr Ala Phe Val Ala Ile

1

5

10

15

Gly Ser Leu Ala Ala Val Leu Gly Val Asp Tyr Gly Gln Gln Asn Ile

20

25

30

Lys Ala Ile Val Val Ser Pro Gln Ala Pro Leu Glu Leu Val Leu Thr

35

40

45

Pro Glu Ala Lys Arg Lys Glu Ile Ser Gly Leu Ser Ile Lys Arg Leu

50

55

60

Pro Gly Tyr Gly Lys Asp Asp Pro Asn Gly Ile Glu Arg Ile Tyr Gly

65

70

75

80

Ser Ala Val Gly Ser Leu Ala Thr Arg Phe Pro Gln Asn Thr Leu Leu

85

90

95

His Leu Lys Pro Leu Leu Gly Lys Ser Leu Glu Asp Glu Thr Thr Val

100

105

110

Thr Leu Tyr Ser Lys Gln His Pro Gly Leu Glu Met Val Ser Thr Asn

115	120	125
Arg Ser Thr Ile Ala Phe Leu Val Asp Asn Val Glu Tyr Pro Leu Glu		
130	135	140
Glu Leu Val Ala Met Asn Val Gln Glu Ile Ala Asn Arg Ala Asn Ser		
145	150	155
		160
Leu Leu Lys Asp Arg Asp Ala Arg Thr Glu Asp Phe Val Asn Lys Met		
	165	170
		175
Ser Phe Thr Ile Pro Asp Phe Phe Asp Gln His Gln Arg Lys Ala Leu		
	180	185
		190
Leu Asp Ala Ser Ser Ile Thr Thr Gly Ile Glu Glu Thr Tyr Leu Val		
	195	200
		205
Ser Glu Gly Met Ser Val Ala Val Asn Phe Val Leu Lys Gln Arg Gln		
	210	215
		220
Phe Pro Pro Gly Glu Gln Gln His Tyr Ile Val Tyr Asp Met Gly Ser		
225	230	235
		240
Gly Ser Ile Lys Ala Ser Met Phe Ser Ile Leu Gln Pro Glu Asp Thr		
	245	250
		255
Thr Gln Pro Val Thr Ile Glu Phe Glu Gly Tyr Gly Tyr Asn Pro His		
	260	265
		270
Leu Gly Gly Ala Lys Phe Thr Met Asp Ile Gly Ser Leu Ile Glu Asn		
	275	280
		285

Lys Phe Leu Glu Thr His Pro Ala Ile Arg Thr Asp Glu Leu His Ala
 290 295 300

Asn Pro Lys Ala Leu Ala Lys Ile Asn Gln Ala Ala Glu Lys Ala Lys
 305 310 315 320

Leu Ile Leu Ser Ala Asn Ser Glu Ala Ser Ile Asn Ile Glu Ser Leu
 325 330 335

Ile Asn Asp Ile Asp Phe Arg Thr Ser Ile Thr Arg Gln Glu Phe Glu
 340 345 350

Glu Phe Ile Ala Asp Ser Leu Leu Asp Ile Val Lys Pro Ile Asn Asp
 355 360 365

Ala Val Thr Lys Gln Phe Gly Gly Tyr Gly Thr Asn Leu Pro Glu Ile
 370 375 380

Asn Gly Val Ile Leu Ala Gly Gly Ser Ser Arg Ile Pro Ile Val Gln
 385 390 395 400

Asp Gln Leu Ile Lys Leu Val Ser Glu Glu Lys Val Leu Arg Asn Val
 405 410 415

Asn Ala Asp Glu Ser Ala Val Asn Gly Val Val Met Arg Gly Ile Lys
 420 425 430

Leu Ser Asn Ser Phe Lys Thr Lys Pro Leu Asn Val Val Asp Arg Ser
 435 440 445

Val Asn Thr Tyr Ser Phe Lys Leu Ser Asn Glu Ser Glu Leu Tyr Asp

450		455		460
Val Phe Thr Arg Gly Ser Ala Tyr Pro Asn Lys Thr Ser Ile Leu Thr				
465		470		475 480
Asn Thr Thr Asp Ser Ile Pro Asn Asn Phe Thr Ile Asp Leu Phe Glu				
	485		490	495
Asn Gly Lys Leu Phe Glu Thr Ile Thr Val Asn Ser Gly Ala Ile Lys				
	500		505	510
Asn Ser Tyr Ser Ser Asp Lys Cys Ser Ser Gly Val Ala Tyr Asn Ile				
	515		520	525
Thr Phe Asp Leu Ser Ser Asp Arg Leu Phe Ser Ile Gln Glu Val Asn				
	530		535	540
Cys Ile Cys Gln Ser Glu Asn Asp Ile Gly Asn Ser Lys Gln Ile Lys				
545		550		555 560
Asn Lys Gly Ser Arg Leu Ala Phe Thr Ser Glu Asp Val Glu Ile Lys				
	565		570	575
Arg Leu Ser Pro Ser Glu Arg Ser Arg Leu His Glu His Ile Lys Leu				
	580		585	590
Leu Asp Lys Gln Asp Lys Glu Arg Phe Gln Phe Gln Glu Asn Leu Asn				
	595		600	605
Val Leu Glu Ser Asn Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Leu Leu Met Asp Asp				
610		615		620

Glu Val Met Gln Asn Gly Pro Lys Ser Gln Val Glu Glu Leu Ser Glu
625 630 635 640

Met Val Lys Val Tyr Leu Asp Trp Leu Glu Asp Ala Ser Phe Asp Thr
645 650 655

Asp Pro Glu Asp Ile Val Ser Arg Ile Arg Glu Ile Gly Ile Leu Lys
660 665 670

Lys Lys Ile Glu Leu Tyr Met Asp Ser Ala Lys Glu Pro Leu Asn Ser
675 680 685

Gln Gln Phe Lys Gly Met Leu Glu Glu Gly His Lys Leu Leu Gln Ala
690 695 700

Ile Glu Thr His Lys Asn Thr Val Glu Glu Phe Leu Ser Gln Phe Glu
705 710 715 720

Thr Glu Phe Ala Asp Thr Ile Asp Asn Val Arg Glu Glu Phe Lys Lys
725 730 735

Ile Lys Gln Pro Ala Tyr Val Ser Lys Ala Leu Ser Thr Trp Glu Glu
740 745 750

Thr Leu Thr Ser Phe Lys Asn Ser Ile Ser Glu Ile Glu Lys Phe Leu
755 760 765

Ala Lys Asn Leu Phe Gly Glu Asp Leu Arg Glu His Leu Phe Glu Ile
770 775 780

Lys Leu Gln Phe Asp Met Tyr Arg Thr Lys Leu Glu Glu Lys Leu Arg

785 790 795 800

Leu Ile Lys Ser Gly Asp Glu Ser Arg Leu Asn Glu Ile Lys Lys Leu
805 810 815

His Leu Arg Asn Phe Arg Leu Gln Lys Arg Lys Glu Glu Lys Leu Lys
820 825 830

Arg Lys Leu Glu Gln Glu Lys Ser Arg Asn Asn Asn Glu Thr Glu Ser
835 840 845

Thr Val Ile Asn Ser Ala Asp Asp Lys Thr Thr Ile Val Asn Asp Lys
850 855 860

Thr Thr Glu Ser Asn Pro Ser Ser Glu Glu Asp Ile Leu His Asp Glu
865 870 875 880

Leu

<210> 134

<211> 834

5 <212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(834)

<400> 134

atg aaa ttg cac ggc ttt tta ttt tcc gta tta tca aca tgc gtc gtc

48

Met Lys Leu His Gly Phe Leu Phe Ser Val Leu Ser Thr Cys Val Val

1

5

10

15

att tta cca gcg ttg gcc tac agt gaa gct gtc acg atg gtc aag tcg	96
Ile Leu Pro Ala Leu Ala Tyr Ser Glu Ala Val Thr Met Val Lys Ser	
20 25 30	
att gag cag tac ttc gat atc tgc aat agg aat gat tct tac aca atg	144
Ile Glu Gln Tyr Phe Asp Ile Cys Asn Arg Asn Asp Ser Tyr Thr Met	
35 40 45	
ata aaa tac tac act tct tgg tgc caa cat tgt aaa act ctg gcc cca	192
Ile Lys Tyr Tyr Thr Ser Trp Cys Gln His Cys Lys Thr Leu Ala Pro	
50 55 60	
gta tac gaa gag ctt ggt gag cta tac gcc aaa aaa gct aat aaa gat	240
Val Tyr Glu Glu Leu Gly Glu Leu Tyr Ala Lys Lys Ala Asn Lys Asp	
65 70 75 80	
gat acc cca att aac ttc ctt gaa gtt aac tgt gaa ttc ttc ggg cca	288
Asp Thr Pro Ile Asn Phe Leu Glu Val Asn Cys Glu Phe Phe Gly Pro	
85 90 95	
act tta tgt acc gac ttg cct gga ttt cca ata att gaa ctg gtc aaa	336
Thr Leu Cys Thr Asp Leu Pro Gly Phe Pro Ile Ile Glu Leu Val Lys	
100 105 110	
cct cgt act aag ccc tta gtt ctt ccg aag ctc gat tgg tcg tct atg	384
Pro Arg Thr Lys Pro Leu Val Leu Pro Lys Leu Asp Trp Ser Ser Met	
115 120 125	
aaa ttt cat gaa aga cta tgg caa aga atc aag acg tgg ttc aac aat	432
Lys Phe His Glu Arg Leu Trp Gln Arg Ile Lys Thr Trp Phe Asn Asn	
130 135 140	
cct aag tac caa ctg gat acg tct agg gtt gtt cgt ttt gaa ggg agt	480
Pro Lys Tyr Gln Leu Asp Thr Ser Arg Val Val Arg Phe Glu Gly Ser	
145 150 155 160	
agg aac cta aag agt tta agc aac ttt atc gat act gta aga agt aaa	528
Arg Asn Leu Lys Ser Leu Ser Asn Phe Ile Asp Thr Val Arg Ser Lys	
165 170 175	
gat aca gaa gaa aga ttc ata gaa cat att ttc gat gat tct agg aat	576
Asp Thr Glu Glu Arg Phe Ile Glu His Ile Phe Asp Asp Ser Arg Asn	

180	185	190	
tgc aat gaa gaa tta cgt tct caa cag ctt ctg tgt aaa gct ggt aaa			624
Cys Asn Glu Glu Leu Arg Ser Gln Gln Leu Leu Cys Lys Ala Gly Lys			
195	200	205	
gaa tac tac tct gat act tta tct aaa tta tac ggt gac gtg aat ggg			672
Glu Tyr Tyr Ser Asp Thr Leu Ser Lys Leu Tyr Gly Asp Val Asn Gly			
210	215	220	
ctg gaa aag gaa agg cga aga cta gaa gct tta att aag caa aat gga			720
Leu Glu Lys Glu Arg Arg Arg Leu Glu Ala Leu Ile Lys Gln Asn Gly			
225	230	235	240
gat gac ttg agt aaa gaa gtt aaa gaa aaa ctg aaa atc att cgt cta			768
Asp Asp Leu Ser Lys Glu Val Lys Glu Lys Leu Lys Ile Ile Arg Leu			
245	250	255	
caa ttg agc cta tta tca cac ata gaa gac cag tta gaa gat acc agt			816
Gln Leu Ser Leu Leu Ser His Ile Glu Asp Gln Leu Glu Asp Thr Ser			
260	265	270	
agt cat gac gag ctt tga			834
Ser His Asp Glu Leu			
275			
<210> 135			
<211> 277			
5	<212> PRT		
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
<400> 135			
Met Lys Leu His Gly Phe Leu Phe Ser Val Leu Ser Thr Cys Val Val			
1	5	10	15
Ile Leu Pro Ala Leu Ala Tyr Ser Glu Ala Val Thr Met Val Lys Ser			
20	25	30	

Ile Glu Gln Tyr Phe Asp Ile Cys Asn Arg Asn Asp Ser Tyr Thr Met
35 40 45

Ile Lys Tyr Tyr Thr Ser Trp Cys Gln His Cys Lys Thr Leu Ala Pro
50 55 60

Val Tyr Glu Glu Leu Gly Glu Leu Tyr Ala Lys Lys Ala Asn Lys Asp
65 70 75 80

Asp Thr Pro Ile Asn Phe Leu Glu Val Asn Cys Glu Phe Phe Gly Pro
85 90 95

Thr Leu Cys Thr Asp Leu Pro Gly Phe Pro Ile Ile Glu Leu Val Lys
100 105 110

Pro Arg Thr Lys Pro Leu Val Leu Pro Lys Leu Asp Trp Ser Ser Met
115 120 125

Lys Phe His Glu Arg Leu Trp Gln Arg Ile Lys Thr Trp Phe Asn Asn
130 135 140

Pro Lys Tyr Gln Leu Asp Thr Ser Arg Val Val Arg Phe Glu Gly Ser
145 150 155 160

Arg Asn Leu Lys Ser Leu Ser Asn Phe Ile Asp Thr Val Arg Ser Lys
165 170 175

Asp Thr Glu Glu Arg Phe Ile Glu His Ile Phe Asp Asp Ser Arg Asn
180 185 190

Cys Asn Glu Glu Leu Arg Ser Gln Gln Leu Leu Cys Lys Ala Gly Lys
195 200 205

Glu Tyr Tyr Ser Asp Thr Leu Ser Lys Leu Tyr Gly Asp Val Asn Gly
 210 215 220

Leu Glu Lys Glu Arg Arg Arg Leu Glu Ala Leu Ile Lys Gln Asn Gly
 225 230 235 240

Asp Asp Leu Ser Lys Glu Val Lys Glu Lys Leu Lys Ile Ile Arg Leu
 245 250 255

Gln Leu Ser Leu Leu Ser His Ile Glu Asp Gln Leu Glu Asp Thr Ser
 260 265 270

Ser His Asp Glu Leu
 275

<210> 136
 <211> 888
 5 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(888)

<400> 136
 atg aac ggt tac tgg aaa cct gcg ttg gtt gtc ctg gga ttg gta tct 48
 Met Asn Gly Tyr Trp Lys Pro Ala Leu Val Val Leu Gly Leu Val Ser
 1 5 10 15

cta tca tat gct ttt acc acc att gaa aca gaa att ttc caa tta caa 96
 Leu Ser Tyr Ala Phe Thr Thr Ile Glu Thr Glu Ile Phe Gln Leu Gln
 20 25 30

aat gaa ata agt acg aaa tat ggc cca gat atg aac ttc tac aag ttc 144

Asn Glu Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Pro Asp Met Asn Phe Tyr Lys Phe	
35 40 45	
ttg aag tta cct aaa ctg cag aat tct agt aca aag gag att aca aaa	192
Leu Lys Leu Pro Lys Leu Gln Asn Ser Ser Thr Lys Glu Ile Thr Lys	
50 55 60	
aac tta aga aag cta tcc aag aag tac cat ccg gat aag aac cct aaa	240
Asn Leu Arg Lys Leu Ser Lys Lys Tyr His Pro Asp Lys Asn Pro Lys	
65 70 75 80	
tac cgt aaa ttg tat gaa agg tta aac ctc gct act caa att ctt tca	288
Tyr Arg Lys Leu Tyr Glu Arg Leu Asn Leu Ala Thr Gln Ile Leu Ser	
85 90 95	
aac agc tct aat cgt aag att tat gat tat tat cta cag aat ggc ttt	336
Asn Ser Ser Asn Arg Lys Ile Tyr Asp Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Phe	
100 105 110	
cca aac tat gat ttc cat aag ggt ggt ttt tat ttt tcc aga atg aag	384
Pro Asn Tyr Asp Phe His Lys Gly Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Met Lys	
115 120 125	
cct aag act tgg ttc ctg ctg gcc ttt att tgg ata gtc gtt aat att	432
Pro Lys Thr Trp Phe Leu Leu Ala Phe Ile Trp Ile Val Val Asn Ile	
130 135 140	
ggg cag tat atc att tct att att caa tat cgt tct caa aga tca aga	480
Gly Gln Tyr Ile Ile Ser Ile Ile Gln Tyr Arg Ser Gln Arg Ser Arg	
145 150 155 160	
att gaa aac ttc atc agt cag tgt aaa caa cag gat gat acc aat gga	528
Ile Glu Asn Phe Ile Ser Gln Cys Lys Gln Gln Asp Asp Thr Asn Gly	
165 170 175	
cta ggc gta aaa caa cta acg ttt aaa caa cat gaa aag gat gag ggt	576
Leu Gly Val Lys Gln Leu Thr Phe Lys Gln His Glu Lys Asp Glu Gly	
180 185 190	
aaa agt ttg gtt gta agg ttt agc gat gtc tat gtt gta gag cct gat	624
Lys Ser Leu Val Val Arg Phe Ser Asp Val Tyr Val Val Glu Pro Asp	
195 200 205	

gga agt gaa aca cta att tcg cca gat acc ttg gat aaa cct tca gta 672
Gly Ser Glu Thr Leu Ile Ser Pro Asp Thr Leu Asp Lys Pro Ser Val
210 215 220

aag aac tgt ttg ttt tgg aga ata cct gct tcg gtt tgg aac atg acg 720
Lys Asn Cys Leu Phe Trp Arg Ile Pro Ala Ser Val Trp Asn Met Thr
225 230 235 240

ttt ggc aaa tct gtt ggt agc gca gga aaa gaa gaa ata ata acg gat 768
Phe Gly Lys Ser Val Gly Ser Ala Gly Lys Glu Glu Ile Ile Thr Asp
245 250 255

agt aaa aag tat gat ggt aac caa aca aaa aag ggg aac aaa gta aaa 816
Ser Lys Lys Tyr Asp Gly Asn Gln Thr Lys Lys Gly Asn Lys Val Lys
260 265 270

aag ggt tct gca aag aaa ggc caa aag aaa atg gaa ttg cct aac ggt 864
Lys Gly Ser Ala Lys Lys Gly Gln Lys Lys Met Glu Leu Pro Asn Gly
275 280 285

aaa gtg atc tat tca cgt aaa tga 888
Lys Val Ile Tyr Ser Arg Lys
290 295

<210> 137

<211> 295

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 137

Met Asn Gly Tyr Trp Lys Pro Ala Leu Val Val Leu Gly Leu Val Ser
1 5 10 15

Leu Ser Tyr Ala Phe Thr Thr Ile Glu Thr Glu Ile Phe Gln Leu Gln
20 25 30

Asn Glu Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Pro Asp Met Asn Phe Tyr Lys Phe

35	40	45
Leu Lys Leu Pro Lys Leu Gln Asn Ser Ser Thr Lys Glu Ile Thr Lys		
50	55	60
Asn Leu Arg Lys Leu Ser Lys Lys Tyr His Pro Asp Lys Asn Pro Lys		
65	70	75
		80
Tyr Arg Lys Leu Tyr Glu Arg Leu Asn Leu Ala Thr Gln Ile Leu Ser		
85	90	95
Asn Ser Ser Asn Arg Lys Ile Tyr Asp Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Phe		
100	105	110
Pro Asn Tyr Asp Phe His Lys Gly Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Met Lys		
115	120	125
Pro Lys Thr Trp Phe Leu Leu Ala Phe Ile Trp Ile Val Val Asn Ile		
130	135	140
Gly Gln Tyr Ile Ile Ser Ile Ile Gln Tyr Arg Ser Gln Arg Ser Arg		
145	150	155
		160
Ile Glu Asn Phe Ile Ser Gln Cys Lys Gln Gln Asp Asp Thr Asn Gly		
165	170	175
Leu Gly Val Lys Gln Leu Thr Phe Lys Gln His Glu Lys Asp Glu Gly		
180	185	190
Lys Ser Leu Val Val Arg Phe Ser Asp Val Tyr Val Val Glu Pro Asp		
195	200	205

Gly Ser Glu Thr Leu Ile Ser Pro Asp Thr Leu Asp Lys Pro Ser Val
210 215 220

Lys Asn Cys Leu Phe Trp Arg Ile Pro Ala Ser Val Trp Asn Met Thr
225 230 235 240

Phe Gly Lys Ser Val Gly Ser Ala Gly Lys Glu Glu Ile Ile Thr Asp
245 250 255

Ser Lys Lys Tyr Asp Gly Asn Gln Thr Lys Lys Gly Asn Lys Val Lys
260 265 270

Lys Gly Ser Ala Lys Lys Gly Gln Lys Lys Met Glu Leu Pro Asn Gly
275 280 285

Lys Val Ile Tyr Ser Arg Lys
290 295

<210> 138
<211> 1554
5 <212> ADN
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
<221> CDS
10 <222> (1).. (1554)

<400> 138
atg caa gtg acc aca aga ttt ata tct gcg ata gtc tcg ttt tgc ctg 48
Met Gln Val Thr Thr Arg Phe Ile Ser Ala Ile Val Ser Phe Cys Leu
1 5 10 15

ttt gct tct ttc acg ttg gct gaa aac agc gca aga gct acg ccg gga 96
Phe Ala Ser Phe Thr Leu Ala Glu Asn Ser Ala Arg Ala Thr Pro Gly

20	25	30	
tca gat tta ctc gtt cta aca gag aag aaa ttt aaa tca ttc atc gaa			144
Ser Asp Leu Leu Val Leu Thr Glu Lys Lys Phe Lys Ser Phe Ile Glu			
35	40	45	
tct cat ccg tta gtc ctc gtc gag ttt ttt gct cca tgg tgt ttg cat			192
Ser His Pro Leu Val Leu Val Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Leu His			
50	55	60	
tct cag atc tta cgc cct cac tta gaa gag gcc gcc tct att tta aag			240
Ser Gln Ile Leu Arg Pro His Leu Glu Glu Ala Ala Ser Ile Leu Lys			
65	70	75	80
gag cat aac gtc cca gtt gtt caa att gat tgt gag gct aac agt atg			288
Glu His Asn Val Pro Val Val Gln Ile Asp Cys Glu Ala Asn Ser Met			
85	90	95	
gtt tgc ctg caa caa act ata aat acc tac cca acc ttg aaa atc ttt			336
Val Cys Leu Gln Gln Thr Ile Asn Thr Tyr Pro Thr Leu Lys Ile Phe			
100	105	110	
aaa aat ggt cgt att ttt gat ggt caa gtc tat cgc ggt gtc aag atc			384
Lys Asn Gly Arg Ile Phe Asp Gly Gln Val Tyr Arg Gly Val Lys Ile			
115	120	125	
acc gat gaa atc act cag tac atg att cag cta tac gag gct tct gtc			432
Thr Asp Glu Ile Thr Gln Tyr Met Ile Gln Leu Tyr Glu Ala Ser Val			
130	135	140	
att tat tta aat tcc gaa gat gaa atc caa cca tac ttg gaa aat gca			480
Ile Tyr Leu Asn Ser Glu Asp Glu Ile Gln Pro Tyr Leu Glu Asn Ala			
145	150	155	160
act tta cca gta gta ata aac aga ggc ttg aca ggc ttg aat gaa acg			528
Thr Leu Pro Val Val Ile Asn Arg Gly Leu Thr Gly Leu Asn Glu Thr			
165	170	175	
tat caa gaa gtc gca ctg gac ctt gct gag gat tac gtc ttt tta tcc			576
Tyr Gln Glu Val Ala Leu Asp Leu Ala Glu Asp Tyr Val Phe Leu Ser			
180	185	190	

ctt cta gat tca gaa gat aag tca tta tca atc cac ttg cca aac act	624
Leu Leu Asp Ser Glu Asp Lys Ser Leu Ser Ile His Leu Pro Asn Thr	
195 200 205	
aca gaa cca att ctg ttt gat gga aat gta gac tct ttg gtc gga aat	672
Thr Glu Pro Ile Leu Phe Asp Gly Asn Val Asp Ser Leu Val Gly Asn	
210 215 220	
tcc gtt gct cta act cag tgg tta aaa gtg gta att tta cct tac ttt	720
Ser Val Ala Leu Thr Gln Trp Leu Lys Val Val Ile Leu Pro Tyr Phe	
225 230 235 240	
acc gac atc gaa cct gat ctc ttc ccc aag tac att tct agc aat ttg	768
Thr Asp Ile Glu Pro Asp Leu Phe Pro Lys Tyr Ile Ser Ser Asn Leu	
245 250 255	
ccg ttg gct tac ttc ttt tat act tct gag gaa gaa ttg gaa gat tac	816
Pro Leu Ala Tyr Phe Phe Tyr Thr Ser Glu Glu Glu Leu Glu Asp Tyr	
260 265 270	
act gat ctt ttc acg cag tta ggt aag gaa aat cgt ggc caa ata aat	864
Thr Asp Leu Phe Thr Gln Leu Gly Lys Glu Asn Arg Gly Gln Ile Asn	
275 280 285	
ttc att gca tta aac tct aca atg ttc cca cac cac gtt aga ttc cta	912
Phe Ile Ala Leu Asn Ser Thr Met Phe Pro His His Val Arg Phe Leu	
290 295 300	
aat atg aga gaa cag ttc cca tta ttt gct atc cat aat atg atc aat	960
Asn Met Arg Glu Gln Phe Pro Leu Phe Ala Ile His Asn Met Ile Asn	
305 310 315 320	
aat ctg aaa tat ggt tta cca caa cta cca gaa gaa gag tac gcg aaa	1008
Asn Leu Lys Tyr Gly Leu Pro Gln Leu Pro Glu Glu Glu Tyr Ala Lys	
325 330 335	
tta gaa aaa cca caa cca cta gac aga gat atg atc gtt cag ttg gta	1056
Leu Glu Lys Pro Gln Pro Leu Asp Arg Asp Met Ile Val Gln Leu Val	
340 345 350	
aaa gat tac cgt gaa ggt act gcc aag cca att gtt aag tca gaa gag	1104
Lys Asp Tyr Arg Glu Gly Thr Ala Lys Pro Ile Val Lys Ser Glu Glu	

