(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 550 761**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/47	(2006.01)
C12N 15/81	(2006.01)
C12N 9/48	(2006.01)
C12P 21/06	(2006.01)
C12N 9/60	(2006.01)
C12P 21/02	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2010** **E 10782288 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015** **EP 2504355**

(54) Título: **Método para producción de polipéptidos**

(30) Prioridad:

25.11.2009 EP 09177095
08.12.2009 US 267516 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2015

(73) Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd, DK

(72) Inventor/es:

ANDERSEN, ASSER SLOTH;
LAUTRUP-LARSEN, INGER y
NØRGAARD, PER

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 550 761 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 producción de polipéptidos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para producción de polipéptidos en una cepa de levadura modificada genéticamente.

Antecedentes de la invención

La expresión de proteínas heterólogas en levadura después de transformación de células de levadura con vectores de expresión adecuados que comprenden secuencias de DNA que codifican dichas proteínas ha tenido éxito para muchas especies de polipéptidos, tales como precursores de insulina, glucagón, péptidos afines a glucagón y sus análogos funcionales.

Sin embargo, a menudo se encuentra que el producto de expresión es una mixtura heterogénea de especies del precursor del polipéptido deseado que tienen longitudes de cadena de aminoácidos diferentes. Esto es debido a que la levadura produce varias enzimas proteolíticas que son responsables del procesamiento de moléculas precursoras mayores para liberación del polipéptido maduro. Varias proteasas que incluyen los productos de los genes PEP4 y KEX1 son responsables de tal degradación de las proteínas de levadura.

El uso de cepas interrumpidas de KEX1 para expresión de proteínas recombinantes ha sido descrito anteriormente. Así, EP341.215 y US 6.103.515 describen el uso de una cepa de levadura que carece de KEX1 para producción de péptidos que no contienen terminal C básico de aminoácido alguno, v.g. hANP, EGF, péptido III activador del tejido conectivo, hirudina, y variantes de hirudina.

Más de la mitad de los péptidos neurales y endocrinos conocidos están amidados en α y, en la mayoría de los casos, esta característica estructural es esencial para el reconocimiento de receptores, la transducción de señales, y por tanto, la función biológica. La amidación en α se deriva de una glicina C-terminal que se convierte enzimáticamente en una amida.

Un péptido amidado en α puede producirse directamente en la célula productora si la célula tiene la maquinaria necesaria para α-amidación in vivo. Sin embargo, algunos organismos con inclusión de las levaduras no son capaces de producir la α-amidación por que no expresan la enzima necesaria para α-amidación in vivo y por tanto los péptidos producidos por la célula tienen que ser amidados en α por un paso in vitro subsiguiente.

Si se utiliza levadura como la célula de producción recombinante, una solución es producir un polipéptido precursor con una glicina C-terminal que se convierte luego, en un proceso in vitro subsiguiente, en el péptido α-amidado utilizando una enzima de α-amidación (D. J. Merkler (1994). C-Terminal amidated peptides: Production by the in vitro enzymatic amidation of glycine extended peptides and the importance of the amide to bioactivity. Enzyme Microb. Technol.: 16(450-456).

No obstante, sorprendentemente, los autores de la presente invención han descubierto que la glicina C-terminal es escindida por numerosos péptidos expresados por Saccharomyces cerevisiae, haciendo imposible la conversión subsiguiente en un péptido α-amidado.

La presente invención ofrece una solución a este problema por utilización de una cepa de levadura genéticamente modificada que no es escindida del residuo glicina C-terminal.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producción de un polipéptido con una Gly C-terminal en levadura, en el que la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional.

El gen KEX1 puede hacerse no-funcional por el uso de técnicas bien conocidas. Así, en una realización, el gen KEX1 se deleciona simplemente, y en otra realización, el gen KEX1 se hace no-funcional por mutación con especificidad de sitio, v.g. por recombinación homóloga.