355	360	365	
att cca aaa gaa caa aag tcc aat gtt tat aaa ata gtt ggg aag aca			1152
Ile Pro Lys Glu Gln Lys Ser Asn Val Tyr Lys Ile Val Gly Lys Thr			
370	375	380	
cat gac gac att gtt cat gat gat gac aag gat gtc ctt gtc aaa tat			1200
His Asp Asp Ile Val His Asp Asp Asp Lys Asp Val Leu Val Lys Tyr			
385	390	395	400
tac gcg aca tgg tgt att cat agt aaa agg ttt gcg cct att tac gaa			1248
Tyr Ala Thr Trp Cys Ile His Ser Lys Arg Phe Ala Pro Ile Tyr Glu			
405	410	415	
gaa att gca aat gtc tta gca tct gat gaa tct gtt cgc gat aaa atc			1296
Glu Ile Ala Asn Val Leu Ala Ser Asp Glu Ser Val Arg Asp Lys Ile			
420	425	430	
ttg atc gcc gaa gta gat tca ggg gca aat gat atc tta agt ttt cct			1344
Leu Ile Ala Glu Val Asp Ser Gly Ala Asn Asp Ile Leu Ser Phe Pro			
435	440	445	
gtg aca gga tat cca acc att gct ttg tat cct gcc gga aat aac tct			1392
Val Thr Gly Tyr Pro Thr Ile Ala Leu Tyr Pro Ala Gly Asn Asn Ser			
450	455	460	
aag cct att atc ttc aat aaa att aga aat ttg gaa gat gtt ttc gaa			1440
Lys Pro Ile Ile Phe Asn Lys Ile Arg Asn Leu Glu Asp Val Phe Glu			
465	470	475	480
ttt atc aag gaa tca ggt aca cat cac att gac ggc cag gca att tat			1488
Phe Ile Lys Glu Ser Gly Thr His His Ile Asp Gly Gln Ala Ile Tyr			
485	490	495	
gat aaa ttg cac cag gcc aag gat tct gaa gtg tct act gaa gat acc			1536
Asp Lys Leu His Gln Ala Lys Asp Ser Glu Val Ser Thr Glu Asp Thr			
500	505	510	
gta cat gat gaa tta taa			1554
Val His Asp Glu Leu			
515			

<211> 517
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

5 <400> 139
 Met Gln Val Thr Thr Arg Phe Ile Ser Ala Ile Val Ser Phe Cys Leu
 1 5 10 15

 Phe Ala Ser Phe Thr Leu Ala Glu Asn Ser Ala Arg Ala Thr Pro Gly
 20 25 30

 Ser Asp Leu Leu Val Leu Thr Glu Lys Lys Phe Lys Ser Phe Ile Glu
 35 40 45

 Ser His Pro Leu Val Leu Val Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Leu His
 50 55 60

 Ser Gln Ile Leu Arg Pro His Leu Glu Glu Ala Ala Ser Ile Leu Lys
 65 70 75 80

 Glu His Asn Val Pro Val Val Gln Ile Asp Cys Glu Ala Asn Ser Met
 85 90 95

 Val Cys Leu Gln Gln Thr Ile Asn Thr Tyr Pro Thr Leu Lys Ile Phe
 100 105 110

 Lys Asn Gly Arg Ile Phe Asp Gly Gln Val Tyr Arg Gly Val Lys Ile
 115 120 125

 Thr Asp Glu Ile Thr Gln Tyr Met Ile Gln Leu Tyr Glu Ala Ser Val
 130 135 140

Ile Tyr Leu Asn Ser Glu Asp Glu Ile Gln Pro Tyr Leu Glu Asn Ala
145 150 155 160

Thr Leu Pro Val Val Ile Asn Arg Gly Leu Thr Gly Leu Asn Glu Thr
165 170 175

Tyr Gln Glu Val Ala Leu Asp Leu Ala Glu Asp Tyr Val Phe Leu Ser
180 185 190

Leu Leu Asp Ser Glu Asp Lys Ser Leu Ser Ile His Leu Pro Asn Thr
195 200 205

Thr Glu Pro Ile Leu Phe Asp Gly Asn Val Asp Ser Leu Val Gly Asn
210 215 220

Ser Val Ala Leu Thr Gln Trp Leu Lys Val Val Ile Leu Pro Tyr Phe
225 230 235 240

Thr Asp Ile Glu Pro Asp Leu Phe Pro Lys Tyr Ile Ser Ser Asn Leu
245 250 255

Pro Leu Ala Tyr Phe Phe Tyr Thr Ser Glu Glu Glu Leu Glu Asp Tyr
260 265 270

Thr Asp Leu Phe Thr Gln Leu Gly Lys Glu Asn Arg Gly Gln Ile Asn
275 280 285

Phe Ile Ala Leu Asn Ser Thr Met Phe Pro His His Val Arg Phe Leu
290 295 300

Asn Met Arg Glu Gln Phe Pro Leu Phe Ala Ile His Asn Met Ile Asn
305 310 315 320

Asn Leu Lys Tyr Gly Leu Pro Gln Leu Pro Glu Glu Glu Tyr Ala Lys
325 330 335

Leu Glu Lys Pro Gln Pro Leu Asp Arg Asp Met Ile Val Gln Leu Val
340 345 350

Lys Asp Tyr Arg Glu Gly Thr Ala Lys Pro Ile Val Lys Ser Glu Glu
355 360 365

Ile Pro Lys Glu Gln Lys Ser Asn Val Tyr Lys Ile Val Gly Lys Thr
370 375 380

His Asp Asp Ile Val His Asp Asp Asp Lys Asp Val Leu Val Lys Tyr
385 390 395 400

Tyr Ala Thr Trp Cys Ile His Ser Lys Arg Phe Ala Pro Ile Tyr Glu
405 410 415

Glu Ile Ala Asn Val Leu Ala Ser Asp Glu Ser Val Arg Asp Lys Ile
420 425 430

Leu Ile Ala Glu Val Asp Ser Gly Ala Asn Asp Ile Leu Ser Phe Pro
435 440 445

Val Thr Gly Tyr Pro Thr Ile Ala Leu Tyr Pro Ala Gly Asn Asn Ser
450 455 460

Lys Pro Ile Ile Phe Asn Lys Ile Arg Asn Leu Glu Asp Val Phe Glu
465 470 475 480

Phe Ile Lys Glu Ser Gly Thr His His Ile Asp Gly Gln Ala Ile Tyr
 485 490 495

Asp Lys Leu His Gln Ala Lys Asp Ser Glu Val Ser Thr Glu Asp Thr
 500 505 510

Val His Asp Glu Leu
 515

<210> 140
 <211> 1527
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(1527)

<400> 140
 atg ctg cgc cgc gct ctg ctg tgc ctg gcc gtg gcc gcc ctg gtg cgc 48
 Met Leu Arg Arg Ala Leu Leu Cys Leu Ala Val Ala Ala Leu Val Arg
 1 5 10 15

gcc gac gcc ccc gag gag gag gac cac gtc ctg gtg ctg cgg aaa agc 96
 Ala Asp Ala Pro Glu Glu Glu Asp His Val Leu Val Leu Arg Lys Ser
 20 25 30

aac ttc gcg gag gcg ctg gcg gcc cac aag tac ctg ctg gtg gag ttc 144
 Asn Phe Ala Glu Ala Leu Ala Ala His Lys Tyr Leu Leu Val Glu Phe
 35 40 45

tat gcc cct tgg tgt ggc cac tgc aag gct ctg gcc cct gag tat gcc 192
 Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro Glu Tyr Ala
 50 55 60

aaa gcc gct ggg aag ctg aag gca gaa ggt tcc gag atc agg ttg gcc 240

Lys	Ala	Ala	Gly	Lys	Leu	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Glu	Ile	Arg	Leu	Ala	
65						70				75					80	
aag	gtg	gac	gcc	acg	gag	gag	tct	gac	ctg	gcc	cag	cag	tac	ggc	gtg	288
Lys	Val	Asp	Ala	Thr	Glu	Glu	Ser	Asp	Leu	Ala	Gln	Gln	Tyr	Gly	Val	
			85						90					95		
cgc	ggc	tat	ccc	acc	atc	aag	ttc	ttc	agg	aat	gga	gac	acg	gct	tcc	336
Arg	Gly	Tyr	Pro	Thr	Ile	Lys	Phe	Phe	Arg	Asn	Gly	Asp	Thr	Ala	Ser	
			100						105					110		
ccc	aag	gaa	tat	aca	gct	ggc	aga	gag	gct	gat	gac	atc	gtg	aac	tgg	384
Pro	Lys	Glu	Tyr	Thr	Ala	Gly	Arg	Glu	Ala	Asp	Asp	Ile	Val	Asn	Trp	
			115						120					125		
ctg	aag	aag	cgc	acg	ggc	cgc	gct	gcc	acc	acc	ctg	cct	gac	ggc	gca	432
Leu	Lys	Lys	Arg	Thr	Gly	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Leu	Pro	Asp	Gly	Ala	
			130						135					140		
gct	gca	gag	tcc	ttg	gtg	gag	tcc	agc	gag	gtg	gct	gtc	atc	ggc	ttc	480
Ala	Ala	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Ser	Ser	Glu	Val	Ala	Val	Ile	Gly	Phe	
			145						150					155	160	
ttc	aag	gac	gtg	gag	tcg	gac	tct	gcc	aag	cag	ttt	ttg	cag	gca	gca	528
Phe	Lys	Asp	Val	Glu	Ser	Asp	Ser	Ala	Lys	Gln	Phe	Leu	Gln	Ala	Ala	
				165					170					175		
gag	gcc	atc	gat	gac	ata	cca	ttt	ggg	atc	act	tcc	aac	agt	gac	gtg	576
Glu	Ala	Ile	Asp	Asp	Ile	Pro	Phe	Gly	Ile	Thr	Ser	Asn	Ser	Asp	Val	
				180					185					190		
ttc	tcc	aaa	tac	cag	ctc	gac	aaa	gat	ggg	gtt	gtc	ctc	ttt	aag	aag	624
Phe	Ser	Lys	Tyr	Gln	Leu	Asp	Lys	Asp	Gly	Val	Val	Leu	Phe	Lys	Lys	
				195					200					205		
ttt	gat	gaa	ggc	cgg	aac	aac	ttt	gaa	ggg	gag	gtc	acc	aag	gag	aac	672
Phe	Asp	Glu	Gly	Arg	Asn	Asn	Phe	Glu	Gly	Glu	Val	Thr	Lys	Glu	Asn	
			210						215					220		
ctg	ctg	gac	ttt	atc	aaa	cac	aac	cag	ctg	ccc	ctt	gtc	atc	gag	ttc	720
Leu	Leu	Asp	Phe	Ile	Lys	His	Asn	Gln	Leu	Pro	Leu	Val	Ile	Glu	Phe	
225					230					235					240	

acc gag cag aca gcc ccg aag att ttt gga ggt gaa atc aag act cac	768
Thr Glu Gln Thr Ala Pro Lys Ile Phe Gly Gly Glu Ile Lys Thr His	
245 250 255	
atc ctg ctg ttc ttg ccc aag agt gtg tct gac tat gac ggc aaa ctg	816
Ile Leu Leu Phe Leu Pro Lys Ser Val Ser Asp Tyr Asp Gly Lys Leu	
260 265 270	
agc aac ttc aaa aca gca gcc gag agc ttc aag ggc aag atc ctg ttc	864
Ser Asn Phe Lys Thr Ala Ala Glu Ser Phe Lys Gly Lys Ile Leu Phe	
275 280 285	
atc ttc atc gac agc gac cac acc gac aac cag cgc atc ctc gag ttc	912
Ile Phe Ile Asp Ser Asp His Thr Asp Asn Gln Arg Ile Leu Glu Phe	
290 295 300	
ttt ggc ctg aag aag gaa gag tgc ccg gcc gtg cgc ctc atc acc ctg	960
Phe Gly Leu Lys Lys Glu Glu Cys Pro Ala Val Arg Leu Ile Thr Leu	
305 310 315 320	
gag gag gag atg acc aag tac aag ccc gaa tcg gag gag ctg acg gca	1008
Glu Glu Glu Met Thr Lys Tyr Lys Pro Glu Ser Glu Glu Leu Thr Ala	
325 330 335	
gag agg atc aca gag ttc tgc cac cgc ttc ctg gag ggc aaa atc aag	1056
Glu Arg Ile Thr Glu Phe Cys His Arg Phe Leu Glu Gly Lys Ile Lys	
340 345 350	
ccc cac ctg atg agc cag gag ctg ccg gag gac tgg gac aag cag cct	1104
Pro His Leu Met Ser Gln Glu Leu Pro Glu Asp Trp Asp Lys Gln Pro	
355 360 365	
gtc aag gtg ctt gtt ggg aag aac ttt gaa gac gtg gct ttt gat gag	1152
Val Lys Val Leu Val Gly Lys Asn Phe Glu Asp Val Ala Phe Asp Glu	
370 375 380	
aaa aaa aac gtc ttt gtg gag ttc tat gcc cca tgg tgt ggt cac tgc	1200
Lys Lys Asn Val Phe Val Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys	
385 390 395 400	
aaa cag ttg gct ccc att tgg gat aaa ctg gga gag acg tac aag gac	1248

Lys	Gln	Leu	Ala	Pro	Ile	Trp	Asp	Lys	Leu	Gly	Glu	Thr	Tyr	Lys	Asp		
				405					410					415			
cat	gag	aac	atc	gtc	atc	gcc	aag	atg	gac	tcg	act	gcc	aac	gag	gtg	1296	
His	Glu	Asn	Ile	Val	Ile	Ala	Lys	Met	Asp	Ser	Thr	Ala	Asn	Glu	Val		
				420				425						430			
gag	gcc	gtc	aaa	gtg	cac	agc	ttc	ccc	aca	ctc	aag	ttc	ttt	cct	gcc	1344	
Glu	Ala	Val	Lys	Val	His	Ser	Phe	Pro	Thr	Leu	Lys	Phe	Phe	Pro	Ala		
				435				440						445			
agt	gcc	gac	agg	acg	gtc	att	gat	tac	aac	ggg	gaa	cgc	acg	ctg	gat	1392	
Ser	Ala	Asp	Arg	Thr	Val	Ile	Asp	Tyr	Asn	Gly	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp		
				450				455						460			
ggt	ttt	aag	aaa	ttc	ctg	gag	agc	ggt	ggc	cag	gat	ggg	gca	ggg	gat	1440	
Gly	Phe	Lys	Lys	Phe	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gln	Asp	Gly	Ala	Gly	Asp		
465					470					475					480		
gat	gac	gat	ctc	gag	gac	ctg	gaa	gaa	gca	gag	gag	cca	gac	atg	gag	1488	
Asp	Asp	Asp	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Asp	Met	Glu		
					485					490					495		
gaa	gac	gat	gat	cag	aaa	gct	gtg	aaa	gat	gaa	ctg	taa				1527	
Glu	Asp	Asp	Asp	Gln	Lys	Ala	Val	Lys	Asp	Glu	Leu						
					500					505							

<210> 141
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 141
 Met Leu Arg Arg Ala Leu Leu Cys Leu Ala Val Ala Ala Leu Val Arg
 1 5 10 15

Ala Asp Ala Pro Glu Glu Glu Asp His Val Leu Val Leu Arg Lys Ser
 20 25 30

Asn Phe Ala Glu Ala Leu Ala Ala His Lys Tyr Leu Leu Val Glu Phe
35 40 45

Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro Glu Tyr Ala
50 55 60

Lys Ala Ala Gly Lys Leu Lys Ala Glu Gly Ser Glu Ile Arg Leu Ala
65 70 75 80

Lys Val Asp Ala Thr Glu Glu Ser Asp Leu Ala Gln Gln Tyr Gly Val
85 90 95

Arg Gly Tyr Pro Thr Ile Lys Phe Phe Arg Asn Gly Asp Thr Ala Ser
100 105 110

Pro Lys Glu Tyr Thr Ala Gly Arg Glu Ala Asp Asp Ile Val Asn Trp
115 120 125

Leu Lys Lys Arg Thr Gly Pro Ala Ala Thr Thr Leu Pro Asp Gly Ala
130 135 140

Ala Ala Glu Ser Leu Val Glu Ser Ser Glu Val Ala Val Ile Gly Phe
145 150 155 160

Phe Lys Asp Val Glu Ser Asp Ser Ala Lys Gln Phe Leu Gln Ala Ala
165 170 175

Glu Ala Ile Asp Asp Ile Pro Phe Gly Ile Thr Ser Asn Ser Asp Val
180 185 190

Phe Ser Lys Tyr Gln Leu Asp Lys Asp Gly Val Val Leu Phe Lys Lys

195	200	205
Phe Asp Glu Gly Arg Asn Asn Phe Glu Gly Glu Val Thr Lys Glu Asn		
210	215	220
Leu Leu Asp Phe Ile Lys His Asn Gln Leu Pro Leu Val Ile Glu Phe		
225	230	235 240
Thr Glu Gln Thr Ala Pro Lys Ile Phe Gly Gly Glu Ile Lys Thr His		
	245	250 255
Ile Leu Leu Phe Leu Pro Lys Ser Val Ser Asp Tyr Asp Gly Lys Leu		
	260	265 270
Ser Asn Phe Lys Thr Ala Ala Glu Ser Phe Lys Gly Lys Ile Leu Phe		
	275	280 285
Ile Phe Ile Asp Ser Asp His Thr Asp Asn Gln Arg Ile Leu Glu Phe		
	290	295 300
Phe Gly Leu Lys Lys Glu Glu Cys Pro Ala Val Arg Leu Ile Thr Leu		
305	310	315 320
Glu Glu Glu Met Thr Lys Tyr Lys Pro Glu Ser Glu Glu Leu Thr Ala		
	325	330 335
Glu Arg Ile Thr Glu Phe Cys His Arg Phe Leu Glu Gly Lys Ile Lys		
	340	345 350
Pro His Leu Met Ser Gln Glu Leu Pro Glu Asp Trp Asp Lys Gln Pro		
	355	360 365

Val Lys Val Leu Val Gly Lys Asn Phe Glu Asp Val Ala Phe Asp Glu
370 375 380

Lys Lys Asn Val Phe Val Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys
385 390 395 400

Lys Gln Leu Ala Pro Ile Trp Asp Lys Leu Gly Glu Thr Tyr Lys Asp
405 410 415

His Glu Asn Ile Val Ile Ala Lys Met Asp Ser Thr Ala Asn Glu Val
420 425 430

Glu Ala Val Lys Val His Ser Phe Pro Thr Leu Lys Phe Phe Pro Ala
435 440 445

Ser Ala Asp Arg Thr Val Ile Asp Tyr Asn Gly Glu Arg Thr Leu Asp
450 455 460

Gly Phe Lys Lys Phe Leu Glu Ser Gly Gly Gln Asp Gly Ala Gly Asp
465 470 475 480

Asp Asp Asp Leu Glu Asp Leu Glu Glu Ala Glu Glu Pro Asp Met Glu
485 490 495

Glu Asp Asp Asp Gln Lys Ala Val Lys Asp Glu Leu
500 505

<210> 142
<211> 1527
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

10 <400> 142

atgttgagaa gagctttgtt gtgtttggcc gttgccgcct tggtagagc cgacgcccc	60
gaggaggagg accacgtctt ggttttgaga aagtccaact tcgctgagc tttggctgcc	120
cacaagtact tgttggttga gttctacgcc ccatggtgtg gtcactgtaa ggctttggcc	180
ccagagtacg ccaaggccgc tggtaagttg aaggctgagg gttccgagat cagattggcc	240
aaggttgacg ccaccgagga gtccgacttg gcccaacaat acggtgttag aggttaccca	300
accatcaagt tcttcagaaa cggtgacacc gttccccaa aggagtacac cgctggtaga	360
gaggctgacg acatcgtaa ctggttgaag aagagaaccg gtccagctgc caccaccttg	420
ccagacggtg ctgctgctga gtccttgggt gagtcctccg aggttgctgt catcggtttc	480
ttcaaggacg ttgagtccga ctccgccaag caattcttgc aagctgctga ggccatcgac	540
gacatcccat tcggtatcac ctccaactcc gacgttttct ccaagtacca attggacaag	600
gacggtgttg tcttgttcaa gaagtgcac gagggtagaa acaacttca gggtgaggtc	660
accaaggaga acttggttga cttcatcaag cacaaccaat tgccattggt tatcgagttc	720
accgagcaaa ccgccccaaa gatcttcggt ggtgagatca agaccacat cttgttgttc	780
ttgccaaagt ccgtttccga ctacgacggt aagttgtcca acttcaagac cgctgccgag	840
tccttcaagg gtaagatctt gttcatcttc atcgactccg accacaccga caaccaaga	900
atcttgaggt tcttcggttt gaagaaggag gagtgtccag ccgtagatt gatcaccttg	960
gaggaggaga tgaccaagta caagccagag tccgaggagt tgaccgctga gagaatcacc	1020
gagttctgtc acagattctt ggagggttaag atcaagccac acttgatgtc ccaagagttg	1080
ccagaggact gggacaagca accagtcaag gttttggttg gtaagaactt cgaggacgtt	1140

gctttcgacg agaagaagaa cgtcttcggtt gagttctacg ccccatgggtg tggtcactgt 1200
aagcaattgg ctccaatctg ggacaagttg ggtgagacct acaaggacca cgagaacatc 1260
gtcatcgcca agatggactc caccgccaac gaggttgagg ccgtaaggt tcactccttc 1320
ccaaccttga agttcttccc agcctccgcc gacagaaccg tcatcgacta caacgggtgag 1380
agaaccttgg acggtttcaa gaagttcttg ggtccggtg gtcaagacgg tgctggtgac 1440
gacgacgact tggaggactt ggaggaggct gaggagccag acatggagga ggacgacgac 1500
caaaaggctg ttaaggacga gttgtaa 1527

<210> 143
<211> 1407
5 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(1407)

<400> 143
atg ggc cgc ggc tgg gga ttc ttg ttt ggc ctc ctg ggc gcc gtg tgg 48
Met Gly Arg Gly Trp Gly Phe Leu Phe Gly Leu Leu Gly Ala Val Trp
1 5 10 15
ctg ctc agc tcg ggc cac gga gag gag cag ccc ccg gag aca gcg gca 96
Leu Leu Ser Ser Gly His Gly Glu Glu Gln Pro Pro Glu Thr Ala Ala
20 25 30
cag agg tgc ttc tgc cag gtt agt ggt tac ttg gat gat tgt acc tgt 144
Gln Arg Cys Phe Cys Gln Val Ser Gly Tyr Leu Asp Asp Cys Thr Cys
35 40 45
gat gtt gaa acc att gat aga ttt aat aac tac agg ctt ttc cca aga 192
Asp Val Glu Thr Ile Asp Arg Phe Asn Asn Tyr Arg Leu Phe Pro Arg
50 55 60

cta caa aaa ctt ctt gaa agt gac tac ttt agg tat tac aag gta aac	240
Leu Gln Lys Leu Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Val Asn	
65 70 75 80	
ctg aag agg ccg tgt cct ttc tgg aat gac atc agc cag tgt gga aga	288
Leu Lys Arg Pro Cys Pro Phe Trp Asn Asp Ile Ser Gln Cys Gly Arg	
85 90 95	
agg gac tgt gct gtc aaa cca tgt caa tct gat gaa gtt cct gat gga	336
Arg Asp Cys Ala Val Lys Pro Cys Gln Ser Asp Glu Val Pro Asp Gly	
100 105 110	
att aaa tct gcg agc tac aag tat tct gaa gaa gcc aat aat ctc att	384
Ile Lys Ser Ala Ser Tyr Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Asn Asn Leu Ile	
115 120 125	
gaa gaa tgt gaa caa gct gaa cga ctt gga gca gtg gat gaa tct ctg	432
Glu Glu Cys Glu Gln Ala Glu Arg Leu Gly Ala Val Asp Glu Ser Leu	
130 135 140	
agt gag gaa aca cag aag gct gtt ctt cag tgg acc aag cat gat gat	480
Ser Glu Glu Thr Gln Lys Ala Val Leu Gln Trp Thr Lys His Asp Asp	
145 150 155 160	
tct tca gat aac ttc tgt gaa got gat gac att cag tcc cct gaa gct	528
Ser Ser Asp Asn Phe Cys Glu Ala Asp Asp Ile Gln Ser Pro Glu Ala	
165 170 175	
gaa tat gta gat ttg ctt ctt aat cct gag cgc tac act ggt tac aag	576
Glu Tyr Val Asp Leu Leu Leu Asn Pro Glu Arg Tyr Thr Gly Tyr Lys	
180 185 190	
gga cca gat gct tgg aaa ata tgg aat gtc atc tac gaa gaa aac tgt	624
Gly Pro Asp Ala Trp Lys Ile Trp Asn Val Ile Tyr Glu Glu Asn Cys	
195 200 205	
ttt aag cca cag aca att aaa aga cct tta aat cct ttg gct tct ggt	672
Phe Lys Pro Gln Thr Ile Lys Arg Pro Leu Asn Pro Leu Ala Ser Gly	
210 215 220	
caa ggg aca agt gaa gag aac act ttt tac agt tgg cta gaa ggt ctc	720
Gln Gly Thr Ser Glu Glu Asn Thr Phe Tyr Ser Trp Leu Glu Gly Leu	

225	230	235	240	
tgt gta gaa aaa aga gca ttc tac aga ctt ata tct ggc cta cat gca				768
Cys Val Glu Lys Arg Ala Phe Tyr Arg Leu Ile Ser Gly Leu His Ala				
	245	250	255	
agc att aat gtg cat ttg agt gca aga tat ctt tta caa gag acc tgg				816
Ser Ile Asn Val His Leu Ser Ala Arg Tyr Leu Leu Gln Glu Thr Trp				
	260	265	270	
tta gaa aag aaa tgg gga cac aac att aca gaa ttt caa cag cga ttt				864
Leu Glu Lys Lys Trp Gly His Asn Ile Thr Glu Phe Gln Gln Arg Phe				
	275	280	285	
gat gga att ttg act gaa gga gaa ggt cca aga agg ctt aag aac ttg				912
Asp Gly Ile Leu Thr Glu Gly Glu Gly Pro Arg Arg Leu Lys Asn Leu				
	290	295	300	
tat ttt ctc tac tta ata gaa cta agg gct tta tcc aaa gtg tta cca				960
Tyr Phe Leu Tyr Leu Ile Glu Leu Arg Ala Leu Ser Lys Val Leu Pro				
305	310	315	320	
ttc ttc gag cgc cca gat ttt caa ctc ttt act gga aat aaa att cag				1008
Phe Phe Glu Arg Pro Asp Phe Gln Leu Phe Thr Gly Asn Lys Ile Gln				
	325	330	335	
gat gag gaa aac aaa atg tta ctt ctg gaa ata ctt cat gaa atc aag				1056
Asp Glu Glu Asn Lys Met Leu Leu Leu Glu Ile Leu His Glu Ile Lys				
	340	345	350	
tca ttt cct ttg cat ttt gat gag aat tca ttt ttt gct ggg gat aaa				1104
Ser Phe Pro Leu His Phe Asp Glu Asn Ser Phe Phe Ala Gly Asp Lys				
	355	360	365	
aaa gaa gca cac aaa cta aag gag gac ttt cga ctg cat ttt aga aat				1152
Lys Glu Ala His Lys Leu Lys Glu Asp Phe Arg Leu His Phe Arg Asn				
	370	375	380	
att tca aga att atg gat tgt gtt ggt tgt ttt aaa tgt cgt ctg tgg				1200
Ile Ser Arg Ile Met Asp Cys Val Gly Cys Phe Lys Cys Arg Leu Trp				
385	390	395	400	

gga aag ctt cag act cag ggt ttg ggc act gct ctg aag atc tta ttt . 1248
Gly Lys Leu Gln Thr Gln Gly Leu Gly Thr Ala Leu Lys Ile Leu Phe
405 410 415

tct gag aaa ttg ata gca aat atg cca gaa agt gga cct agt tat gaa 1296
Ser Glu Lys Leu Ile Ala Asn Met Pro Glu Ser Gly Pro Ser Tyr Glu
420 425 430

ttc cat cta acc aga caa gaa ata gta tca tta ttc aac gca ttt gga 1344
Phe His Leu Thr Arg Gln Glu Ile Val Ser Leu Phe Asn Ala Phe Gly
435 440 445

aga att tct aca agt gtg aaa gaa tta gaa aac ttc agg aac ttg tta 1392
Arg Ile Ser Thr Ser Val Lys Glu Leu Glu Asn Phe Arg Asn Leu Leu
450 455 460

cag aat att cat taa 1407
Gln Asn Ile His
465

<210> 144

<211> 468

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 144

Met Gly Arg Gly Trp Gly Phe Leu Phe Gly Leu Leu Gly Ala Val Trp
1 5 10 15

Leu Leu Ser Ser Gly His Gly Glu Glu Gln Pro Pro Glu Thr Ala Ala
20 25 30

Gln Arg Cys Phe Cys Gln Val Ser Gly Tyr Leu Asp Asp Cys Thr Cys
35 40 45

Asp Val Glu Thr Ile Asp Arg Phe Asn Asn Tyr Arg Leu Phe Pro Arg
50 55 60

Leu Gln Lys Leu Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Val Asn
65 70 75 80

Leu Lys Arg Pro Cys Pro Phe Trp Asn Asp Ile Ser Gln Cys Gly Arg
85 90 95

Arg Asp Cys Ala Val Lys Pro Cys Gln Ser Asp Glu Val Pro Asp Gly
100 105 110

Ile Lys Ser Ala Ser Tyr Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Asn Asn Leu Ile
115 120 125

Glu Glu Cys Glu Gln Ala Glu Arg Leu Gly Ala Val Asp Glu Ser Leu
130 135 140

Ser Glu Glu Thr Gln Lys Ala Val Leu Gln Trp Thr Lys His Asp Asp
145 150 155 160

Ser Ser Asp Asn Phe Cys Glu Ala Asp Asp Ile Gln Ser Pro Glu Ala
165 170 175

Glu Tyr Val Asp Leu Leu Leu Asn Pro Glu Arg Tyr Thr Gly Tyr Lys
180 185 190

Gly Pro Asp Ala Trp Lys Ile Trp Asn Val Ile Tyr Glu Glu Asn Cys
195 200 205

Phe Lys Pro Gln Thr Ile Lys Arg Pro Leu Asn Pro Leu Ala Ser Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Ser Glu Glu Asn Thr Phe Tyr Ser Trp Leu Glu Gly Leu
225 230 235 240

Cys Val Glu Lys Arg Ala Phe Tyr Arg Leu Ile Ser Gly Leu His Ala
245 250 255

Ser Ile Asn Val His Leu Ser Ala Arg Tyr Leu Leu Gln Glu Thr Trp
260 265 270

Leu Glu Lys Lys Trp Gly His Asn Ile Thr Glu Phe Gln Gln Arg Phe
275 280 285

Asp Gly Ile Leu Thr Glu Gly Glu Gly Pro Arg Arg Leu Lys Asn Leu
290 295 300

Tyr Phe Leu Tyr Leu Ile Glu Leu Arg Ala Leu Ser Lys Val Leu Pro
305 310 315 320

Phe Phe Glu Arg Pro Asp Phe Gln Leu Phe Thr Gly Asn Lys Ile Gln
325 330 335

Asp Glu Glu Asn Lys Met Leu Leu Leu Glu Ile Leu His Glu Ile Lys
340 345 350

Ser Phe Pro Leu His Phe Asp Glu Asn Ser Phe Phe Ala Gly Asp Lys
355 360 365

Lys Glu Ala His Lys Leu Lys Glu Asp Phe Arg Leu His Phe Arg Asn
370 375 380

Ile Ser Arg Ile Met Asp Cys Val Gly Cys Phe Lys Cys Arg Leu Trp
385 390 395 400

Gly Lys Leu Gln Thr Gln Gly Leu Gly Thr Ala Leu Lys Ile Leu Phe
405 410 415

Ser Glu Lys Leu Ile Ala Asn Met Pro Glu Ser Gly Pro Ser Tyr Glu
420 425 430

Phe His Leu Thr Arg Gln Glu Ile Val Ser Leu Phe Asn Ala Phe Gly
435 440 445

Arg Ile Ser Thr Ser Val Lys Glu Leu Glu Asn Phe Arg Asn Leu Leu
450 455 460

Gln Asn Ile His
465

<210> 145
<211> 1407
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

10 <400> 145
atgggtagag gttgggggtt cttgttcggt ttgttgggtg ctgtttgggt gttgtcctcc 60
ggtcacggtg aggagcaacc accagagacc gctgctcaaa gatgtttctg tcaagtttcc 120
ggttacttgg acgactgtac ctgtgacgtt gagaccatcg acagattcaa caactacaga 180
ttgttcccaa gattgcaaaa gttgttggag tccgactact tcagatacta caaggttaac 240
ttgaagagac catgtccatt ctggaacgac atctcccaat gtggtagaag agactgtgct 300
gttaagccat gtcaatccga cgagggtcca gacggtatca agtccgcttc ctacaagtac 360

tccgaggagg ctaacaactt gatcgaggag tgtgagcaag ctgagagatt ggggtgctgtt 420
gacgagtcct tgtccgagga gacccaaaag gctgttttgc aatggaccaa gcacgacgac 480
tcctccgaca acttctgtga ggctgacgac atccaatccc cagaggctga gtacgttgac 540
ttgtttgtga acccagagag atacaccggt tacaagggtc cagacgcttg gaagatctgg 600
aacgttatct acgaggagaa ctgtttcaag ccacaaacca tcaagagacc attgaaccca 660
ttggcttccg gtcaaggtag ctccgaggag aacaccttct actcctgggt ggagggtttg 720
tgtgttgaga agagagcttt ctacagattg atctccggtt tgcacgcttc catcaacgtt 780
cacttgccg ctagatactt gttgcaagag acctggttgg agaagaagtg gggtcacaac 840
atcacccagt tccaacaaag attcgacggt atcttgaccg agggtgaggg tccaagaaga 900
ttgaagaact tgtacttctt gtacttgatc gagttgagag ctttgtccaa ggttttgcc 960
ttcttcgaga gaccagactt ccaattgttc accggtaaca agatccaaga cgaggagaac 1020
aagatgttgt tggtggagat ctgacagag atcaagtcct tcccattgca cttcgacgag 1080
aactccttct tcgctggtga caagaaggag gtcacaagt tgaaggagga cttcagattg 1140
catttcagaa acatctccag aatcatggac tgtgttggtt gtttcaagt tagattgttg 1200
ggtaagttgc aaaccaagg tttgggtacc gctttgaaga tcttgttctc cgagaagttg 1260
atcgctaaca tgccagagtc cgggtccatcc tacgagttcc acttgaccag acaagagatc 1320
gtttccttgt tcaacgcttt cggtagaatc tccacctccg ttaaggagtt ggagaacttc 1380
agaaacttgt tgcaaaacat ccactaa 1407

<210> 146
<211> 1404
5 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(1404)

<400> 146

atg agc caa ggg gtc cgc cgg gca ggc gct ggg cag ggg gta gcg gcc	48
Met Ser Gln Gly Val Arg Arg Ala Gly Ala Gly Gln Gly Val Ala Ala	
1 5 10 15	

gcg gtg cag ctg ctg gtc acc ctg agc ttc ctg cgg agc gtc gtc gag	96
Ala Val Gln Leu Leu Val Thr Leu Ser Phe Leu Arg Ser Val Val Glu	
20 25 30	

gcg cag gtc act gga gtt ctg gat gat tgc ttg tgt gat att gac agc	144
Ala Gln Val Thr Gly Val Leu Asp Asp Cys Leu Cys Asp Ile Asp Ser	
35 40 45	

atc gat aac ttc aat acc tac aaa atc ttc ccc aaa ata aaa aaa ttg	192
Ile Asp Asn Phe Asn Thr Tyr Lys Ile Phe Pro Lys Ile Lys Lys Leu	
50 55 60	

caa gag aga gac tat ttt cgt tat tac aag gtt aat ctg aag cga cct	240
Gln Glu Arg Asp Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Val Asn Leu Lys Arg Pro	
65 70 75 80	

tgt cct ttc tgg gca gaa gat ggc cac tgt tca ata aaa gac tgt cat	288
Cys Pro Phe Trp Ala Glu Asp Gly His Cys Ser Ile Lys Asp Cys His	
85 90 95	

gtg gag ccc tgt cca gag agt aaa att ccg gtt gga ata aaa gct ggg	336
Val Glu Pro Cys Pro Glu Ser Lys Ile Pro Val Gly Ile Lys Ala Gly	
100 105 110	

cat tct aat aag tac ttg aaa atg gca aac aat acc aaa gaa tta gaa	384
His Ser Asn Lys Tyr Leu Lys Met Ala Asn Asn Thr Lys Glu Leu Glu	
115 120 125	

gtt tgt gag caa gct aat aaa ctg gga gca att aac agc aca tta agt	432
Val Cys Glu Gln Ala Asn Lys Leu Gly Ala Ile Asn Ser Thr Leu Ser	
130 135 140	

aat caa agc aaa gaa gct ttc att gac tgg gca aga tat gat gat tca 480
Asn Gln Ser Lys Glu Ala Phe Ile Asp Trp Ala Arg Tyr Asp Asp Ser
145 150 155 160

cgg gat cac ttt tgt gaa ctt gat gat gag aga tct cca gct gct cag 528
Arg Asp His Phe Cys Glu Leu Asp Asp Glu Arg Ser Pro Ala Ala Gln
165 170 175

tat gta gac cta ttg ctg aac cca gag cgt tac act ggc tat aaa ggg. 576
Tyr Val Asp Leu Leu Leu Asn Pro Glu Arg Tyr Thr Gly Tyr Lys Gly
180 185 190

acc tct gca tgg aga gtg tgg aac agc atc tat gaa gag aac tgt ttc 624
Thr Ser Ala Trp Arg Val Trp Asn Ser Ile Tyr Glu Glu Asn Cys Phe
195 200 205

aag cct cga tct gtt tat cgt cct tta aat cct ctg gcg cct agc cga 672
Lys Pro Arg Ser Val Tyr Arg Pro Leu Asn Pro Leu Ala Pro Ser Arg
210 215 220

ggc gaa gat gat gga gaa tca ttc tac aca tgg cta gaa ggt ttg tgt 720
Gly Glu Asp Asp Gly Glu Ser Phe Tyr Thr Trp Leu Glu Gly Leu Cys
225 230 235 240

ctg gag aaa aga gtc ttc tat aag ctt ata tcg gga ctt cat gct agc 768
Leu Glu Lys Arg Val Phe Tyr Lys Leu Ile Ser Gly Leu His Ala Ser
245 250 255

atc aat tta cat cta tgc gca aat tat ctt ttg gaa gaa acc tgg ggt 816
Ile Asn Leu His Leu Cys Ala Asn Tyr Leu Leu Glu Glu Thr Trp Gly
260 265 270

aag ccc agt tgg gga cct aat att aaa gaa ttc aaa cac cgc ttt gac 864
Lys Pro Ser Trp Gly Pro Asn Ile Lys Glu Phe Lys His Arg Phe Asp
275 280 285

cct gtg gaa acc aag gga gaa ggt cca aga agg ctc aag aat ctt tac 912
Pro Val Glu Thr Lys Gly Glu Gly Pro Arg Arg Leu Lys Asn Leu Tyr
290 295 300

ttt tta tac ttg att gag ctt cga gct ttg tca aag gtg gct cca tat 960

Phe Leu Tyr Leu Ile Glu Leu Arg Ala Leu Ser Lys Val Ala Pro Tyr
305 310 315 320

ttt gag cgc tca att gtc gat ctt tac act gga aat gca gaa gaa gat 1008
Phe Glu Arg Ser Ile Val Asp Leu Tyr Thr Gly Asn Ala Glu Glu Asp
325 330 335

gct gac aca aaa act ctt cta ctg aat atc ttt caa gat aca aag tcc 1056
Ala Asp Thr Lys Thr Leu Leu Leu Asn Ile Phe Gln Asp Thr Lys Ser
340 345 350

ttt ccc atg cac ttt gat gag aaa tcc atg ttt gca ggt gac aaa aaa 1104
Phe Pro Met His Phe Asp Glu Lys Ser Met Phe Ala Gly Asp Lys Lys
355 360 365

ggg gcc aag tca cta aag gag gaa ttc cga tta cat ttc aag aat atc 1152
Gly Ala Lys Ser Leu Lys Glu Glu Phe Arg Leu His Phe Lys Asn Ile
370 375 380

tcc cgt ata atg gac tgt gtt gga tgt gac aaa tgc aga tta tgg gga 1200
Ser Arg Ile Met Asp Cys Val Gly Cys Asp Lys Cys Arg Leu Trp Gly
385 390 395 400

aaa tta cag act cag ggt tta gga act gcc ctg aag ata tta ttc tct 1248
Lys Leu Gln Thr Gln Gly Leu Gly Thr Ala Leu Lys Ile Leu Phe Ser
405 410 415

gaa aaa gaa atc caa aag ctt cca gag aat agt cca tct aaa ggc ttc 1296
Glu Lys Glu Ile Gln Lys Leu Pro Glu Asn Ser Pro Ser Lys Gly Phe
420 425 430

caa ctc acc cga cag gaa ata gtt gct ctt tta aat gct ttt gga agg 1344
Gln Leu Thr Arg Gln Glu Ile Val Ala Leu Leu Asn Ala Phe Gly Arg
435 440 445

ctt tct aca agt ata aga gac tta cag aat ttt aaa gtc tta tta caa 1392
Leu Ser Thr Ser Ile Arg Asp Leu Gln Asn Phe Lys Val Leu Leu Gln
450 455 460

cac agt agg taa 1404
His Ser Arg
465

<211> 467
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 147
 Met Ser Gln Gly Val Arg Arg Ala Gly Ala Gly Gln Gly Val Ala Ala
 1 5 10 15

 Ala Val Gln Leu Leu Val Thr Leu Ser Phe Leu Arg Ser Val Val Glu
 20 25 30

 Ala Gln Val Thr Gly Val Leu Asp Asp Cys Leu Cys Asp Ile Asp Ser
 35 40 45

 Ile Asp Asn Phe Asn Thr Tyr Lys Ile Phe Pro Lys Ile Lys Lys Leu
 50 55 60

 Gln Glu Arg Asp Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Val Asn Leu Lys Arg Pro
 65 70 75 80

 Cys Pro Phe Trp Ala Glu Asp Gly His Cys Ser Ile Lys Asp Cys His
 85 90 95

 Val Glu Pro Cys Pro Glu Ser Lys Ile Pro Val Gly Ile Lys Ala Gly
 100 105 110

 His Ser Asn Lys Tyr Leu Lys Met Ala Asn Asn Thr Lys Glu Leu Glu
 115 120 125

 Val Cys Glu Gln Ala Asn Lys Leu Gly Ala Ile Asn Ser Thr Leu Ser

130	135	140
Asn Gln Ser Lys Glu Ala Phe Ile Asp Trp Ala Arg Tyr Asp Asp Ser		
145	150	155 160
Arg Asp His Phe Cys Glu Leu Asp Asp Glu Arg Ser Pro Ala Ala Gln		
	165	170 175
Tyr Val Asp Leu Leu Leu Asn Pro Glu Arg Tyr Thr Gly Tyr Lys Gly		
	180	185 190
Thr Ser Ala Trp Arg Val Trp Asn Ser Ile Tyr Glu Glu Asn Cys Phe		
	195	200 205
Lys Pro Arg Ser Val Tyr Arg Pro Leu Asn Pro Leu Ala Pro Ser Arg		
	210	215 220
Gly Glu Asp Asp Gly Glu Ser Phe Tyr Thr Trp Leu Glu Gly Leu Cys		
	225	230 235 240
Leu Glu Lys Arg Val Phe Tyr Lys Leu Ile Ser Gly Leu His Ala Ser		
	245	250 255
Ile Asn Leu His Leu Cys Ala Asn Tyr Leu Leu Glu Glu Thr Trp Gly		
	260	265 270
Lys Pro Ser Trp Gly Pro Asn Ile Lys Glu Phe Lys His Arg Phe Asp		
	275	280 285
Pro Val Glu Thr Lys Gly Glu Gly Pro Arg Arg Leu Lys Asn Leu Tyr		
	290	295 300

Phe Leu Tyr Leu Ile Glu Leu Arg Ala Leu Ser Lys Val Ala Pro Tyr
305 310 315 320

Phe Glu Arg Ser Ile Val Asp Leu Tyr Thr Gly Asn Ala Glu Glu Asp
325 330 335

Ala Asp Thr Lys Thr Leu Leu Leu Asn Ile Phe Gln Asp Thr Lys Ser
340 345 350

Phe Pro Met His Phe Asp Glu Lys Ser Met Phe Ala Gly Asp Lys Lys
355 360 365

Gly Ala Lys Ser Leu Lys Glu Glu Phe Arg Leu His Phe Lys Asn Ile
370 375 380

Ser Arg Ile Met Asp Cys Val Gly Cys Asp Lys Cys Arg Leu Trp Gly
385 390 395 400

Lys Leu Gln Thr Gln Gly Leu Gly Thr Ala Leu Lys Ile Leu Phe Ser
405 410 415

Glu Lys Glu Ile Gln Lys Leu Pro Glu Asn Ser Pro Ser Lys Gly Phe
420 425 430

Gln Leu Thr Arg Gln Glu Ile Val Ala Leu Leu Asn Ala Phe Gly Arg
435 440 445

Leu Ser Thr Ser Ile Arg Asp Leu Gln Asn Phe Lys Val Leu Leu Gln
450 455 460

His Ser Arg
465

<210> 148
<211> 1404
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> ADN sintético

<400> 148

atgtcccaag gtgttagaag agctgggtgct ggtcaagggtg ttgctgctgc tgttcaattg	60
ttggttacct tgtccttctt gagatccggt gttgaggctc aagttaccgg tgttttggac	120
gactgtttgt gtgacatcga ctccatcgac aacttcaaca cctacaagat cttcccaaag	180
atcaagaagt tgcaagagag agactacttc agatactaca aggttaactt gaagagacca	240
tgtccattct gggctgagga cggctactgt tccatcaagg actgtcacgt tgagccatgt	300
ccagagtcca agatcccagt tggatatcaag gctgggtcact ccaacaagta cttgaagatg	360
gctaacaaca ccaaggagtt ggaggtttgt gagcaagcta acaagttggg tgctatcaac	420
tccaccttgt ccaaccaatc caaggaggct ttcacgact gggctagata cgacgactcc	480
agagaccact tctgtgagtt ggacgacgag agatccccag ctgctcaata cgttgacttg	540
ttgttgaacc cagagagata cacoggttac aagggtacct ccgcttgag agtttggaa	600
tccatctacg aggagaactg tttcaagcca agatccgttt acagaccatt gaaccattg	660
gctccatcca gaggtgagga cgacggtgag tccttctaca cctggttgga gggtttgtgt	720
ttggagaaga gagttttcta caagttgatc tccggtttgc acgcttccat caacttgcac	780
ttgtgtgcta actacttgtt ggaggagacc tggggtaagc catcctgggg tccaaacatc	840
aaggagttca agcacagatt cgaccagtt gagaccaagg gtgagggtcc aagaagattg	900

10

aagaacttgt acttcttgta cttgatcgag ttgagagctt tgtccaaggt tgctccatac 960
 ttcgagagat ccacgttga cttgtacacc ggtaacgctg aggaggacgc tgacaccaag 1020
 accttgttgt tgaacatctt ccaagacacc aagtccttcc caatgcactt cgacgagaag 1080
 tccatgttcg ctggtgacaa gaagggtgct aagtccttga aggaggagtt cagattgcac 1140
 ttcaagaaca tctccagaat catggactgt gttggttgtg acaagtgtag attgtggggt 1200
 aagttgcaaa cccaagggtt gggtaccgct ttgaagatct tgttctccga gaaggagatc 1260
 caaaagttgc cagagaactc cccatccaag ggtttccaat tgaccagaca agagatcgtt 1320
 gctttgttga acgcttccg tagattgtcc acctccatca gagacttgca aaacttcaag 1380
 gttttgttgc aacactccag ataa 1404

<210> 149
 <211> 1965
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(1965)