En una realización, la invención se refiere a un método para producción de un polipéptido en una cepa de levadura que tiene un gen KEX1 no-funcional, en el cual el polipéptido tiene como su residuo de aminoácido C-terminal una glicina, y en donde el método comprende los pasos siguientes

a) cultivo de la cepa de levadura que comprende una secuencia de DNA que codifica el polipéptido en condiciones para expresión del polipéptido en la cepa de levadura y

b) aislamiento del polipéptido expresado.

El polipéptido expresado puede aislarse del cultivo celular o de las células de levadura dependiendo de si el polipéptido expresado es secretado por la célula de levadura.

La glicina C-terminal es especialmente lábil cuando el penúltimo aminoácido del extremo C-terminal es uno de los residuos de aminoácido siguientes: Tyr, Phe, Met, Leu, Trp, Ala, Ile y Arg. Así, en una realización, el penúltimo aminoácido del extremo C-terminal es Tyr, Phe, Met, Leu, Trp, Ala, Ile o Arg.

Con "penúltimo aminoácido del extremo C-terminal" se entiende el residuo de aminoácido unido al extremo N-terminal del residuo de aminoácido C-terminal, que en este caso es un residuo glicina.

En particular, la glicina C-terminal es más lábil cuando el penúltimo aminoácido del extremo C-terminal es un residuo de aminoácido hidrófobo y en particular un residuo de aminoácido aromático. Así, en una realización adicional, el residuo de aminoácido próximo al Gly C-terminal es Tyr, Trp, Phe, Val, Leu, Ile o Met y en una realización adicional el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es Val, Leu, Ile o Met, y en una realización adicional el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es Tyr, Phe o Trp.

En otra realización adicional más, el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es Tyr.

La cepa de levadura puede tener otros genes de proteasa no-funcionales además del gen KEX1 no-funcional. Así, en una realización la cepa de levadura puede tener al menos un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido por PEP4, YPS1, MKC7, YPS3, YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 and KEX2.

El tamaño del polipéptido en cuestión puede tener también relevancia y, en una realización adicional, el polipéptido tiene desde aproximadamente 25 a aproximadamente 75 residuos de aminoácido en la cadena principal. En una realización adicional, el polipéptido tiene desde aproximadamente 25 a aproximadamente 60 residuos de aminoácido en la cadena principal, y en otra realización adicional, el polipéptido tiene desde aproximadamente 25 a aproximadamente 45 residuos de aminoácido en la cadena principal.

La cepa de levadura puede ser cualquier cepa de levadura que sea capaz de expresar y secretar DNA extraño. Sin embargo, en una realización la cepa de levadura es una cepa de Saccharomyces cerevisiae.

El método de la invención puede comprender una conversión enzimática adicional del polipéptido expresado y secretado. Así, en una realización de la invención, el polipéptido expresado y secretado con un Gly C-terminal se convierte en una amida por conversión enzimática con una enzima de α-amidación en un paso in vitro ulterior.

Descripción detallada de la invención

La expresión de péptidos con una glicina C-terminal en una cepa de S. cerevisiae ha resultado, como se ha mencionado, problemática dado que la glicina se escinde eficientemente en especial si el penúltimo aminoácido del extremo C-terminal es una tirosina como en PP (polipéptido pancreático), PYY y amilina, y conforme a la presente invención se ha encontrado que en cepas de levadura la proteasa responsable de la escisión de la glicina C-terminal es la proteasa Kex1p.

Con "Kex1" o "Kex1p" se entiende una serina-carboxipeptidasa que cataliza preferentemente la eliminación de los residuos C-terminales lisil y/o arginil (Shilton BH, Thomas DY, Cygler M 1997 Crystal structure of Kex1 deltap, a prohormone-processing carboxypeptidase from Saccharomyces cerevisiae. Biochemistry 36: 9002-9012). Kex1p o carboxipeptidasa yscα es una exopeptidasa asociada a la membrana y juega un papel importante en la maduración del factor asesino y factor de apareamiento α en levadura. La enzima es muy específica para los residuos de aminoácidos básicos C-terminales (Arg y Lys). La especificidad de la enzima KEX1 ha sido investigada ulteriormente por, entre otros, Heim et al, Eur. J. Biochem 226: 341-353 (1994)) con desulfato-hirudina y sus mutantes como sustratos modelo.