<400> 149
 atg aag ctc tcc ctg gtg gcc gcg atg ctg ctg ctg ctc agc gcg gcg 48
 Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala
 1 5 10 15
 cgg gcc gag gag gag gac aag aag gag gac gtg ggc acg gtg gtc ggc 96
 Arg Ala Glu Glu Glu Asp Lys Lys Glu Asp Val Gly Thr Val Val Gly
 20 25 30
 atc gac ctg ggg acc acc tac tcc tgc gtc ggc gtg ttc aag aac ggc 144
 Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Val Gly Val Phe Lys Asn Gly
 35 40 45

cgc gtg gag atc atc gcc aac gat cag ggc aac cgc atc acg ccg tcc	192
Arg Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp Gln Gly Asn Arg Ile Thr Pro Ser	
50 55 60	
tat gtc gcc ttc act cct gaa ggg gaa cgt ctg att ggc gat gcc gcc	240
Tyr Val Ala Phe Thr Pro Glu Gly Glu Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala	
65 70 75 80	
aag aac cag ctc acc tcc aac ccc gag aac acg gtc ttt gac gcc aag	288
Lys Asn Gln Leu Thr Ser Asn Pro Glu Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys	
85 90 95	
cgg ctc atc ggc cgc acg tgg aat gac ccg tct gtg cag cag gac atc	336
Arg Leu Ile Gly Arg Thr Trp Asn Asp Pro Ser Val Gln Gln Asp Ile	
100 105 110	
aag ttc ttg ccg ttc aag gtg gtt gaa aag aaa act aaa cca tac att	384
Lys Phe Leu Pro Phe Lys Val Val Glu Lys Lys Thr Lys Pro Tyr Ile	
115 120 125	
caa gtt gat att gga ggt ggg caa aca aag aca ttt gct cct gaa gaa	432
Gln Val Asp Ile Gly Gly Gly Gln Thr Lys Thr Phe Ala Pro Glu Glu	
130 135 140	
att tct gcc atg gtt ctc act aaa atg aaa gaa acc gct gag gct tat	480
Ile Ser Ala Met Val Leu Thr Lys Met Lys Glu Thr Ala Glu Ala Tyr	
145 150 155 160	
ttg gga aag aag gtt acc cat gca gtt gtt act gta cca gcc tat ttt	528
Leu Gly Lys Lys Val Thr His Ala Val Val Thr Val Pro Ala Tyr Phe	
165 170 175	
aat gat gcc caa cgc caa gca acc aaa gac gct gga act att gct ggc	576
Asn Asp Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly	
180 185 190	
cta aat gtt atg agg atc atc aac gag cct acg gca gct gct att gct	624
Leu Asn Val Met Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Ile Ala	
195 200 205	
tat ggc ctg gat aag agg gag ggg gag aag aac atc ctg gtg ttt gac	672
Tyr Gly Leu Asp Lys Arg Glu Gly Glu Lys Asn Ile Leu Val Phe Asp	

210	215	220	
ctg ggt ggc gga acc ttc gat gtg tct ctt ctc acc att gac aat ggt			720
Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser Leu Leu Thr Ile Asp Asn Gly			
225	230	235	240
gtc ttc gaa gtt gtg gcc act aat gga gat act cat ctg ggt gga gaa			768
Val Phe Glu Val Val Ala Thr Asn Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu			
245	250	255	
gac ttt gac cag cgt gtc atg gaa cac ttc atc aaa ctg tac aaa aag			816
Asp Phe Asp Gln Arg Val Met Glu His Phe Ile Lys Leu Tyr Lys Lys			
260	265	270	
aag acg ggc aaa gat gtc agg aaa gac aat aga gct gtg cag aaa ctc			864
Lys Thr Gly Lys Asp Val Arg Lys Asp Asn Arg Ala Val Gln Lys Leu			
275	280	285	
cgg cgc gag gta gaa aag gcc aaa cgg gcc ctg tct tct cag cat caa			912
Arg Arg Glu Val Glu Lys Ala Lys Arg Ala Leu Ser Ser Gln His Gln			
290	295	300	
gca aga att gaa att gag tcc ttc tat gaa gga gaa gac ttt tct gag			960
Ala Arg Ile Glu Ile Glu Ser Phe Tyr Glu Gly Glu Asp Phe Ser Glu			
305	310	315	320
acc ctg act cgg gcc aaa ttt gaa gag ctc aac atg gat ctg ttc cgg			1008
Thr Leu Thr Arg Ala Lys Phe Glu Glu Leu Asn Met Asp Leu Phe Arg			
325	330	335	
tct act atg aag ccc gtc cag aaa gtg ttg gaa gat tct gat ttg aag			1056
Ser Thr Met Lys Pro Val Gln Lys Val Leu Glu Asp Ser Asp Leu Lys			
340	345	350	
aag tct gat att gat gaa att gtt ctt gtt ggt ggc tcg act cga att			1104
Lys Ser Asp Ile Asp Glu Ile Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile			
355	360	365	
cca aag att cag caa ctg gtt aaa gag ttc ttc aat ggc aag gaa cca			1152
Pro Lys Ile Gln Gln Leu Val Lys Glu Phe Phe Asn Gly Lys Glu Pro			
370	375	380	

tcc cgt ggc ata aac cca gat gaa gct gta gcg tat ggt gct gct gtc	1200
Ser Arg Gly Ile Asn Pro Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val	
385 390 395 400	
cag gct ggt gtg ctc tct ggt gat caa gat aca ggt gac ctg gta ctg	1248
Gln Ala Gly Val Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr Gly Asp Leu Val Leu	
405 410 415	
ctt gat gta tgt ccc ctt aca ctt ggt att gaa act gtg gga ggt gtc	1296
Leu Asp Val Cys Pro Leu Thr Leu Gly Ile Glu Thr Val Gly Gly Val	
420 425 430	
atg acc aaa ctg att cca agg aac aca gtg gtg cct acc aag aag tct	1344
Met Thr Lys Leu Ile Pro Arg Asn Thr Val Val Pro Thr Lys Lys Ser	
435 440 445	
cag atc ttt tct aca gct tct gat aat caa cca act gtt aca atc aag	1392
Gln Ile Phe Ser Thr Ala Ser Asp Asn Gln Pro Thr Val Thr Ile Lys	
450 455 460	
gtc tat gaa ggt gaa aga ccc ctg aca aaa gac aat cat ctt ctg ggt	1440
Val Tyr Glu Gly Glu Arg Pro Leu Thr Lys Asp Asn His Leu Leu Gly	
465 470 475 480	
aca ttt gat ctg act gga att cct cct gct cct cgt ggg gtc cca cag	1488
Thr Phe Asp Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln	
485 490 495	
att gaa gtc acc ttt gag ata gat gtg aat ggt att ctt cga gtg aca	1536
Ile Glu Val Thr Phe Glu Ile Asp Val Asn Gly Ile Leu Arg Val Thr	
500 505 510	
gct gaa gac aag ggt aca ggg aac aaa aat aag atc aca atc acc aat	1584
Ala Glu Asp Lys Gly Thr Gly Asn Lys Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn	
515 520 525	
gac cag aat cgc ctg aca cct gaa gaa atc gaa agg atg gtt aat gat	1632
Asp Gln Asn Arg Leu Thr Pro Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Asn Asp	
530 535 540	
gct gag aag ttt gct gag gaa gac aaa aag ctc aag gag cgc att gat	1680
Ala Glu Lys Phe Ala Glu Glu Asp Lys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Asp	

545	550	555	560	
act aga aat gag ttg gaa agc tat gcc tat tct cta aag aat cag att				1728
Thr Arg Asn Glu Leu Glu Ser Tyr Ala Tyr Ser Leu Lys Asn Gln Ile				
	565	570	575	
gga gat aaa gaa aag ctg gga ggt aaa ctt tcc tct gaa gat aag gag				1776
Gly Asp Lys Glu Lys Leu Gly Gly Lys Leu Ser Ser Glu Asp Lys Glu				
	580	585	590	
acc atg gaa aaa gct gta gaa gaa aag att gaa tgg ctg gaa agc cac				1824
Thr Met Glu Lys Ala Val Glu Glu Lys Ile Glu Trp Leu Glu Ser His				
	595	600	605	
caa gat gct gac att gaa gac ttc aaa gct aag aag aag gaa ctg gaa				1872
Gln Asp Ala Asp Ile Glu Asp Phe Lys Ala Lys Lys Lys Glu Leu Glu				
	610	615	620	
gaa att gtt caa cca att atc agc aaa ctc tat gga agt gca ggc cct				1920
Glu Ile Val Gln Pro Ile Ile Ser Lys Leu Tyr Gly Ser Ala Gly Pro				
	625	630	635	640
ccc cca act ggt gaa gag gat aca gca gaa aaa gat gag ttg tag				1965
Pro Pro Thr Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Lys Asp Glu Leu				
	645	650		
 <210> 150				
<211> 654				
<212> PRT				
<213> <i>Homo sapiens</i>				
 <400> 150				
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala				
1	5	10	15	
 Arg Ala Glu Glu Glu Asp Lys Lys Glu Asp Val Gly Thr Val Val Gly				
	20	25	30	

5

Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Val Gly Val Phe Lys Asn Gly
35 40 45

Arg Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp Gln Gly Asn Arg Ile Thr Pro Ser
50 55 60

Tyr Val Ala Phe Thr Pro Glu Gly Glu Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala
65 70 75 80

Lys Asn Gln Leu Thr Ser Asn Pro Glu Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys
85 90 95

Arg Leu Ile Gly Arg Thr Trp Asn Asp Pro Ser Val Gln Gln Asp Ile
100 105 110

Lys Phe Leu Pro Phe Lys Val Val Glu Lys Lys Thr Lys Pro Tyr Ile
115 120 125

Gln Val Asp Ile Gly Gly Gly Gln Thr Lys Thr Phe Ala Pro Glu Glu
130 135 140

Ile Ser Ala Met Val Leu Thr Lys Met Lys Glu Thr Ala Glu Ala Tyr
145 150 155 160

Leu Gly Lys Lys Val Thr His Ala Val Val Thr Val Pro Ala Tyr Phe
165 170 175

Asn Asp Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly
180 185 190

Leu Asn Val Met Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Ile Ala
195 200 205

Tyr Gly Leu Asp Lys Arg Glu Gly Glu Lys Asn Ile Leu Val Phe Asp
210 215 220

Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser Leu Leu Thr Ile Asp Asn Gly
225 230 235 240

Val Phe Glu Val Val Ala Thr Asn Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu
245 250 255

Asp Phe Asp Gln Arg Val Met Glu His Phe Ile Lys Leu Tyr Lys Lys
260 265 270

Lys Thr Gly Lys Asp Val Arg Lys Asp Asn Arg Ala Val Gln Lys Leu
275 280 285

Arg Arg Glu Val Glu Lys Ala Lys Arg Ala Leu Ser Ser Gln His Gln
290 295 300

Ala Arg Ile Glu Ile Glu Ser Phe Tyr Glu Gly Glu Asp Phe Ser Glu
305 310 315 320

Thr Leu Thr Arg Ala Lys Phe Glu Glu Leu Asn Met Asp Leu Phe Arg
325 330 335

Ser Thr Met Lys Pro Val Gln Lys Val Leu Glu Asp Ser Asp Leu Lys
340 345 350

Lys Ser Asp Ile Asp Glu Ile Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile
355 360 365

Pro Lys Ile Gln Gln Leu Val Lys Glu Phe Phe Asn Gly Lys Glu Pro
370 375 380

Ser Arg Gly Ile Asn Pro Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val
385 390 395 400

Gln Ala Gly Val Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr Gly Asp Leu Val Leu
405 410 415

Leu Asp Val Cys Pro Leu Thr Leu Gly Ile Glu Thr Val Gly Gly Val
420 425 430

Met Thr Lys Leu Ile Pro Arg Asn Thr Val Val Pro Thr Lys Lys Ser
435 440 445

Gln Ile Phe Ser Thr Ala Ser Asp Asn Gln Pro Thr Val Thr Ile Lys
450 455 460

Val Tyr Glu Gly Glu Arg Pro Leu Thr Lys Asp Asn His Leu Leu Gly
465 470 475 480

Thr Phe Asp Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln
485 490 495

Ile Glu Val Thr Phe Glu Ile Asp Val Asn Gly Ile Leu Arg Val Thr
500 505 510

Ala Glu Asp Lys Gly Thr Gly Asn Lys Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn
515 520 525

Asp Gln Asn Arg Leu Thr Pro Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Asn Asp
530 535 540

Ala Glu Lys Phe Ala Glu Glu Asp Lys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Asp
545 550 555 560

Thr Arg Asn Glu Leu Glu Ser Tyr Ala Tyr Ser Leu Lys Asn Gln Ile
565 570 575

Gly Asp Lys Glu Lys Leu Gly Gly Lys Leu Ser Ser Glu Asp Lys Glu
580 585 590

Thr Met Glu Lys Ala Val Glu Glu Lys Ile Glu Trp Leu Glu Ser His
595 600 605

Gln Asp Ala Asp Ile Glu Asp Phe Lys Ala Lys Lys Lys Glu Leu Glu
610 615 620

Glu Ile Val Gln Pro Ile Ile Ser Lys Leu Tyr Gly Ser Ala Gly Pro
625 630 635 640

Pro Pro Thr Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Lys Asp Glu Leu
645 650

<210> 151
<211> 1965
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> ADN sintético

<400> 151
atgaagttgt ccttggttgc tgctatgttg ttgttgttgc ccgctgctag agctgaggag 60
gaggacaaga aggaggacgt tggtagcgtt gttggtatcg acttggttac cacctactcc 120

tgtgttggtg ttttcaagaa cggtagagtt gagatcatcg ctaacgacca aggtaacaga	180
atcaccccat cctacgttgc tttcacccca gagggtgaga gattgatcgg tgacgctgct	240
aagaaccaat tgacctccaa cccagagaa accgttttcg acgctaagag attgatcggg	300
agaacctgga acgacctatc cgttcaacaa gacatcaagt tcttgccatt caaggttggt	360
gagaagaaga ccaagccata catccaagtt gacatcgggtg gtggtcaaac caagaccttc	420
gctccagagg agatctccgc tatggttttg accaagatga aggagaccgc tgaggcttac	480
ttgggtaaga aggttaccca cgctgttggt accgttccag cttacttcaa cgacgctcaa	540
agacaagcta ccaaggacgc tgggtaccatc gctggtttga acgttatgag aatcatcaac	600
gagccaaccg ctgctgctat cgcttacggt ttggacaaga gagagggtga gaagaacatc	660
ttggttttcg acttgggtgg tgggtacctc gacgtttcct tgttgacct cgacaacggt	720
gttttcgagg ttgttgctac caacggtgac acccacttgg gtggtgagga cttcgaccaa	780
agagttatgg agcacttcat caagttgtac aagaagaaga ccggttaagga cgtagaaaag	840
gacaacagag ctgttcaaaa gttgagaaga gaggttgaga aggctaagag agctttgtcc	900
tccaacacc aagctagaat cgagatcgag tccttctacg aggggtgagga cttctccgag	960
accttgacca gagctaagtt cgaggagttg aacatggact tgttcagatc caccatgaag	1020
ccagttcaaa aggttttggg ggactccgac ttgaagaagt ccgacatcga cgagatcgtt	1080
ttggttggtg gttccaccag aatcccaaag atccaacaat tggtaagga gttcttcaac	1140
ggtaaggagc catccagagg tatcaacca gacgaggctg ttgcttacgg tgctgctgtt	1200
caagctgggtg tttgtccgg tgaccaagac accggtgact tggttttgtt ggacgtttgt	1260
ccattgacct tgggtatcga gaccgttggt ggtgttatga ccaagttgat cccaagaaac	1320
accgttggtc caaccaagaa gtcccaaata ttctccaccg cttccgacaa ccaaccaacc	1380

gttaccatca aggtttacga gggtagagaga ccattgacca aggacaacca cttgttgggt 1440
 accttcgact tgaccggtat cccaccagct ccaagagggtg ttccacaaat cgaggttacc 1500
 ttcgagatcg acgttaacgg tatcttgaga gttaccgctg aggacaaggg taccggtaac 1560
 aagaacaaga tcaccatcac caacgaccaa aacagattga cccagagga gatcgagaga 1620
 atggttaacg acgtgagaa gttcgctgag gaggacaaga agttgaagga gagaatcgac 1680
 accagaaacg agttggagtc ctacgcttac tccttgaaga accaaatcgg tgacaaggag 1740
 aagttgggtg gtaagttgtc ctccgaggac aaggagacca tggagaaggc tgttgaggag 1800
 aagatcgagt gttggagtc ccaccaagac gctgacatcg aggacttcaa ggctaagaag 1860
 aaggagttgg aggagatcgt tcaaccaatc atctccaagt tgtacggttc cgctgggtcca 1920
 ccaccaaccg gtgaggagga caccgctgag aaggacgagt tgtaa 1965

<210> 152
 <211> 1965
 <212> ADN
 <213> *Cricetulus griseus*

5

<400> 152
 atgaagttcc ctatggtggc ggccgctg ctgctgctct gcgcggtgcg ggccgaggag 60
 gaggacaaga aggaggatgt gggcacggtg gtcggcatcg acctggggac cacctattcc 120
 tgcgttggtg tgttcaagaa cggccgctg gagatcatag ccaacgatca gggcaaccgc 180
 atcacgccgt cgtatgtggc cttcactcct gaaggcgagc gtctgattgg cgatgcggcc 240
 aagaaccagc tcacctcaa tcccgagaac acggtcttcg acgccaagcg cctcatcgga 300
 cgcacttgga atgacccttc agtgcagcag gacatcaagt tcttgccctt caaggtggtt 360
 gaaaagaaaa ctaaaccata cattcaagtt gatattggag gtgggcaaac caaacattt 420

gccccagaag aaattttctgc catggttctc actaaaatga aagaaactgc tgaagcatat 480

ttgggaaaga aggttaccca tgcagttggt actgtgccgg cttacttcaa tgatgccag 540

cgccaagcaa ccaaagatgc tggcaccatt gctggactga atgtcatgcg gatcatcaat 600

gagcccacag cagctgctat tgcgtatggc ctggataaga gagagggcga gaagaacatc 660

ctcgtttttg acctgggggg tggaaccttc gatgtgtctc ttctgaccat tgacaatggt 720

gtctttgaag tgggtggccac gaatggagac actcatctcg gtggggaaga ctttgatcag 780

cgggttatgg aacacttcat caagctgtac aaaaagaaaa ctgggaaaga cgtagaaaa 840

gacaacagag ctgtgcagaa acttcgtcgt gaggtggaaa aggctaagcg agccctgtct 900

tctcagcatc aagcaagaat tgagatagag tccttctttg aaggagaaga cttctctgag 960

accttgactc gggccaaatt tgaagagttg aacatggacc tgttccgac taccatgaag 1020

ccagtccaga aagtgttga agactctgat ctgaagaaat cagacattga tgaaattggt 1080

cttgctggtg ggtctactcg gattcccaag attcagcagc tggtgaaaga gttcttcaat 1140

ggcaaggagc catcccgtgg cataaaccca gatgaggctg tagcatacgg tgctgctgtc 1200

caggctggtg tcctctctgg tgatcaagat acaggatgac tggactgct tgatgtatgt 1260

cctcttacac ttggtattga aacagtggga ggtgtcatga ccaaactgat tccaaggaac 1320

actgtggtac ccaccaagaa gtctcagatc tttccacag cttctgataa tcagccaact 1380

gtaacaatca aggtctatga aggtgaacga cccctaaca aagacaacca tcttctgggt 1440

acatttgatc tgaactggaat tcctctgct cctcgtgggg taccacagat tgaagtcacc 1500

tttgagatag atgttaatgg tattcttcga gtgacagctg aagacaaagg tacagggaac 1560

aaaaacaaaa tcacaattac caatgaccaa aatgcctga cacctgaaga aattgaaagg 1620

atggttaatg atgcagagaa gtttgctgag gaagacaaaa agctcaaaga ggcattgat 1680

accaggaacg agttggaaag ctatgcttac tctctcaaga accagattgg agataaagaa 1740
aagctgggcg gtaaactttc ctctgaagat aaagaaacca tggagaaagc tgtagaggaa 1800
aagattgaat ggctggaaag ccaccaggat gcagacattg aagactttaa agctaaaaag 1860
aaggaactag aggaaattgt tcagcctatt attagcaaac tctatggaag tgcaggccct 1920
.cccccaactg gtgaagagga tacatcagaa aaagatgagt tgtag 1965

<210> 153
<211> 1530
<212> ADN
<213> *Cricetulus griseus*

<400> 153
atgctgagcc gttctctgct gtgcctggcc ctggcctggg tggccagggt gggcgccgac 60
gccccggagg aggaggacaa cgtcctgggtg ctgaagaaga gcaacttcgc agaggcgctg 120
gcggcacaca actacctgct ggtggagttc tatgccccgt ggtgtggcca ctgcaaagct 180
ctggcccctg agtatgcaa agccgctgca aagctgaagg cagaaggctc cgagattcga 240
ctcgccaagg tggacgccac cgaagagtct gacctggctc agcagtatgg cgtccgcggc 300
taccctacaa tcaagttctt caagaatgga gacacagcgt cccctaagga gtacacagct 360
ggcaggggaag ctgacgacat tgtgaactgg ctgaagaagc gaacaggctc tgctgccaca 420
accctgtctg acaccgcagc ggccgagacc ttgatagact caagcgaggt ggctgtcatc 480
ggttttctca aggatgtaga gtcagactct gccaaagcagt tcttgctggc ggctgaggct 540
gtcgatgaca taccttttgg gatcacgtcc aacagtgggtg tgttctccaa gtaccagctg 600
gacaaggatg ggggtggctct cttaagaag tttgatgaag gccgaaacaa ctttgaaggt 660
gaggtcacca aggagaagct gctagacttc attaagcaca accaactgcc tttggtcatc 720
gagttcactg aacagacagc ccogaagatt tttggagggtg aaatcaagac acacattctg 780

ctattcctgc ccaagagtgt atctgactac gatggcaagt tgggcaactt caagaaagca 840
 gccgaaggct tcaagggcaa gatcctgttt atcttcacg acagcgacca cactgacaac 900
 cagcgtatcc tggagttctt tggcctgaag aaggaggagt gtccagctgt gcggcttatt 960
 accctagagg aagaaatgac caagtacaaa ccagagtcag atgagctaac agctgagaag 1020
 atcacagaat ttgcccacg cttcctggag ggcaagatca agccccactt gatgagccag 1080
 gaactgcctg aagactggga taaacagcca gtgaaagtgc tagttgggaa aaactttgaa 1140
 gaagttgctt ttgatgagaa aaagaacgtc tttgtggaat tctatgcccc ctggtgtggc 1200
 cactgcaagc agctagcccc catttgggac aaactgggag agacatacaa ggatcatgaa 1260
 aatatcatca ttgctaagat ggactcaaca gctaattagg tggaaagcgt caaagtgcac 1320
 agtttcccca ccctgaagtt cttcccagca actgcagaca gaacgggtcat tgattataat 1380
 ggtgagcgga cgctagacgg ttttaagaaa ttcttgga gttgtggcca ggatggtgca 1440
 ggagacgatg atgatgtgga cctagaggaa gctttagagc cagacatgga ggaggatgat 1500
 gaccagaaag ctgtaaagga cgaattgtag 1530

<210> 154
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 154

atgcatttac aactcgtcc 19

<210> 155
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 155

atgcatttag tggatgtttt g 21

<210> 156
 <211> 21

	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
5	<223> cebador		
	<400> 156		
	atgcatttat ctggagtgtt g	21	
10	<210> 157		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 157		
	cgggcccccc ctcgagtcta tgetccaaga cct	33	
20	<210> 158		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 158		
30	taccgtcgac ctcgatcaac aaccactgat tcc	33	
	<210> 159		
	<211> 35		
	<212> ADN		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
40	<400> 159		
	agttctagag cggccatcct atacctgtcg tgcct	35	
	<210> 160		
	<211> 38		
45	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
50	<400> 160		
	accgcggtgg cggccgctcg tgttgtcca ggtaatcc	38	
	<210> 161		
55	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> cebador		
	<400> 161		
	ggtagaggac cgtatgtagc	20	

5	<210> 162 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
10	<400> 162 caatgaaacg tttccgtagg t	21
15	<210> 163 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
20	<400> 163 tgcgaaatcg ggccctct	18
25	<210> 164 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
30	<400> 164 ccggagtttg cacggctac	19
35	<210> 165 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
40	<400> 165 cggtgacgac ttcgactagt cgag	24
45	<210> 166 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
50	<400> 166 cggctgctgtt ggctcgtca tgggtg	26
55	<210> 167 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
60		

	<400> 167	
	ggcggttcc aattccactc tgetg	25
5	<210> 168	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 168	
	cgacgagtcc tctcaccagg aggttg	26
15		

REIVINDICACIONES

1. Célula huésped transformada

5 (i) en la que se han introducido uno o una combinación de dos o más de los genes de chaperonas (a) a (c) a continuación:

(a) un gen que comprende ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1;

10 (b) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas, en la que las condiciones rigurosas comprenden una concentración de sodio de 15 a 750 mM, una temperatura de 25°C a 70°C, una concentración de formamida del 0% al 50%, lavándose el filtro a una
15 concentración de sal de sodio de 15 a 600 mM y a una temperatura de 50°C a 70°C tras la hibridación; y

(c) un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas, en la que la homología se determina usando un programa FASTA o BLAST, o

20 (ii) en la que se han introducido uno o una combinación de dos o más de los genes que codifican para las proteínas chaperonas (d) a (f) a continuación:

25 (d) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

(e) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas, en la que la homología se determina usando un programa FASTA o
30 BLAST; y

(f) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 mediante delección, sustitución y/o adición de uno a 10 aminoácidos y que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas.

35 2. Célula huésped transformada según la reivindicación 1(i), en la que se han introducido adicionalmente uno o una combinación de dos o más de los genes de chaperonas (iv) a (vi) a continuación:

40 (iv) un gen que comprende ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11 ó 13;

(v) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11 ó 13 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aumento de la secreción de
45 proteínas foráneas, en la que las condiciones rigurosas comprenden una concentración de sodio de 15 a 750 mM, una temperatura de 25°C a 70°C, una concentración de formamida del 0% al 50%, lavándose el filtro a una concentración de sal de sodio de 15 a 600 mM y a una temperatura de 50°C a 70°C tras la hibridación; y

50 (vi) un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11 ó 13 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas, en la que la homología se determina usando un programa FASTA o BLAST.

55 3. Célula huésped transformada según la reivindicación 1(ii), en la que se han introducido adicionalmente uno o una combinación de dos o más de los genes que codifican para las proteínas chaperonas (vii) a (ix) a continuación:

60 (vii) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 ó 14;

(viii) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 ó 14 y que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas, en la que la homología se determina usando un programa FASTA o BLAST; y

65

(ix) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 ó 14 mediante delección, sustitución y/o adición de uno a 10 aminoácidos y que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas.

- 5 4. Célula huésped transformada según la reivindicación 1, en la que la célula huésped es una célula eucariota.
5. Célula huésped transformada según la reivindicación 4, en la que la célula eucariota es una célula de levadura.
- 10 6. Célula huésped transformada según la reivindicación 5, en la que la levadura es una levadura asimiladora de metanol.
7. Célula huésped transformada según la reivindicación 6, en la que la levadura asimiladora de metanol es *Ogataea minuta*.
- 15 8. Célula huésped transformada según la reivindicación 5, en la que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
9. Célula huésped transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que se ha introducido un gen que codifica para una proteína diana foránea.
- 20 10. Célula huésped transformada según la reivindicación 9, en la que la proteína foránea es una proteína multimérica.
11. Célula huésped transformada según la reivindicación 10, en la que la proteína multimérica es un heteromultímero.
- 25 12. Célula huésped transformada según la reivindicación 11, en la que el heteromultímero es un anticuerpo.
13. Célula huésped transformada según la reivindicación 9, en la que la proteína foránea es glicosiltransferasa.
- 30 14. Método para producir una proteína que comprende cultivar la célula huésped transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 en un medio y tomar una muestra de una proteína diana del producto de cultivo.
- 35 15. Método para producir una proteína según la reivindicación 14, en el que cultivo se lleva a cabo en condiciones en las que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT).
16. Método para producir una proteína según la reivindicación 15, en el que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) con la adición de un inhibidor de la actividad PMT al medio.
- 40 17. Método para producir una proteína según la reivindicación 16, en el que el inhibidor de la actividad PMT es ácido 5-[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metilen]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinacético.
18. Método para producir una proteína según la reivindicación 15, en el que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) por medio de la destrucción del gen PMT.
- 45 19. Método para producir una proteína según la reivindicación 15, en el que se inhibe la actividad proteína O-manosiltransferasa (PMT) por medio de la destrucción del gen PMT y con la adición de un inhibidor de la actividad PMT al medio.
- 50 20. Método para producir una proteína según la reivindicación 19, en el que el inhibidor de la actividad PMT es ácido 5-[[3,4-(1-fenilmetoxi)fenil]metilen]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidinacético.
21. Método para producir una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que la destrucción del gen PMT es una destrucción simple del gen PMT5 o el gen PMT6 o una destrucción doble del gen PMT5 y el gen PMT6.
- 55 22. Cualquiera de los genes de chaperonas (a) a (c) a continuación de *Ogataea minuta*:
(a) un gen que comprende ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1;
(b) un gen que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas, en los que las condiciones rigurosas comprenden una concentración de sodio de 15 a 750 mM, una temperatura de 25°C a 70°C, una concentración de formamida del 0% al 50%, lavándose el filtro a una
- 65

concentración de sal de sodio de 15 a 600 mM y a una temperatura de 50°C a 70°C tras la hibridación; y

5 (c) un gen que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 y que codifica para una proteína que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas, en los que la homología se determina usando un programa FASTA o BLAST,

o

10 un gen que codifica para cualquiera de las proteínas chaperonas (d) a (f) a continuación :

(d) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

15 (e) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas, en los que la homología se determina usando un programa FASTA o BLAST; y

20 (f) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 mediante delección, sustitución y/o adición de uno a 10 aminoácidos y que tiene una actividad de aumento de la secreción de proteínas foráneas.

Fig. 1

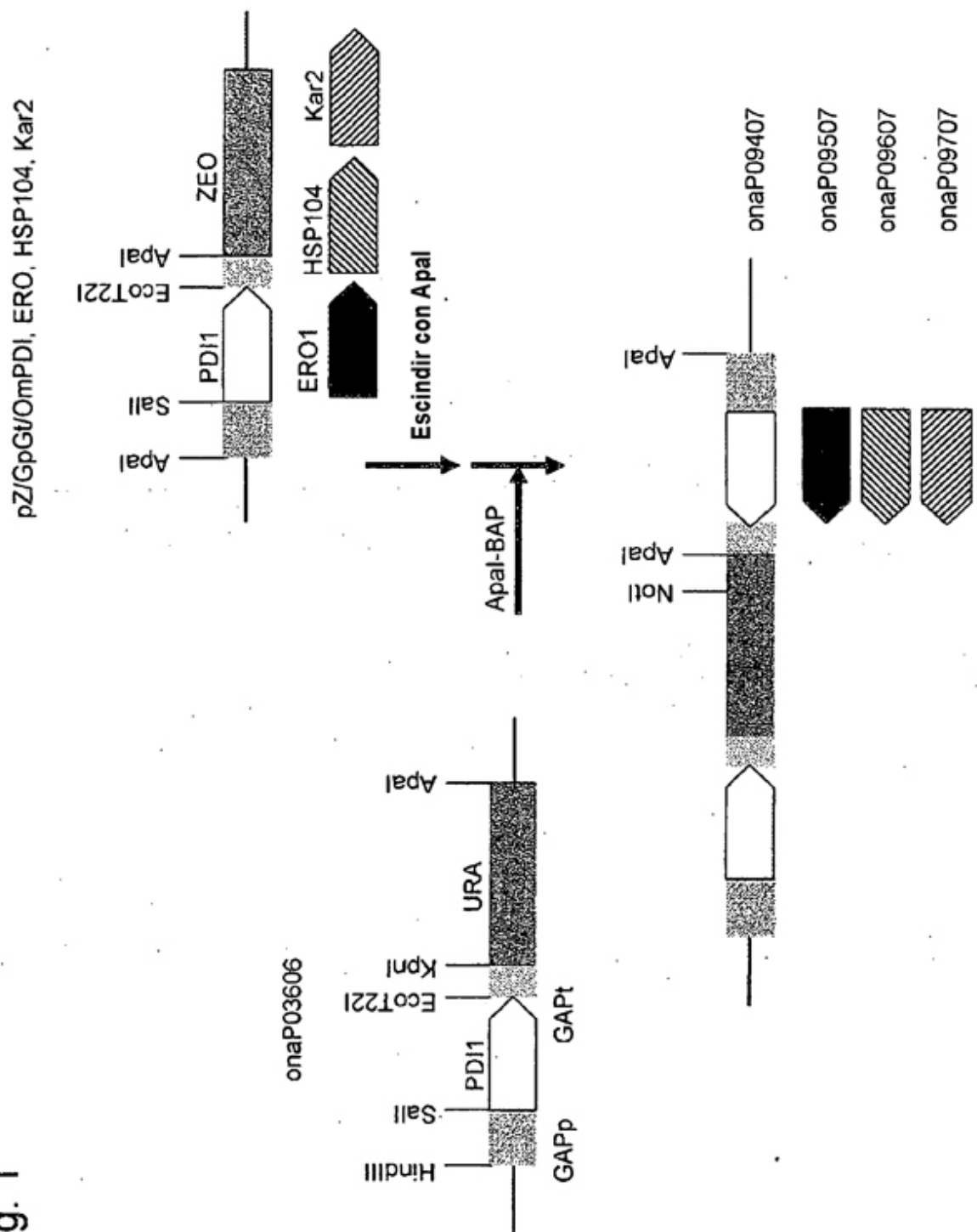


Fig. 2

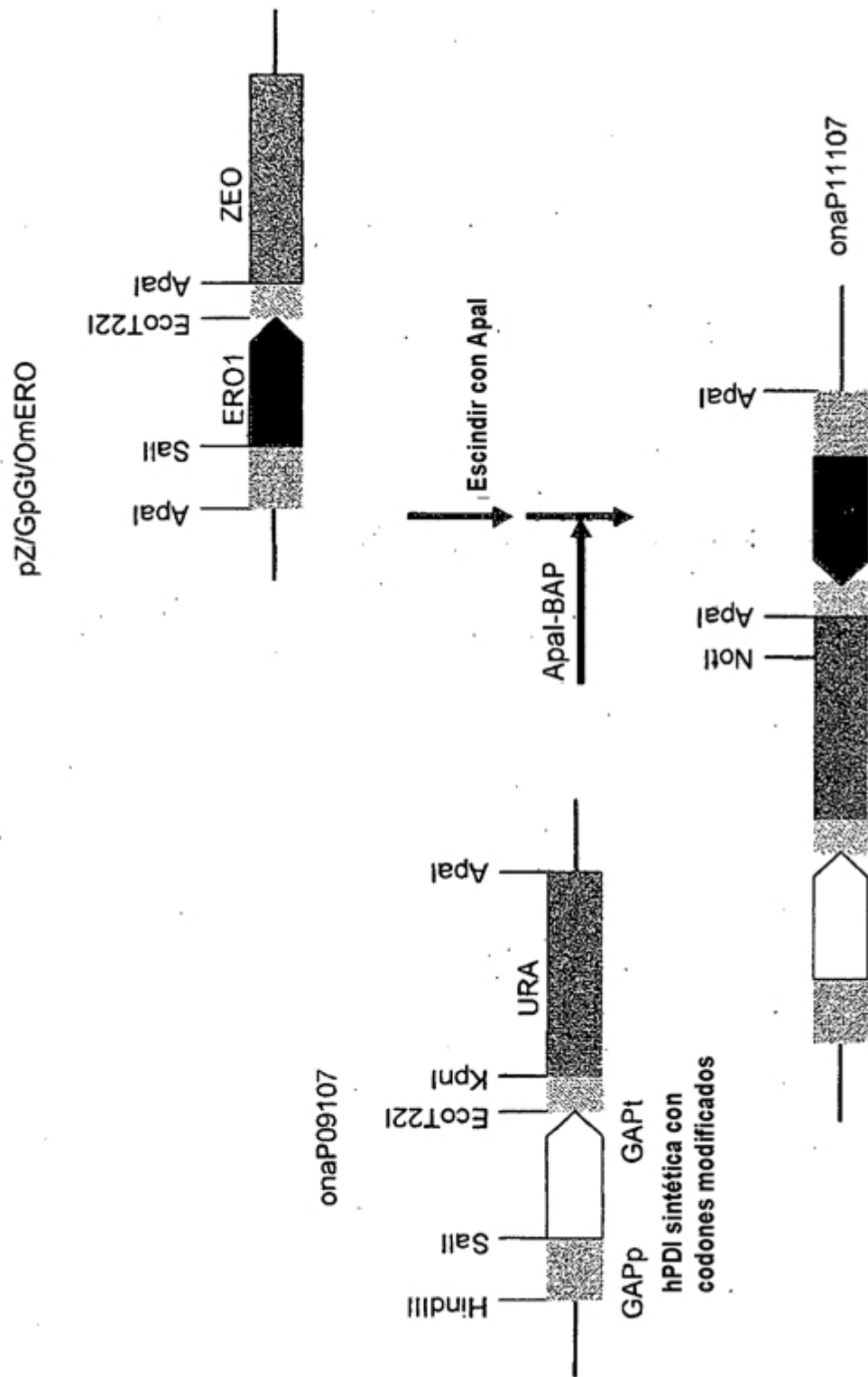


Fig. 3

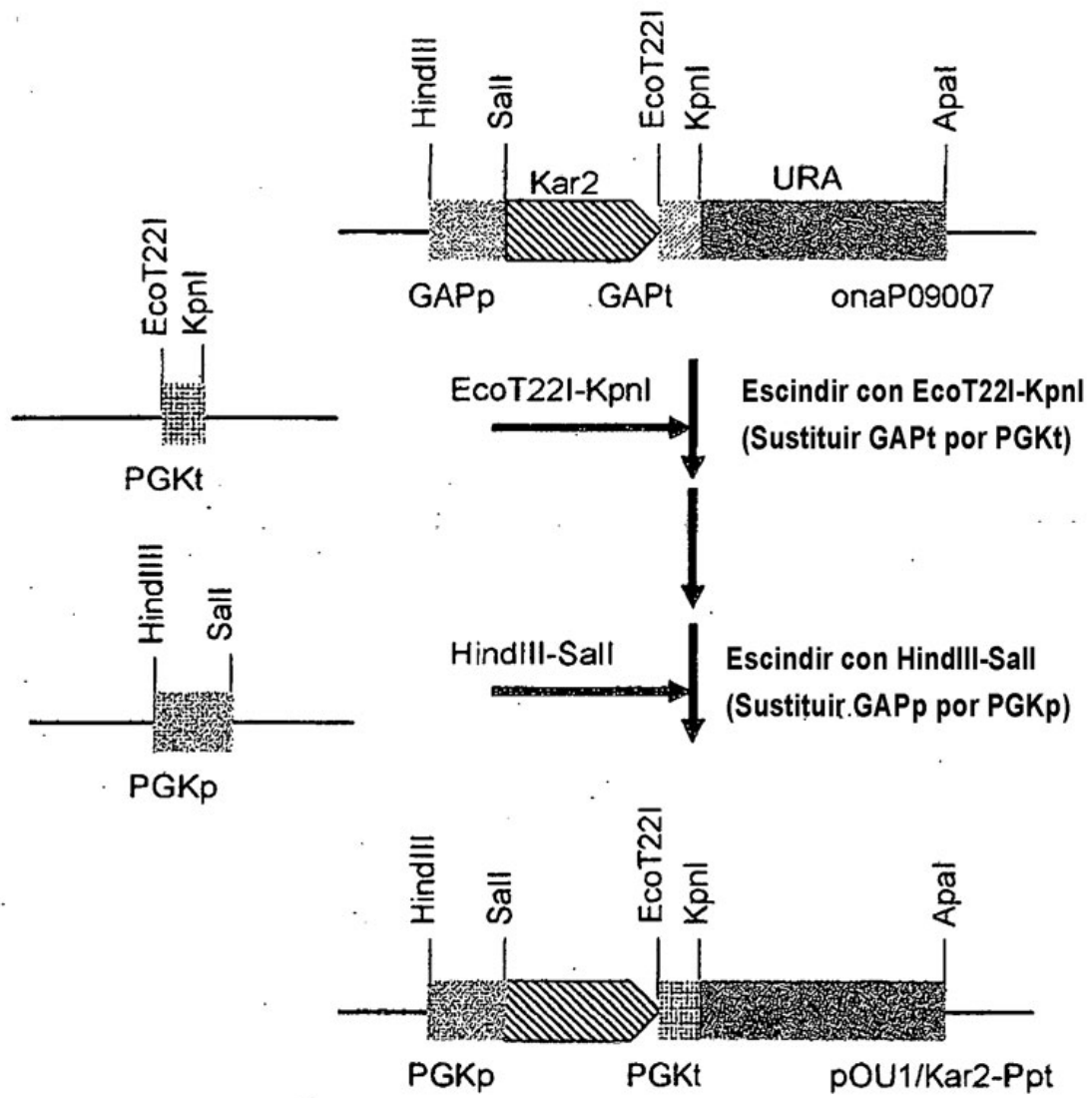


Fig. 4

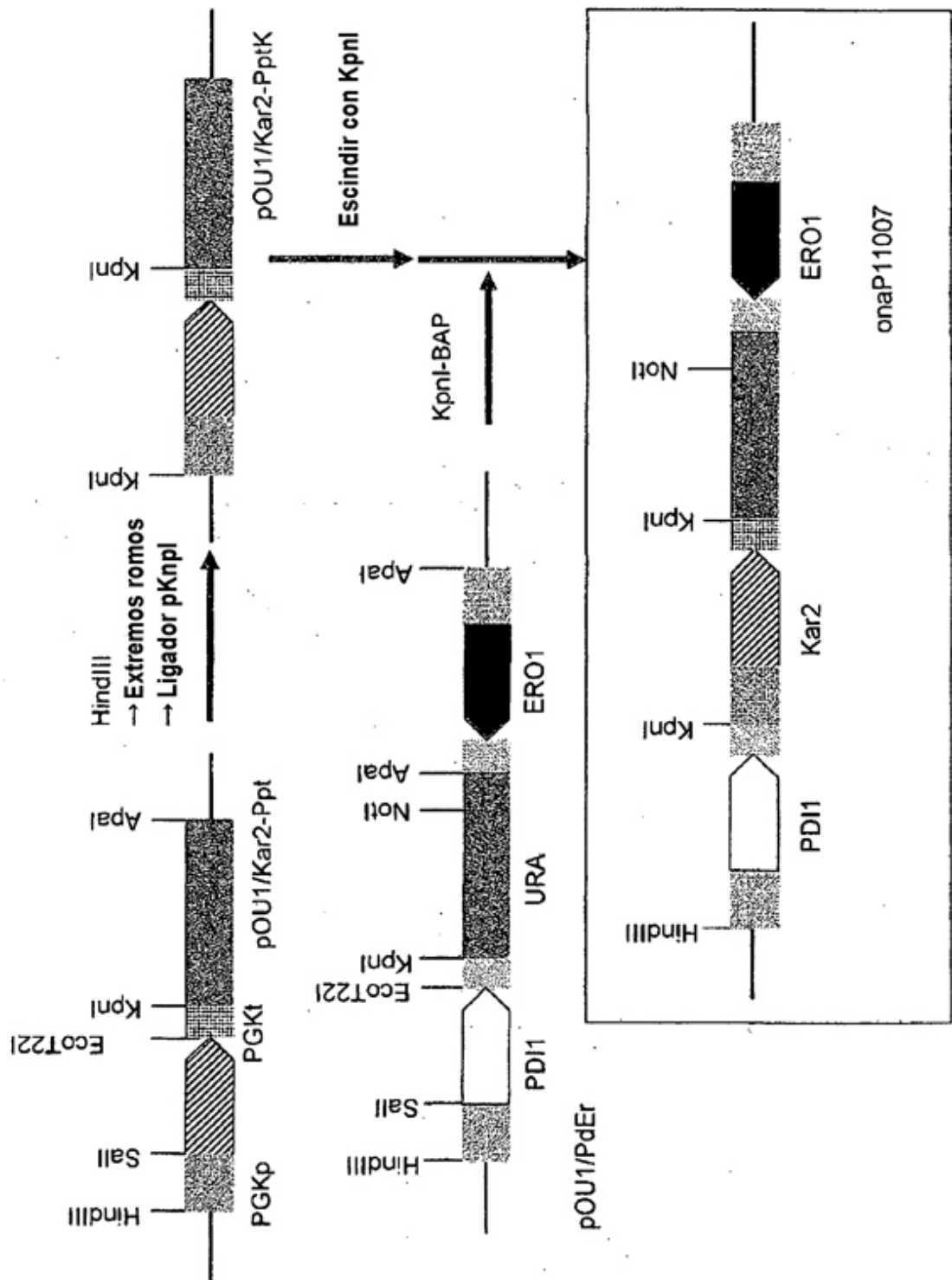
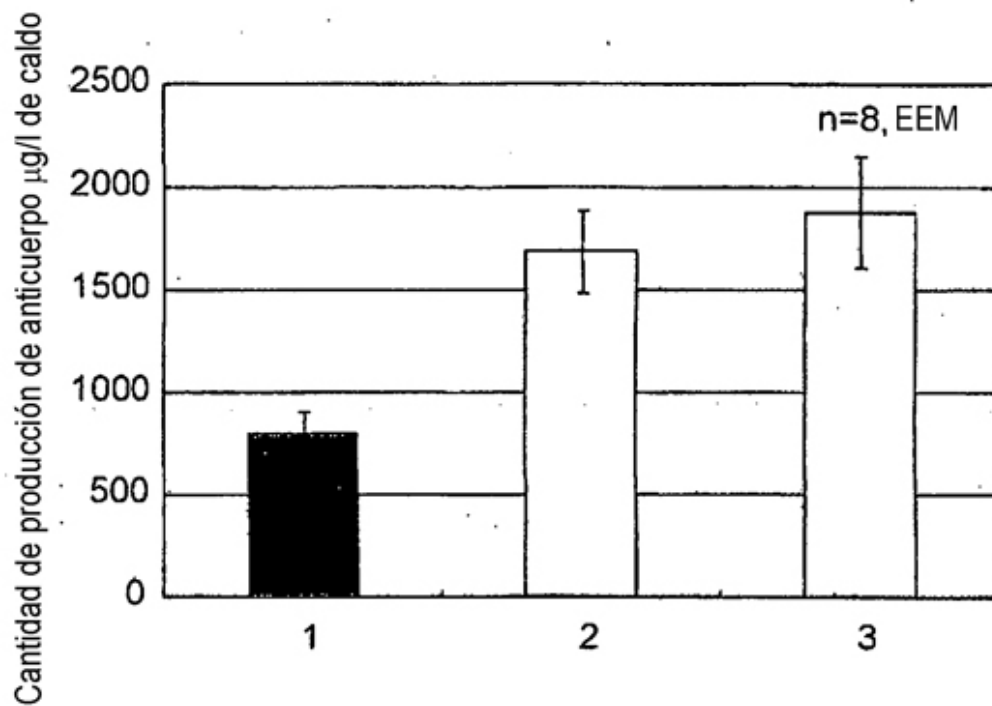