Esta invención describe el uso de una cepa de levadura con un gen KEX1 no-funcional que expresa péptidos pequeños que tienen un residuo de aminoácido glicina C-terminal. Se ha demostrado que esta glicina es muy propensa a la escisión por Kex1p, lo que hace difícil expresar estos péptidos eficientemente en levadura.

Con "péptidos pequeños" se entienden en este contexto péptidos que tienen hasta aproximadamente 75 residuos de aminoácido. En una realización, los péptidos tienen hasta aproximadamente 60 residuos de aminoácido y en una realización adicional los péptidos tienen hasta aproximadamente 50 residuos de aminoácido. En otra realización adicional, los péptidos tienen entre aproximadamente 25 y aproximadamente 45 residuos de aminoácido.

Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de péptidos que pueden producirse conforme a la presente invención son amilina, análogos de amilina, PP y análogos de PP, PYY y análogos de PYY, GLP-1 y análogos de GLP1, oxitocina, vasopresina, calcitonina, gastrina, NPY, FMRF-amida, secretina, GFHR, CRF, neuroquinina A, péptido liberador de gastrina y α-MSH.

En una realización, el péptido que puede producirse se selecciona del grupo de péptidos que tienen un residuo de aminoácido aromático enlazado al residuo glicina. Así, en una realización, el péptido se selecciona del grupo constituido por gastrina, NPY, FMRF-amida y amilina y análogos de los mismos.

La expresión "polipéptido" debe entenderse que abarca "péptidos" y también "proteínas". Por "análogo", como se utiliza en esta memoria, se entiende un polipéptido que tiene una estructura molecular que puede derivarse formalmente de la estructura de un polipéptido existente naturalmente por deleción y/o cambio de al menos un residuo de aminoácido existente en el polipéptido existente naturalmente. Los residuos de aminoácido añadidos y/o cambiados pueden ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos existentes naturalmente o residuos de aminoácido puramente sintéticos.

La actividad de una proteasa puede eliminarse por interrupción del gen hospedador que codifica la proteasa, generando con ello una cepa irreversible que carece de la totalidad o parte del gen para la proteasa que incluye regiones reguladoras y/o codificantes, o, alternativamente, la actividad puede reducirse o eliminarse por procedimientos clásicos de mutagénesis o por la introducción de mutaciones puntuales específicas. La interrupción del gen codificante de la proteasa Kex1p utilizando técnicas clásicas está basada en recombinación homóloga, en la que dos cadenas de DNA similares o idénticas intercambian secuencias nucleotídicas. Esto permite la dirección del evento de recombinación específicamente al locus KEX1, por lo que el marco de lectura abierto de KEX1 se intercambia con un gen marcador, utilizado para selección de la deleción correcta (Rothstein R. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. 1991. Methods Enzymol. 194:281-301). En un modo de esto, la cepa de levadura se transforma con un fragmento lineal de DNA (procedente de un plásmido o generado por PCR) constituido por el gen marcador flanqueado por secuencias de DNA homólogas a las secuencias de DNA que flanquean el gen KEX1. La integración con éxito reemplazará el gen KEX1 con el gen marcador que puede seleccionarse para ello. Marcadores adecuados son marcadores auxótrofos tales como por ejemplo URA3, HIS3, LEU2, TRP1 o marcadores antibióticos dominantes que aportan resistencia frente a G418, higromicina, etc.

Otros métodos que pueden ser adecuados para regulación decreciente de la actividad de las proteasas incluyen la introducción de constructos antisentido y/o de ribozima en la levadura, v.g. Atkins et al. (Antisense and Development 5: 295-305, 1995) and Nasr et al. (Mol. Gen Genet 249: 51-57, 1995). Métodos útiles de interrupción del gen KEX1 en la cepa de levadura han sido descritos por Rothstein (Method in Enzymol, 194: 281-301, 1991).

Dependiendo del producto final deseado, la célula hospedadora de levadura puede someterse ulteriormente a manipulación genética. Como ejemplo, uno o más genes de proteasa adicionales pueden hacerse no-funcionales. Ejemplos de tales genes de proteasas son PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2. Esto puede ser necesario para evitar la degradación adicional del péptido expresado.

En una realización, la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y uno solo de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

En otra realización, la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y dos de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

En otra realización, la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y tres de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

En otra realización, la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y cuatro de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

En una realización, los genes KEX1 y PEP4 se hacen no-funcionales. Dicha cepa de levadura es particularmente adecuada para expresión de amilina, PP y PYY y análogos de los mismos con una glicina C-terminal.

En otra realización, la cepa de levadura tiene un gen KEX1 interrumpido y un gen de levadura aspartil-proteasa 3 (Yap3p) interrumpido (YPS1). La interrupción del gen de levadura aspartil-proteasa 3 (Yap3p) se describe en WO 95/23857 para producción de alúmina humana recombinante (rHA) y en US 6.110.703, que describe la producción de polipéptidos de cadena corta.

Así, una realización adicional de la presente invención incluye una cepa de levadura que tiene una silenciación a la vez del gen KEX1 y el gen YAP3/YPS1.

Con la expresión "silenciación" se entiende que el gen ha sido delecionado totalmente o se ha hecho no-funcional como se describe anteriormente.

El método conforme a la presente invención da como resultado péptidos no degradados con un terminal C intacto. Esto tiene un gran valor comercial, dado que la producción de un producto homogéneo reducirá significativamente los costes de purificación.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un proceso para producción de péptidos C-terminales amidados que comprende los pasos siguientes: a) cultivo de una cepa de levadura que tiene un gen KEX1 no-funcional y que comprende una secuencia de DNA que codifica un polipéptido con un Gly C-terminal en condiciones para expresión del polipéptido en la cepa de levadura, b) α-amidación in vitro del polipéptido expresado del paso a) y b) aislamiento y purificación del péptido amidado en el terminal C.

En otro aspecto, la invención proporciona un cultivo de células de levadura que tienen un gen KEX1 no-funcional que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido con un residuo Gly C-terminal, estando dicha secuencia de polinucleótido o secuencia de DNA enlazada operativamente a una secuencia de polinucleótido o secuencia de DNA que codifica un promotor de levadura y una secuencia conductora (secuencia pro o secuencia pre-pro) y/u otras secuencias polinucleotídicas o secuencias de DNA que son necesarias para que dicho polipéptido pueda expresarse en la levadura y sea secretado por ella.

El DNA codificante del polipéptido en cuestión puede estar unido a una gran universidad de otras secuencias de DNA para introducción en un hospedador apropiado. El DNA asociado dependerá de la naturaleza del hospedador, la manera de la introducción del DNA en el hospedador, y de si se desea mantenimiento episómico o integración en el o los cromosomas del hospedador.

Generalmente, el DNA se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, en orientación apropiada y marco de lectura correcto para la expresión. El vector se introduce luego en el hospedador por técnicas estándar y, generalmente, será necesario seleccionar las células hospedadoras transformadas.

En el vector, la secuencia polinucleotídica o la secuencia de DNA está enlazada operativamente a una secuencia de polinucleótidos o secuencia de DNA que codifica un promotor de levadura y una escuela conductora (secuencia pro o secuencia pre-pro) y/u otras secuencias polinucleotídicas o secuencias de DNA que son necesarias para que dicho polipéptido sea expresado en la levadura y secretado por la misma.

Si se desea integración, el DNA se inserta en un vector plasmídico de integración de levadura, tal como pJJ215, pJJ250, pJJ236, pJJ248, pJJ242 (Jones & Prakash, Yeast 6: 363,1990) o pDP6 (Fleig et al. Gene 46:237, 1986), en orientación apropiada y marco de lectura correcto para la expresión, que está flanqueado con secuencias homólogas de cualesquiera genes de levadura no esenciales, secuencia de transposón o genes ribosómicos. Preferiblemente, las secuencias flanqueantes son genes de proteasa de levadura o genes utilizados como marcador selectivo. El DNA se integra luego en el o los cromosomas del hospedador por recombinación homóloga producida en las secuencias flanqueantes, utilizando técnicas estándar expuestas en Rothstein (Method in Enzymol, 194: 281-301, 1991) y Cregg et al. (Bio/Technol. 11:905-910, 1993).