Fig. 5



1 cepa ona02306

2 cepa ona02306

Añadir 100 µl de medio que contiene 1 c 20 µM el día 3

3 cepa ona02306

Añadir 100 µl de medio que contiene 1 c 20 µM el día 2 y el día 3

Fig. 6

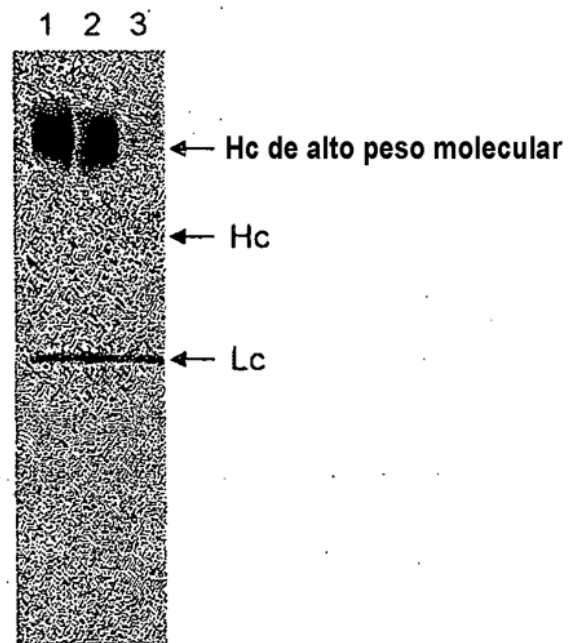


Fig. 7

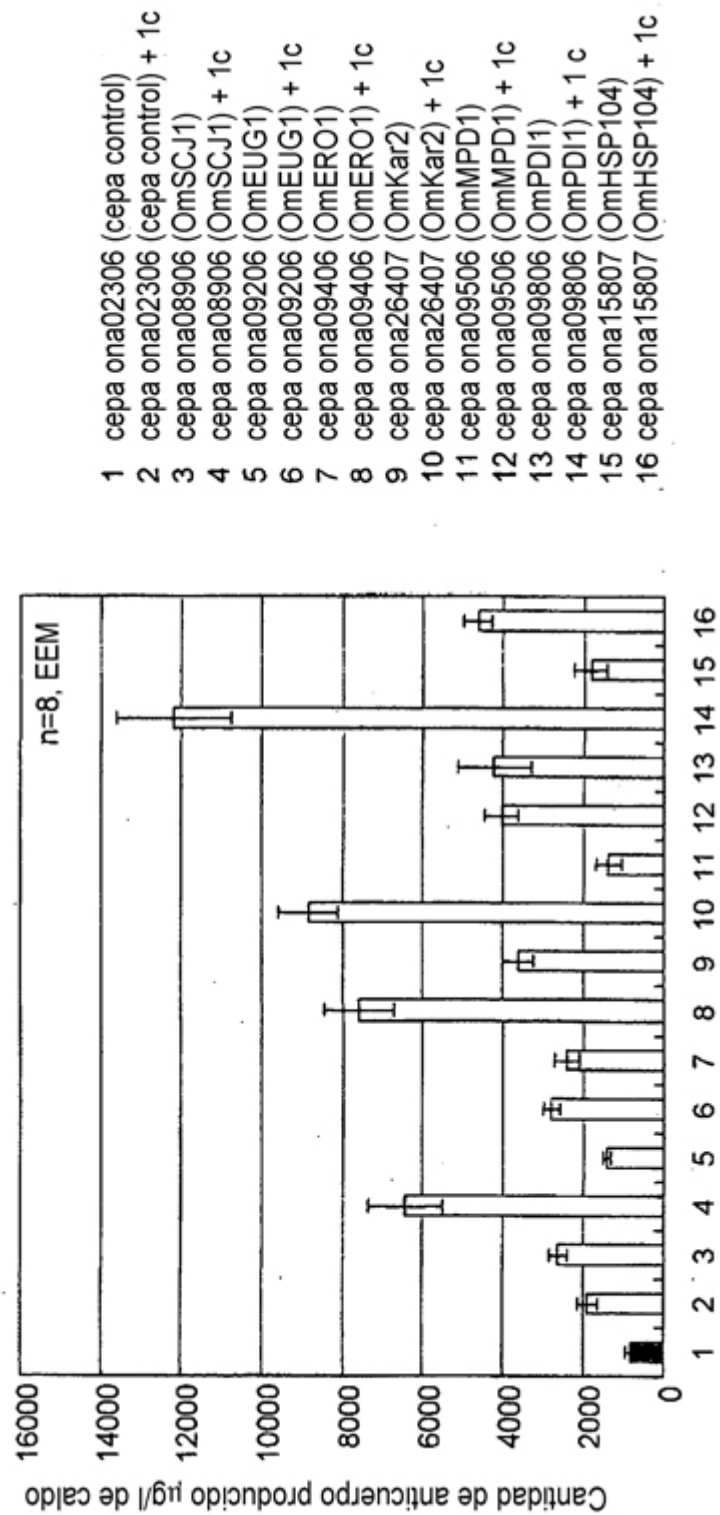


Fig. 8

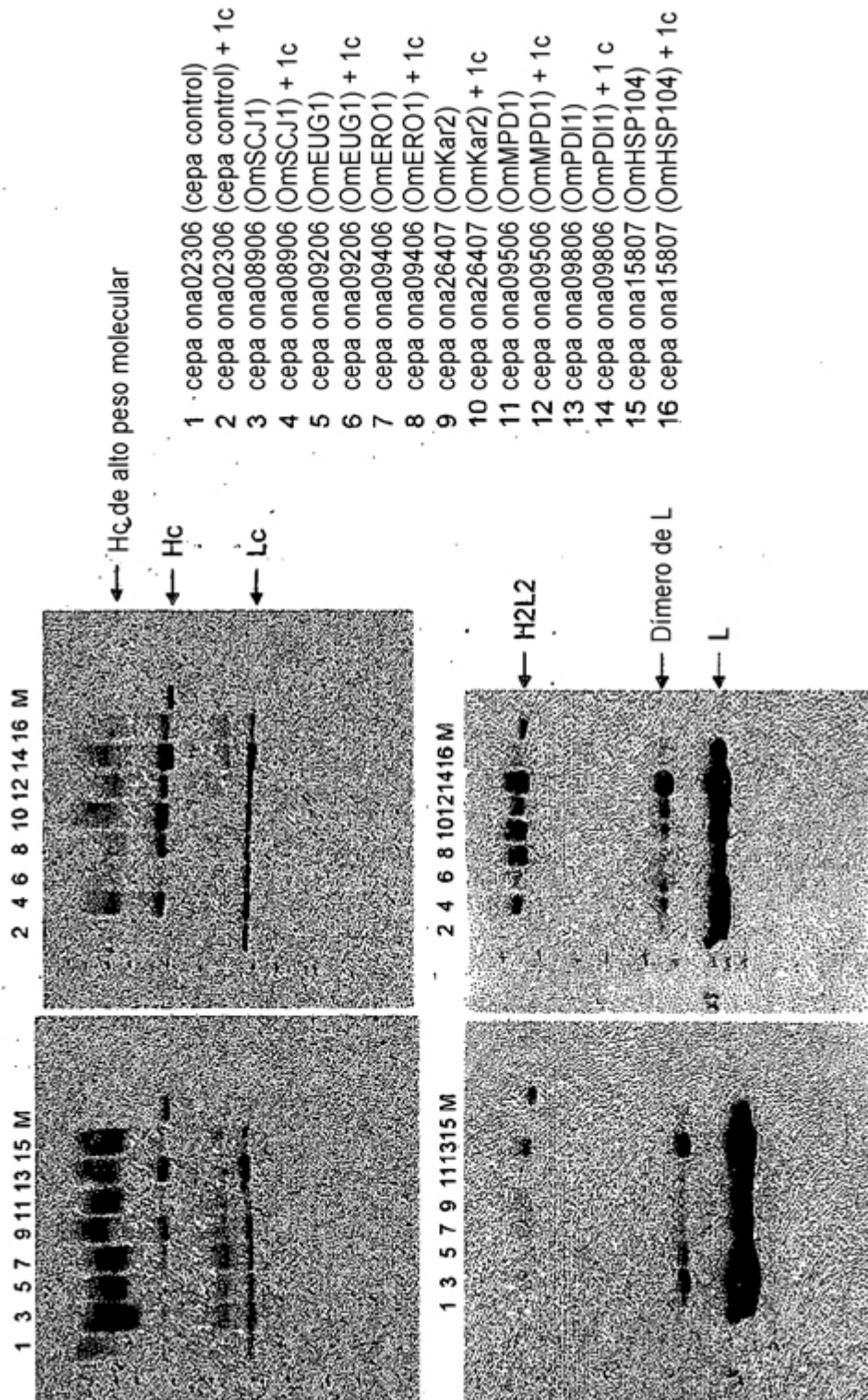


Fig. 9

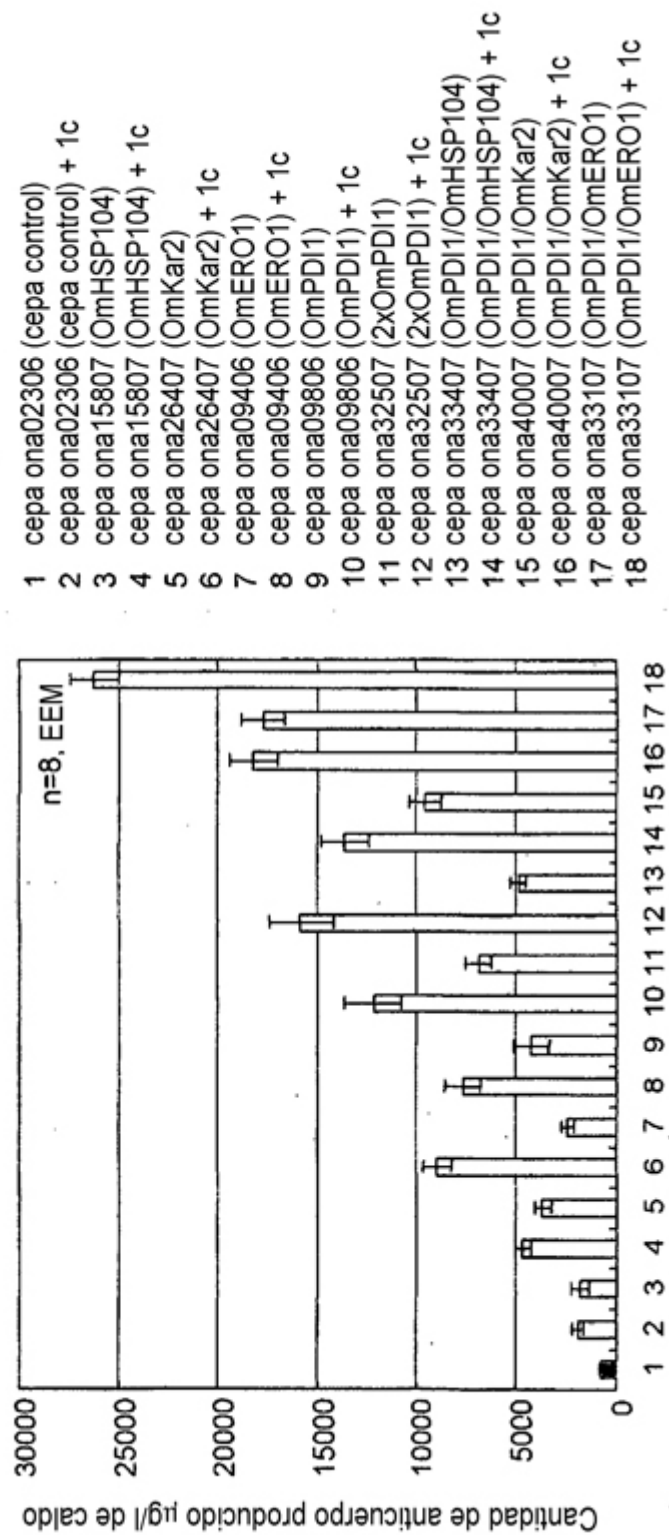


Fig. 10

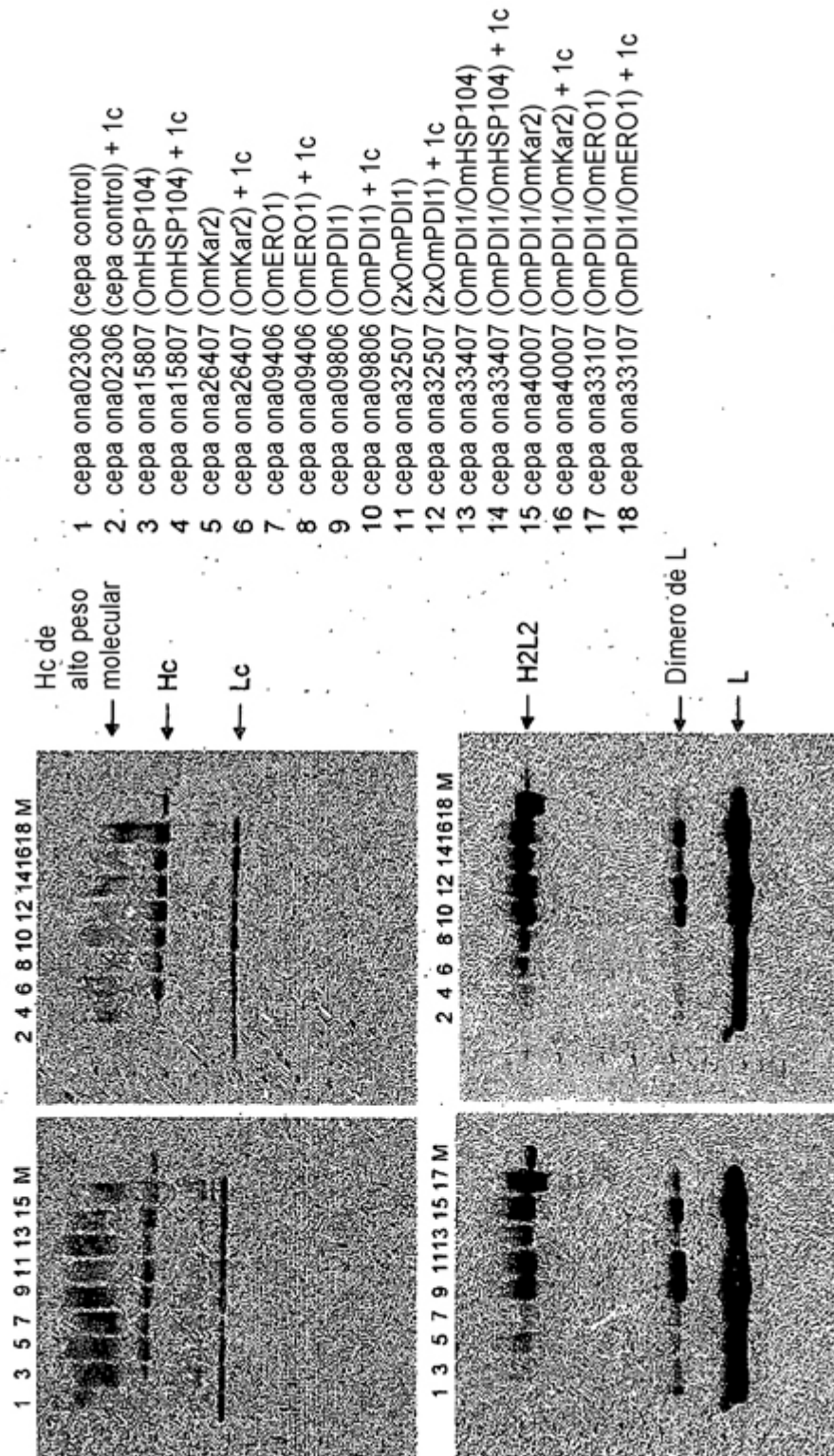


Fig. 11

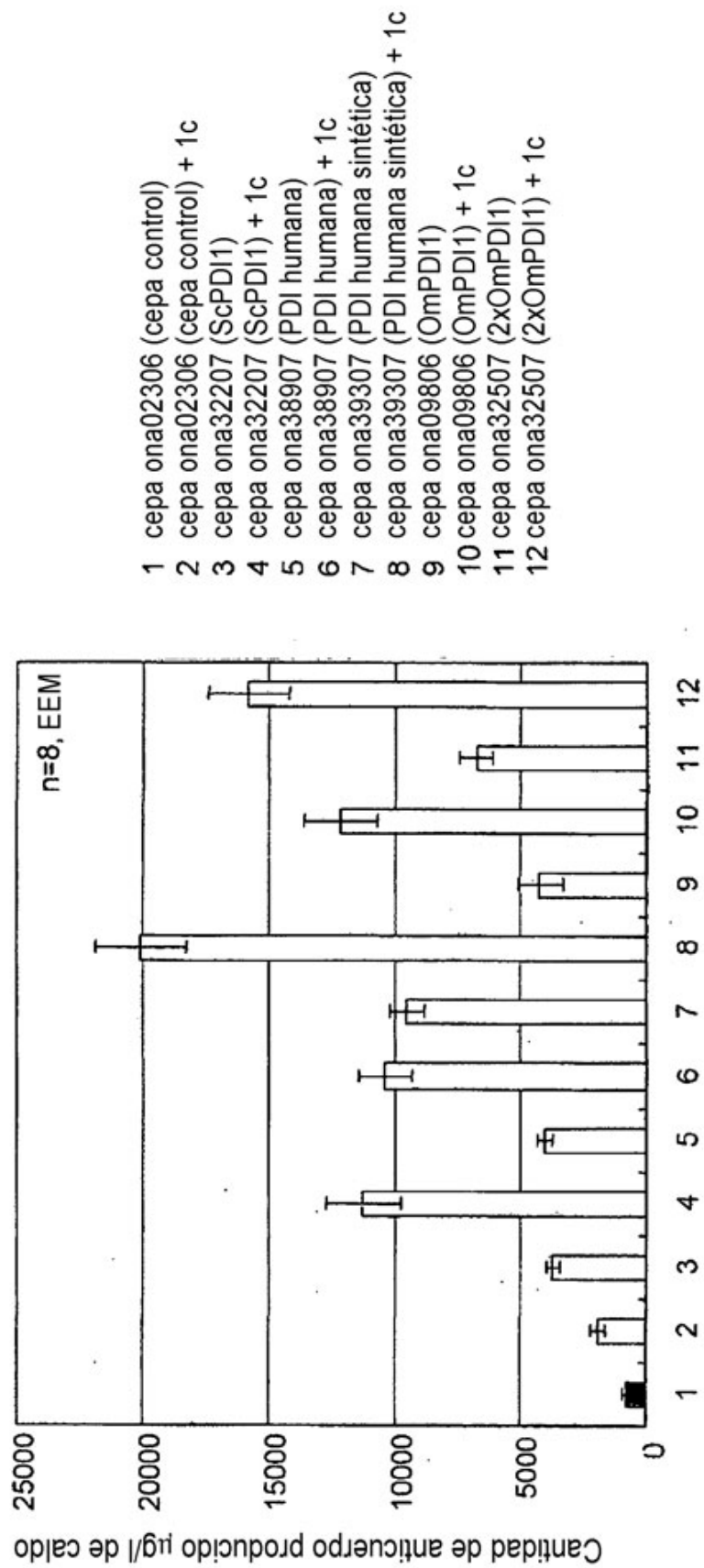


Fig. 12

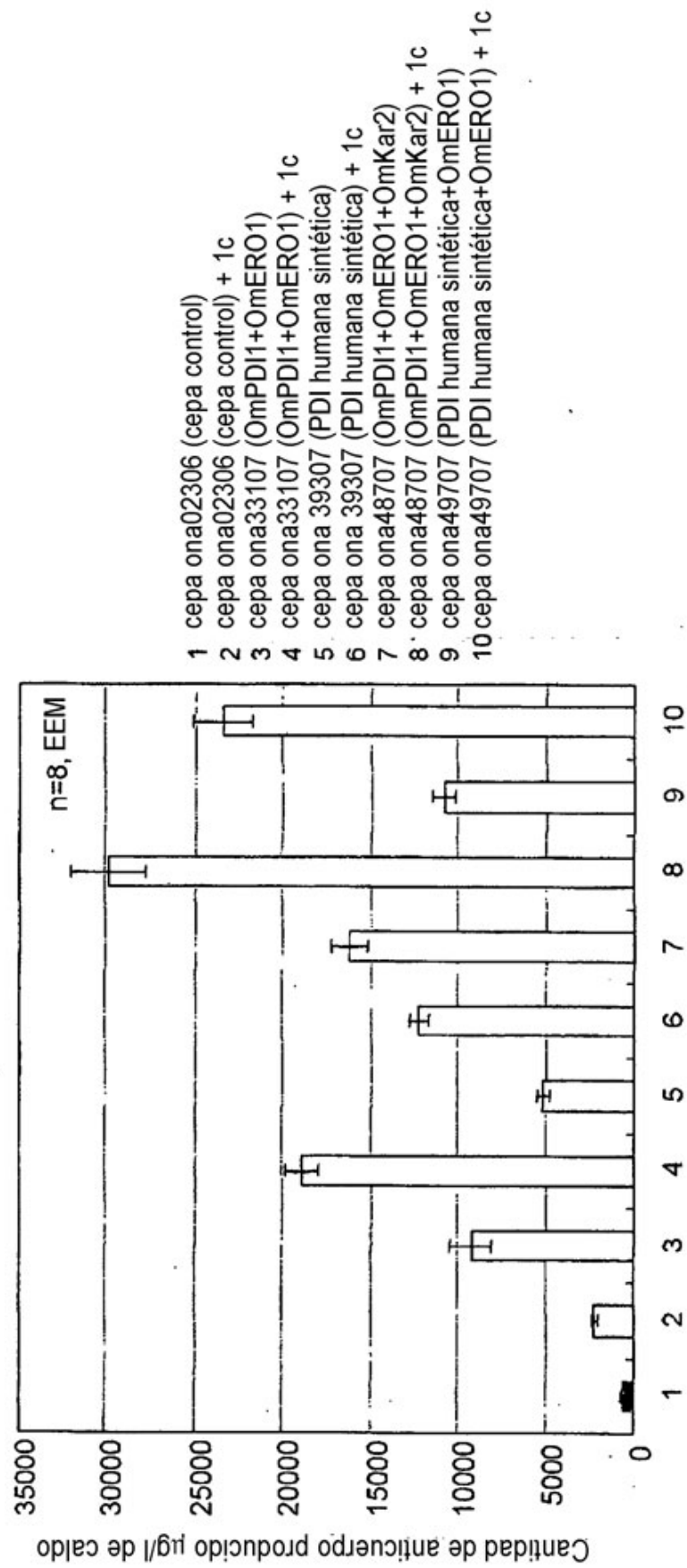


Fig. 13

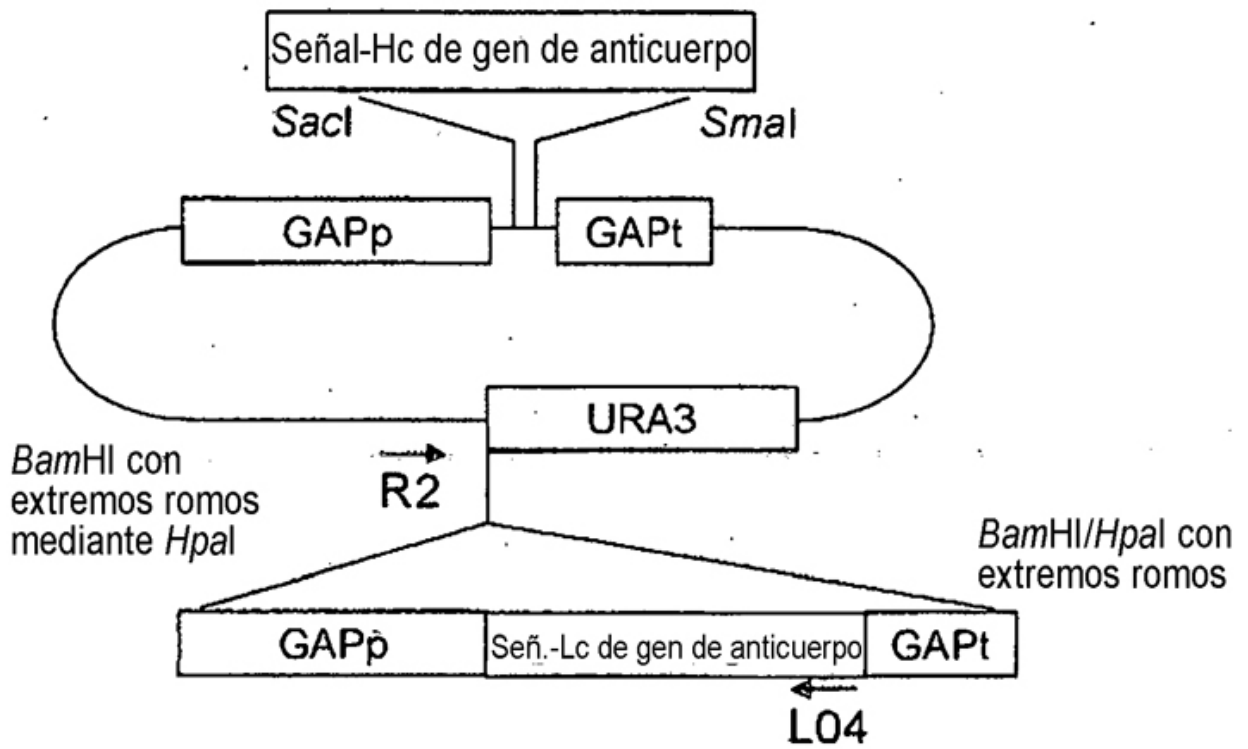


Fig. 14

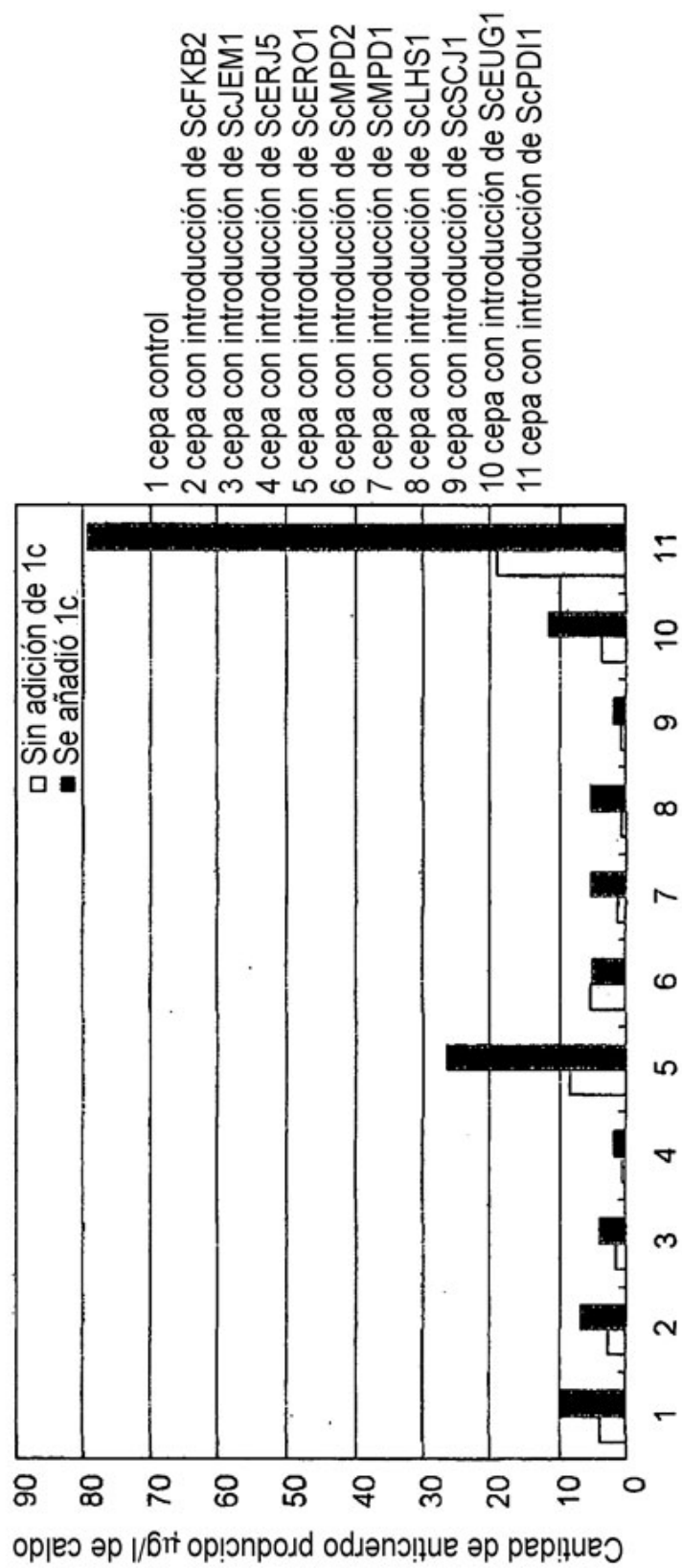


Fig. 15