Las células hospedadoras que han sido transformadas por el DNA recombinante de la invención se cultivan luego durante un tiempo suficiente y en condiciones apropiadas conocidas por los expertos en la técnica teniendo presente la doctrina expuesta en esta memoria para permitir la expresión y secreción de los polipéptidos a producir conforme al método de la invención.

Vectores plasmídicos de levadura útiles incluyen los plásmidos POT (Kjeldsen et al. Gene 170: 107-112, 1996) y YEp13, YEp24 (Rose and Broach, Methods in Enzymol. 185: 234-279, 1990), y pG (Schena et al. Methods in Enzymol. 194: 289-398, 1991).

Métodos para la transformación de S. cerevisiae incluyen la transformación de esferoplastos, transformación con acetato de litio, y electroporación, véase Methods in Enzymol. Vol. 194 (1991). Preferiblemente, la transformación es como se describe en los ejemplos de esta memoria.

Promotores adecuados para S. cerevisiae incluyen el promotor MFα1, promotores inducibles de galactosa tales como los promotores GAL1, GAL7 y GAL10, promotores de enzimas glicolíticas que incluyen los promotores TPI y PGK, el promotor TRP1, el promotor CYCI, el promotor CUP1, el promotor PHO5, el promotor ADH1, y el promotor HSP. Un promotor adecuado en el género Pichia es el promotor AOXI (utilización de metanol).

La señal terminal de la transcripción es preferiblemente la secuencia flanqueante 3' de un gen eucariota que contiene la señal apropiada para terminación de la transcripción y poliadenilación. Secuencias flanqueantes 3' adecuadas pueden ser, v.g., las del gen enlazado naturalmente a la secuencia de control de la expresión utilizada, es decir, correspondiente al promotor.

Los constructos de DNA que se utilizan para proporcionar expresión secretora del polipéptido deseado comprenden una secuencia de DNA que incluye una secuencia conductora enlazada al polipéptido por una señal de procesamiento de levadura. La secuencia conductora contiene un péptido señal ("secuencia pre") para translocación

de las proteínas a través del retículo endoplásmico y contiene opcionalmente una secuencia adicional ("secuencia pro"), que puede escindirse o no dentro de las células de levadura antes de la liberación del polipéptido al medio circundante. Conductores útiles son el péptido señal de α-amilasa de ratón, los péptidos señal de S. cerevisiae MFα1, YAP3, BAR1, HSP150 y S. kluyveri MFα y secuencias pre-pro de S. cerevisiae MFα1, YAP3, PRC, HSP150 y S. kluyveri MFα y secuencias conductoras sintéticas descritas en WO 92/11378, WO 90/10075 and WO 95/34666. Adicionalmente, los polipéptidos a producir conforme al método de la invención pueden estar provistos de una extensión N-terminal como se describe en WO 95/35384.

La secuencia de DNA que codifica el péptido deseado puede ser de origen genómico o cDNA, por ejemplo obtenerse por preparación de una biblioteca genómica o de cDNA y cribado para secuencias de DNA que codifican la totalidad o parte del polipéptido por hibridación utilizando sondas oligonucleotídicas sintéticas conforme a técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de DNA que codifica el polipéptido puede prepararse también sintéticamente por métodos estándar establecidos, v.g. el método del fosfoamidito descrito por Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801 – 805. La secuencia de DNA se puede preparar también por reacción en cadena de polimerasa utilizando cebadores específicos, como se describe por ejemplo en US 4.683.202 o Saiki et al., Science 239 (1988), 487-491.

La célula hospedadora de levadura en la que se introduce la secuencia de DNA o el vector recombinante puede ser cualquier célula de levadura que sea capaz de expresar el polipéptido e incluye cepas de Sacharomyces spp. o Schizosaccharomyces spp., en particular cepas de Sacharomyces cerevisiae o Sacharomyces kluyveri. Ejemplos adicionales de cepas de levadura adecuadas son cepas de Kluyveromyces, tales como K. lactis, Hansenula, v.g. H. polymorpha, o Pichia, v.g. P. pastoris (véase Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, pp. 3459-3465; US 4.882.279).