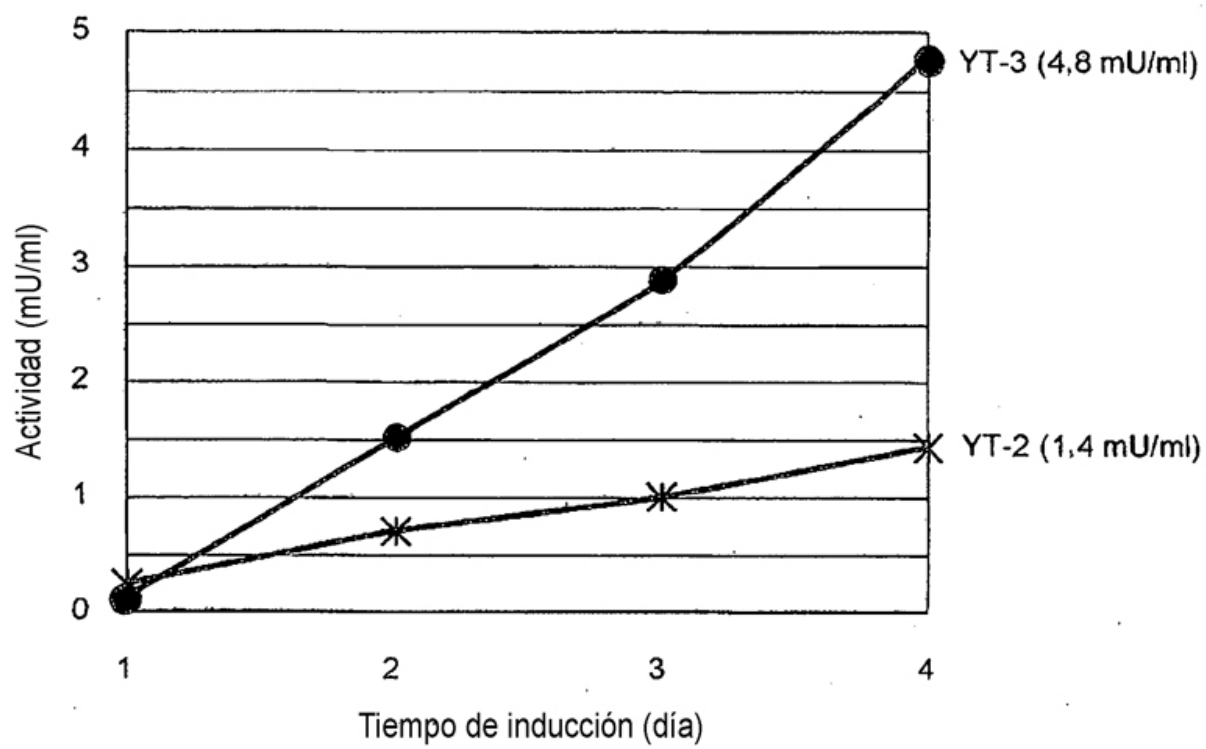


Fig. 16

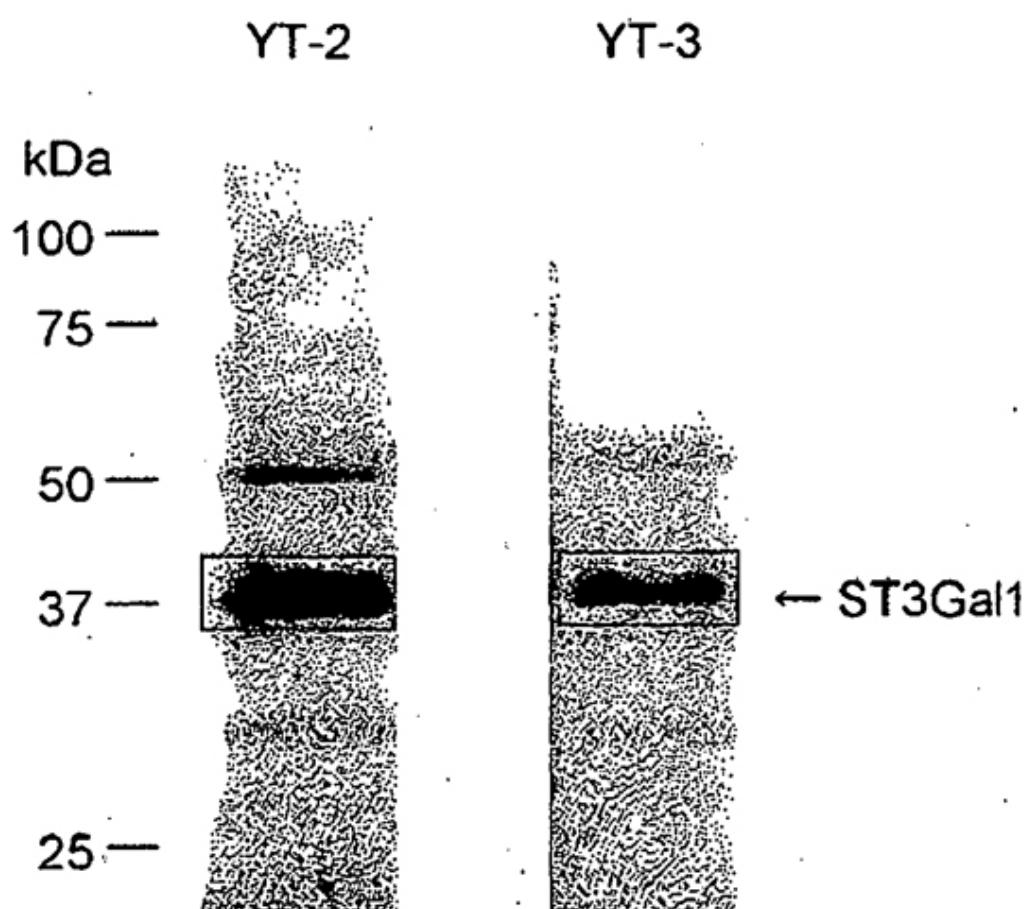


Fig. 17

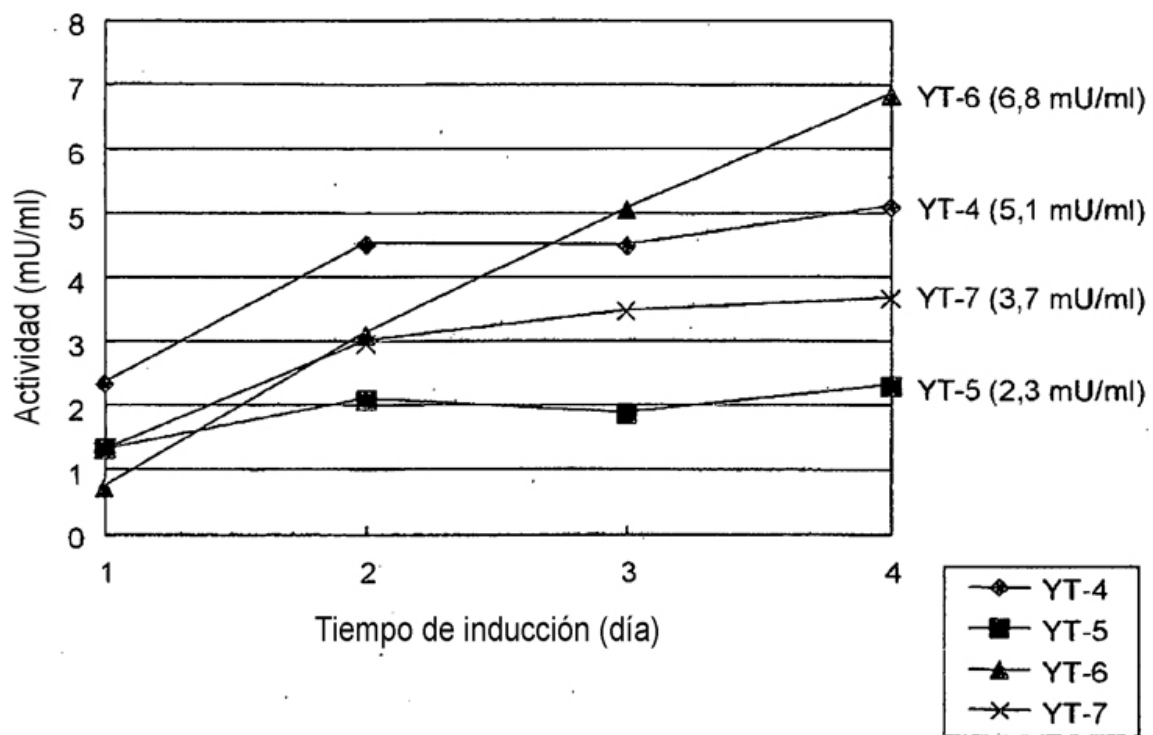


Fig. 18

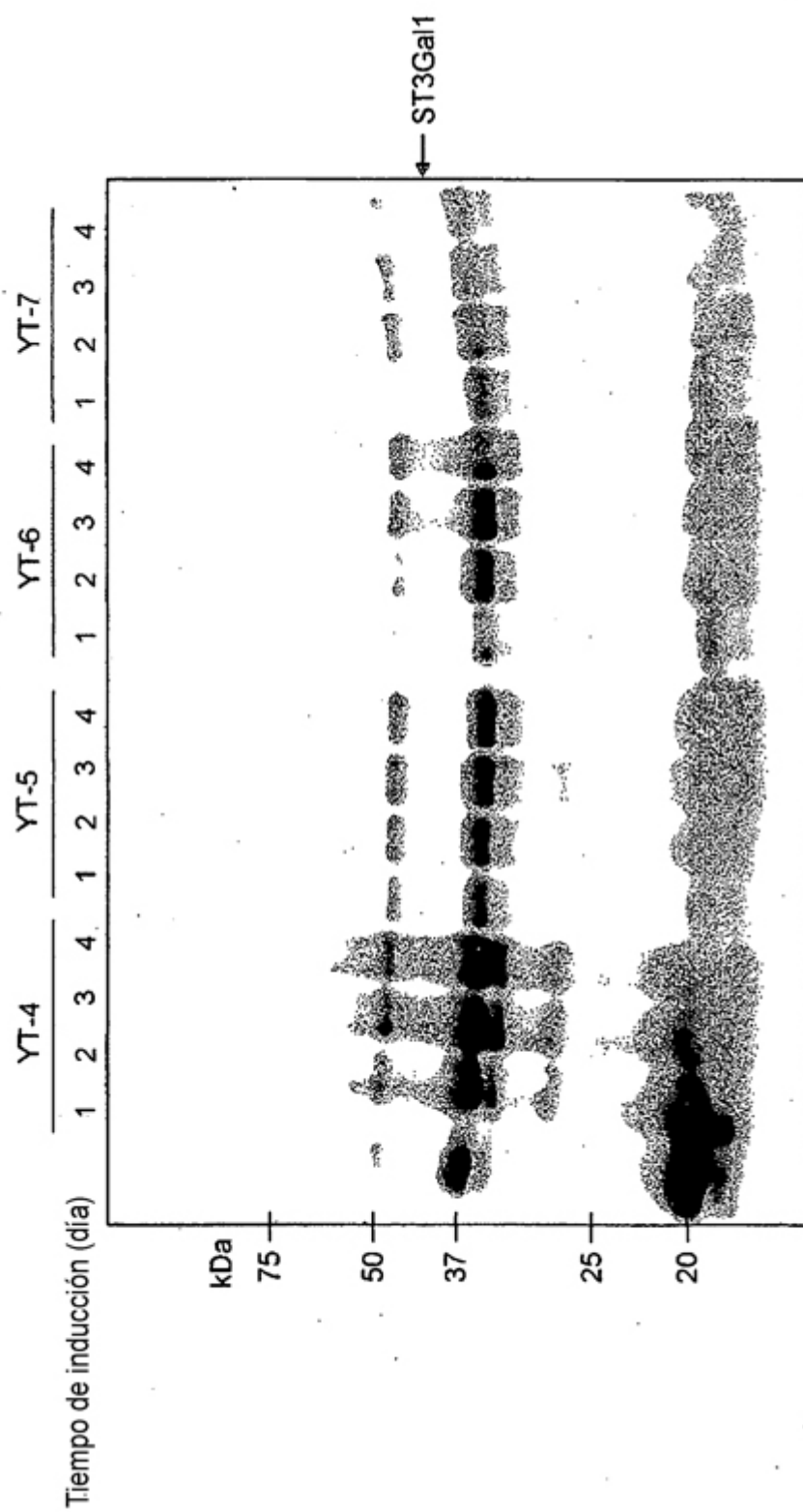


Fig. 19

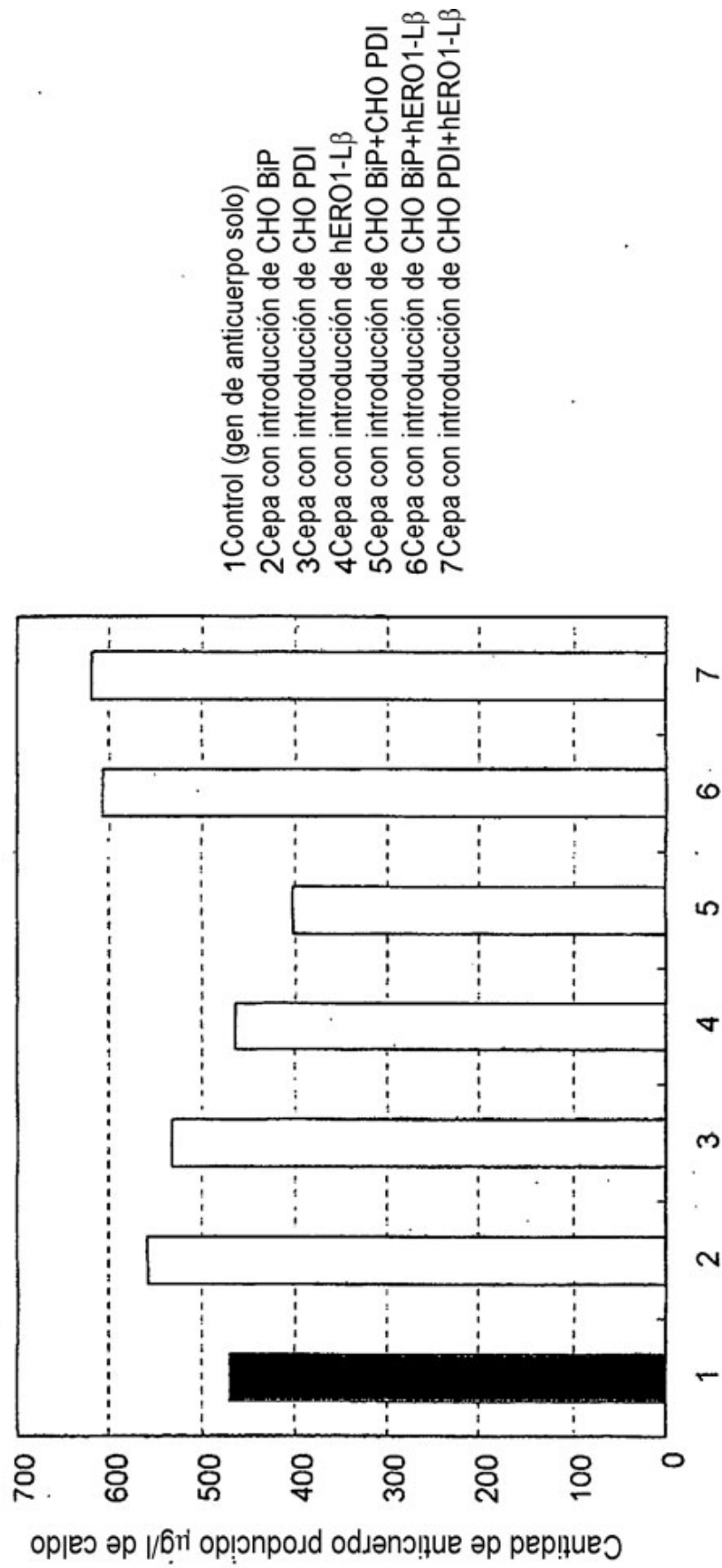


Fig. 20

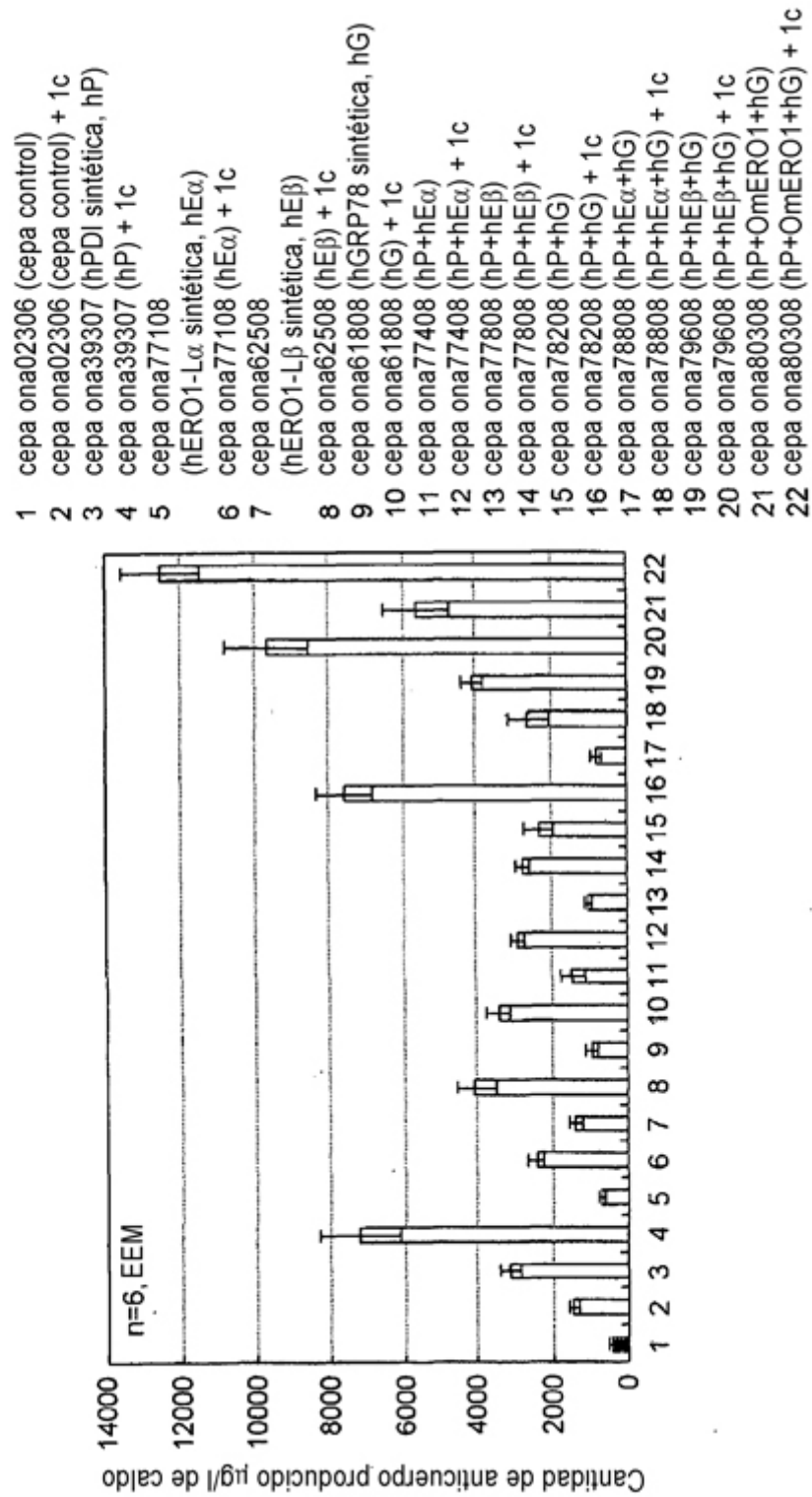


Fig. 21

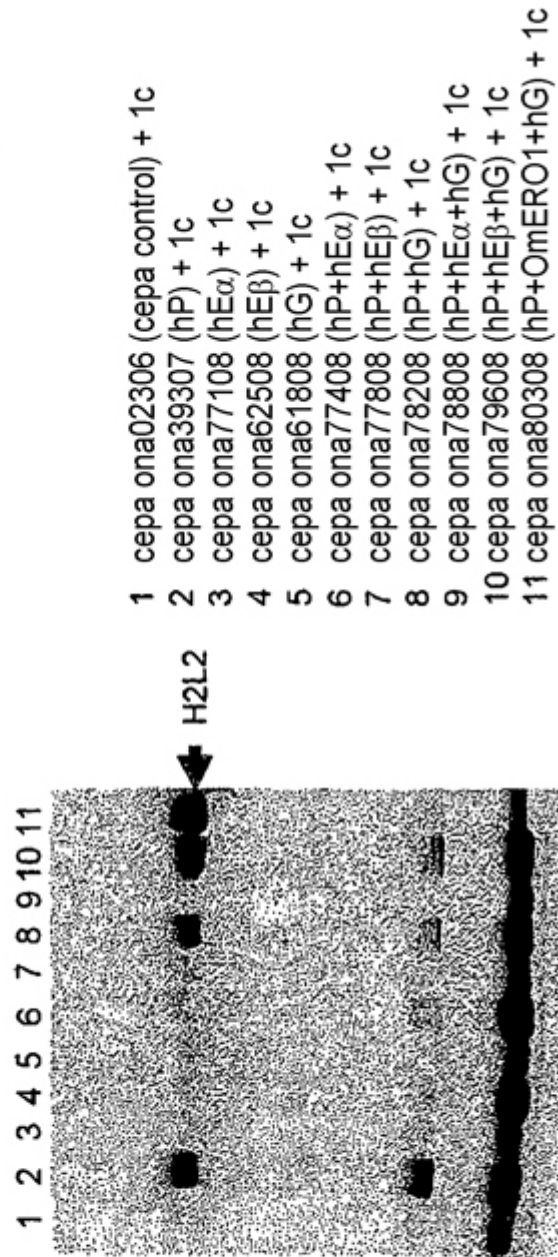


Fig. 22

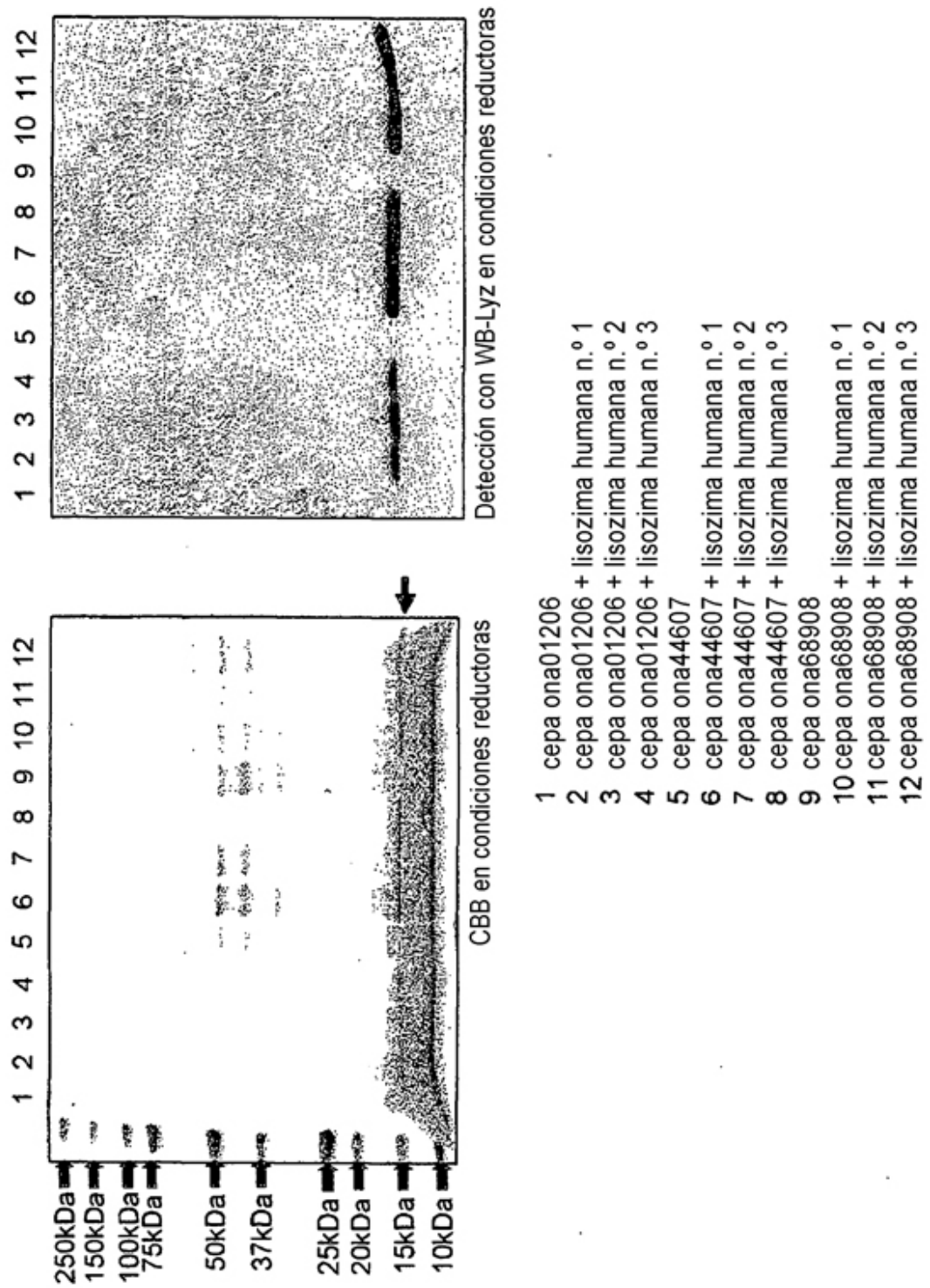


Fig. 23

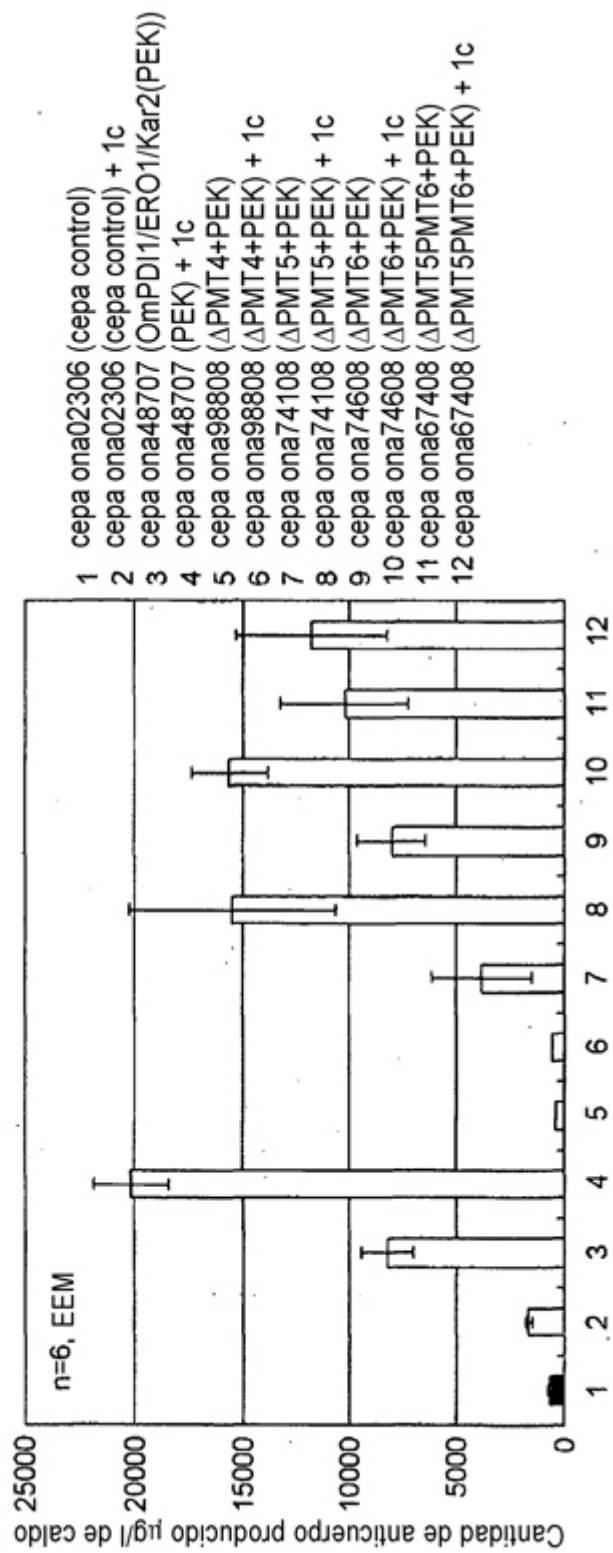
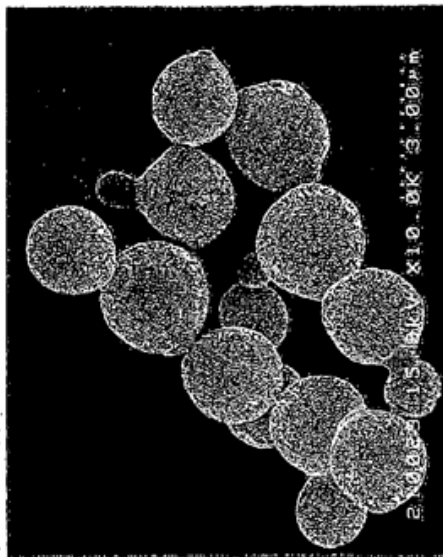
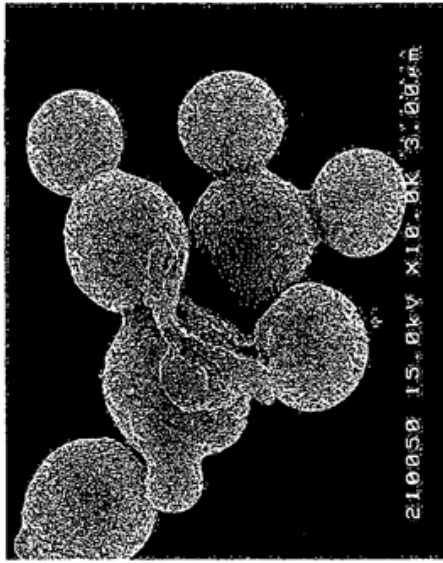


Fig. 24

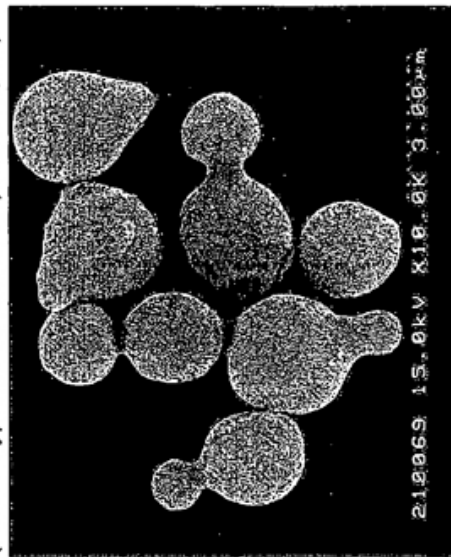
Cepa ona01206 de *O. minuta*
($\Delta och1 \Delta yps1 \Delta ade1$)