Métodos para transformación de células de levadura con DNA heterólogo y producción de polipéptidos heterólogos a partir del mismo se describen, v.g., en US 4.599.311, US 4,931,373, US 4,870,008, 5,037,743, and US 4,845,075. Las células transformadas se seleccionaron por un fenotipo determinado por un marcador seleccionable, comúnmente resistencia a un fármaco o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular, v.g. leucina. Un vector preferido para uso en levadura es el vector POT1 descrito en US 4.931.373. "POT " es el gen de triosa-fosfatoisomerasa de Schizosaccharomyces pombe, y "TPI1" es el gen de triosa-fosfatoisomerasa de S. cerevisiae.

La expresión "un aminoácido codificable" o "un residuo de aminoácido codificable" se utiliza para indicar un aminoácido o residuo de aminoácido que puede estar codificado por un triplete ("codón") de nucleótidos.

En el presente contexto, se han utilizado las indicaciones de tres letras o una sola letra de los aminoácidos en su significado convencional como se indica en la Tabla siguiente. A no ser que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados en esta memoria son L-aminoácidos. Adicionalmente, los extremos izquierdo y derecho de una secuencia de aminoácidos o de un péptido son, respectivamente, los términos N y C a no ser que se especifique otra cosa.

La presente invención se describe con mayor detalle en los ejemplos que siguen, que no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la invención tal como se reivindica. Las Figuras adjuntas deben entenderse como partes integrales de la memoria descriptiva y la descripción de la invención. Todas las referencias citadas se incorporan específicamente en esta memoria por referencia para la totalidad de la presente descripción.

Las realizaciones siguientes están abarcadas por la presente invención:
Realización 1: Método para producción de un polipéptido en una cepa de levadura que tiene un gen KEX1 no-funcional, en el cual el polipéptido tiene como su residuo de aminoácido C-terminal una glicina, y en el cual el método comprende los pasos siguientes

a) cultivo de la cepa de levadura que comprende una secuencia de DNA que codifica el polipéptido en condiciones adecuadas para expresión del polipéptido en la cepa de levadura y
b) aislamiento del polipéptido expresado.

Realización 2: Método conforme a la realización 1, en el cual el polipéptido se aísla del medio de cultivo.

Realización 3: Método conforme a la realización 1-2, en el cual el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es del grupo constituido por Tyr, Phe, Met, Leu, Trp, Ala, Ile y Arg.

Realización 4: Método conforme a la realización 3, en el cual el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es Tyr, Trp, Phe, Val, Leu, Ile y Met.

Realización 5: Método conforme a la realización 3, en el cual el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es Val, Leu, Ile y Met.

Realización 6: Método conforme a la realización 3, en el cual el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es Tyr, Trp y Phe.

Realización 7: Método conforme a la realización 6, en el cual el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es Tyr.

Realización 8: Método conforme a cualquiera de las realizaciones 1-7, en el cual la cepa de levadura tiene al menos un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido por PEP4, YPS1, MKC7, YPS3, YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

Realización 9: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido por PEP4, YPS1 y MKC7.

Realización 10: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4, YPS1 e YPS3.

Realización 11: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4, YPS3 y MKC7.

Realización 12: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 e YPS1.

Realización 13: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4, e YPS3.

Realización 14: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 y MKC7.

Realización 15: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3, YPS1 y MKC7.

Realización 16: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 e YPS1.

Realización 17: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 y MKC7.

Realización 18: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 y YAPS5.

Realización 19: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 e YPS6.

Realización 20: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 e YPS7.

Realización 21: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 y PRB1.

Realización 22: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 y STE13.

Realización 23: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 y KEX2.

Realización 24: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 y YAPS5.

Realización 25: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 e YPS6.

Realización 26: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 e YPS7.

Realización 27: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 y PRB1.

Realización 28: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 y STE13.

Realización 29: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 y KEX2.

Realización 30: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS1 y PRB1.

Realización 31: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS1 y STE13.