Cepa YK41 de *O. minuta*
($\Delta och1 \Delta yps1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta pm4::rURA3$)



Cepa YK6 de *O. minuta*
($\Delta och1 \Delta yps1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta pm5::rURA3$)



Cepa YK7 de *O. minuta*
($\Delta och1 \Delta yps1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta pm6::rURA3$)

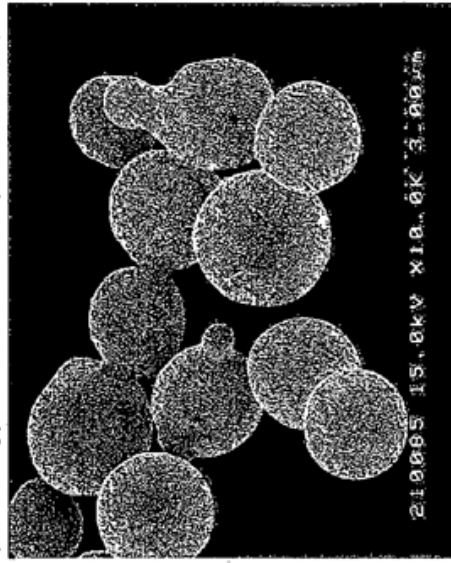


Fig. 25

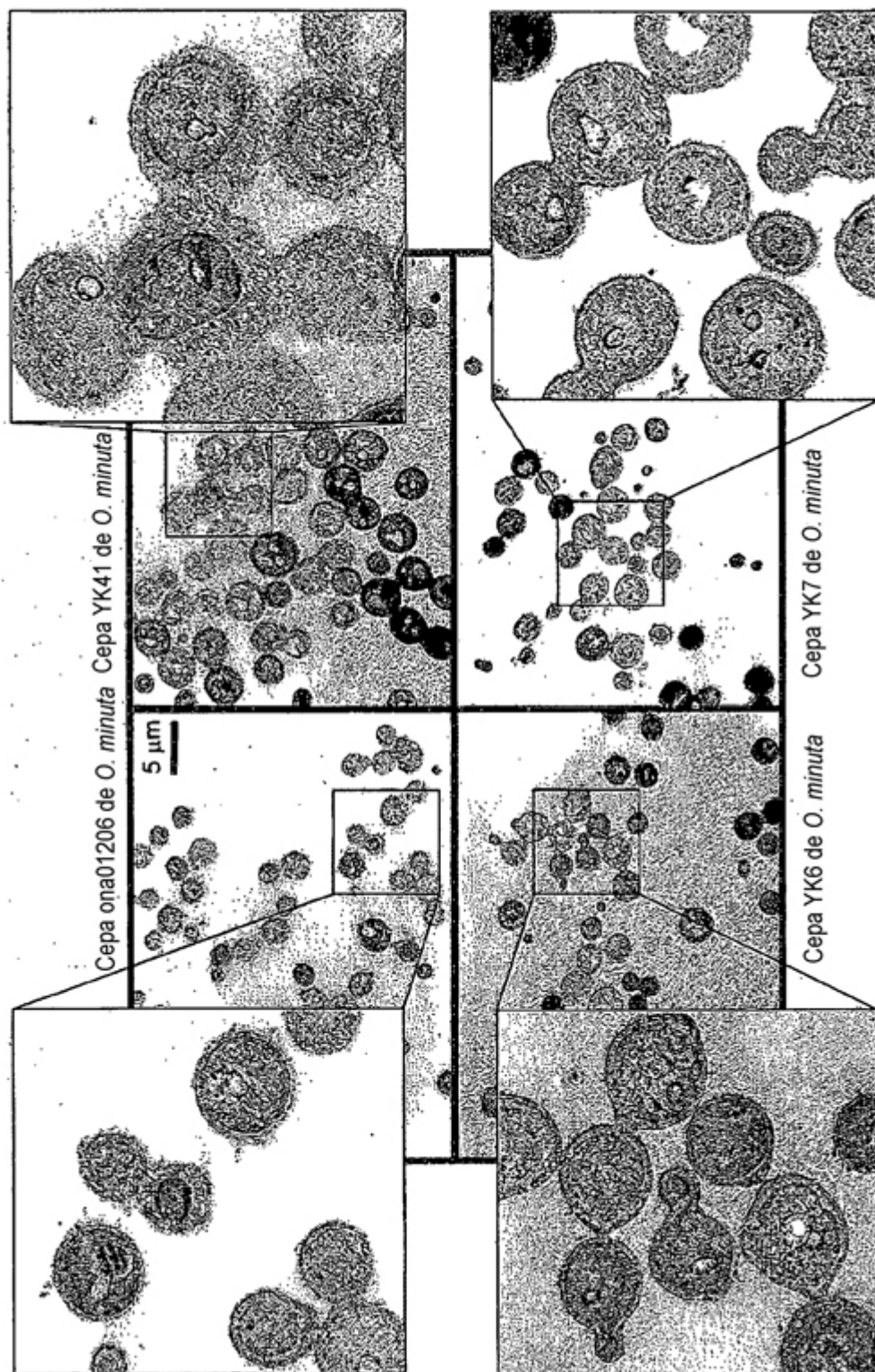


Fig. 26

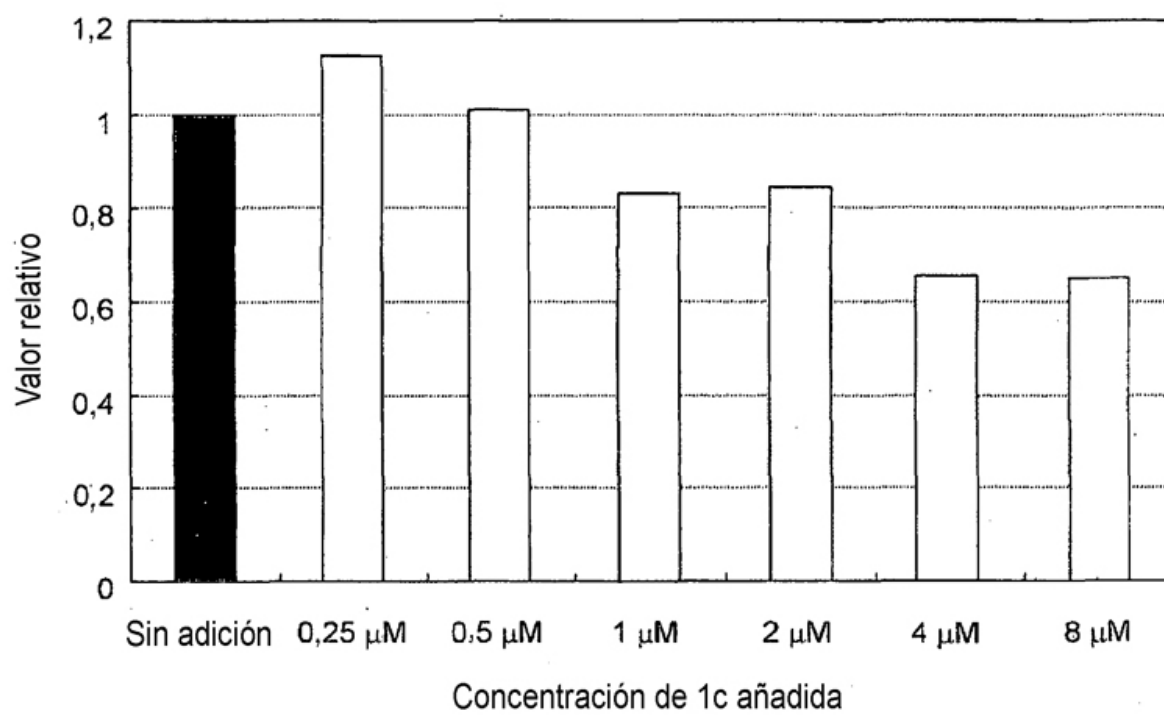


Fig. 27

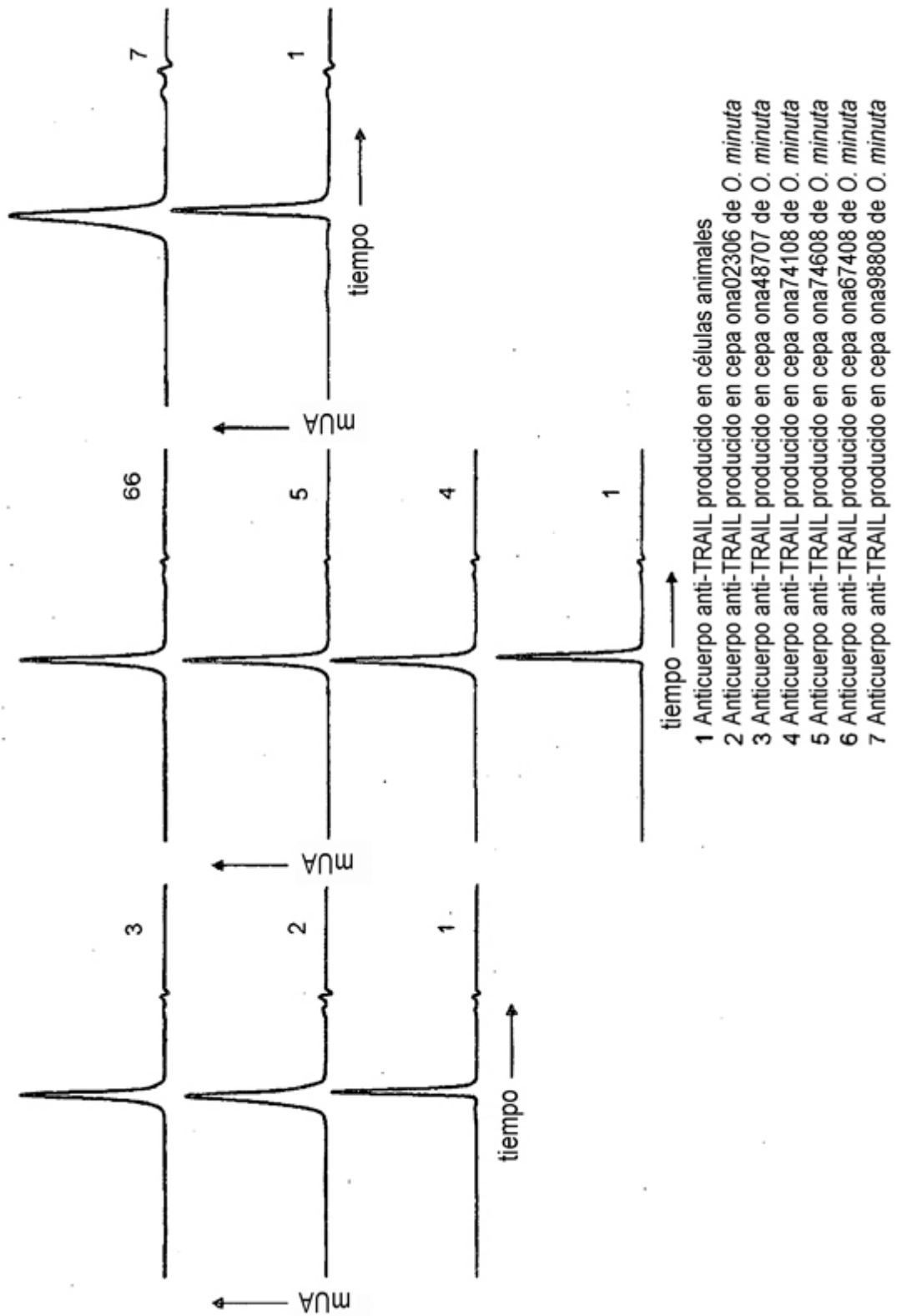


Fig. 28

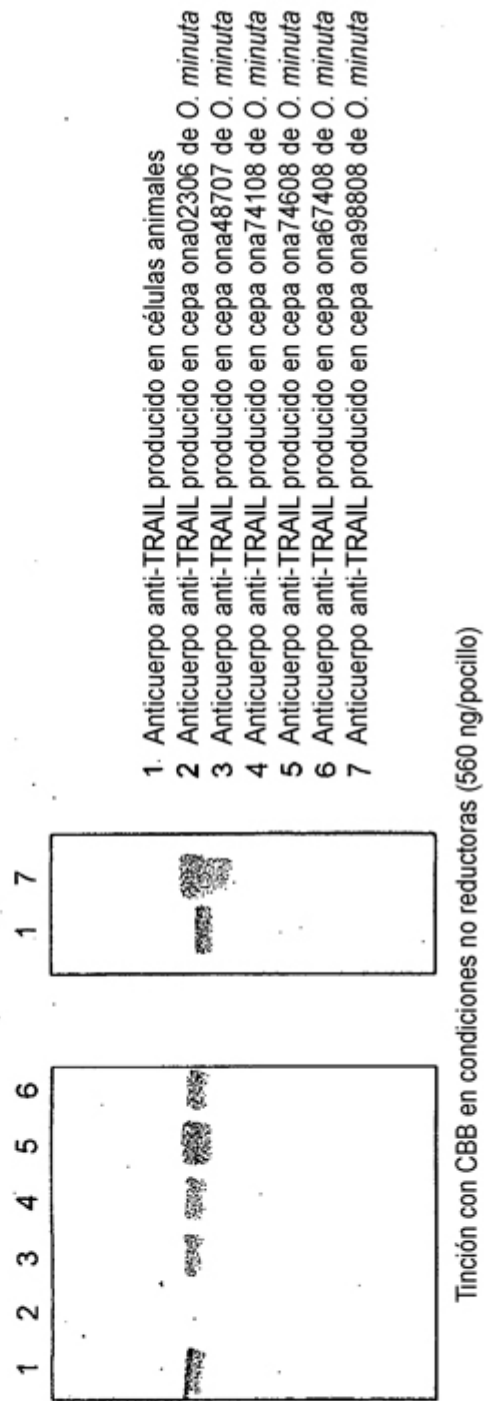


Fig. 29

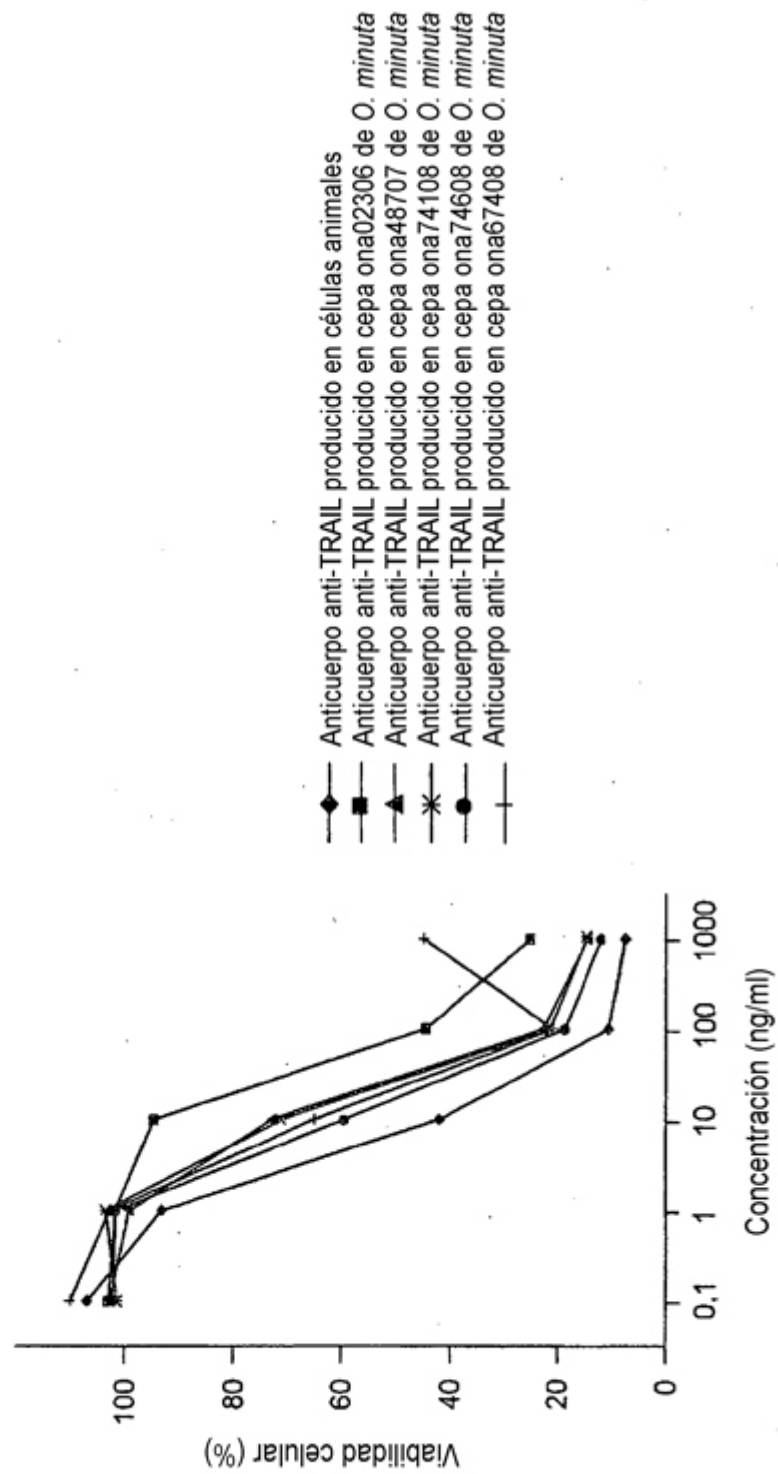


Fig. 30