Realización 32: Método conforme a la realización 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS1 y KEX2.

Realización 33: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen PEP4 no-funcional.

Realización 34: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen YPS1 no-funcional.

Realización 35: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen MKC7 no-funcional.

Realización 36: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen YPS3 no-funcional.

Realización 37: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen YPS5 no-funcional.

Realización 38: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen YPS6 no-funcional.

Realización 39: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen YPS7 no-funcional.

Realización 40: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen PRB1 no-funcional.

Realización 41: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen STE13 no-funcional.

Realización 42: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen KEX2 no-funcional.

Realización 43: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y uno solo de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

Realización 44: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y dos de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

Realización 45: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y tres de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

Realización 46: Método conforme a la realización 1, en el cual la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y cuatro de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

Realización 47: Método conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, en el cual el gen KEX1 ha sido delecionado;

Realización 48: Método conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, en el cual el gen KEX1 se ha hecho no-funcional por mutación, v.g. por recombinación homóloga.

Realización 49: Método conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, en el cual el polipéptido tiene de 25 a aproximadamente 45 residuos de aminoácidos en la cadena principal.

Realización 50: Método conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, en el cual el polipéptido se selecciona del grupo constituido por amilina, análogos de amilina, PP y análogos de PP, PYY y análogos de PYY, GLP-1 y análogos de GLP1, oxitocina, vasopresina, calcitonina, gastrina, NPY, FMRF-amida, secretina, GFHR, CRF, neuroquinina A, péptido liberador de gastrina, y α-MSH.

Realización 51: Método conforme a la realización 50, en el cual el polipéptido se selecciona del grupo constituido por PP, PYY y amilina.

Realización 52: Método conforme a la realización 50, en el cual el polipéptido es amilina.

Realización 53: Método conforme a la realización 50, en el cual el polipéptido es PP.

Realización 54: Método conforme a la realización 50, en el cual el polipéptido es PYY.

La invención abarca cualquier combinación de realizaciones y aspectos como los descritos en esta memoria.

Ejemplos

Procedimientos Generales

Todos los plásmidos de expresión son del tipo C-POT, similares a los descritos en EP 171.142. Éstos son vectores de expresión basados en 2μ, caracterizados por contener el gen de triosa-fosfatoisomerasa (POT) de Schizosaccharomyces pombe para el propósito de selección y estabilización del plásmido en S. cerevisiae. Los plásmidos contienen también el promotor y el terminador de triosa-fosfatoisomerasa de S. cerevisiae. Estas secuencias son similares a las secuencias correspondientes en el plásmido pKFN1003 (descrito en WO 9010075). Con objeto de facilitar la clonación de diferentes proteínas de fusión, la secuencia de DNA que codifica el conductor pre-pro de MFα1 se ha modificado para incorporar un sitio NcoI y se designa como conductor pre-pro MFα1*. Así, el fragmento NcoI-XbaI se reemplaza simplemente por un fragmento NcoI-XbaI que codifica el constructo de insulina de interés. Tales fragmentos NcoI-XbaI pueden sintetizarse utilizando oligonucleótidos sintéticos y PCR conforme a técnicas estándar. Además del conductor α pueden utilizarse otros conductores.

Se prepararon transformantes de levadura y derivados de los mismos por transformación de las cepas hospedadoras de la cepa de S. cerevisiae. Las células hospedadoras se cultivaron en YPGaL (1% extracto de levadura Bacto, 2% peptona Bacto, 2% galactosa, 1% lactato) hasta una O.D. a 600 nm de 0,6. Se recogieron por centrifugación 100 ml del cultivo, se lavaron con 10 ml de agua, se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en 10 ml de una solución que contenía sorbitol 1,2 M, Na_2EDTA 25 mM, pH = 8,0 and 6,7 mg/ml de ditiotreitol. La suspensión se incubó a 30°C durante 15 minutos, se centrifugó y las células se resuspendieron en 10 ml de una solución que contenía sorbitol 1,2 M, Na_2EDTA 10 mM, citrato de sodio 0,1 M, pH 5,8, y 2 mg de Novozym C3234. La suspensión se incubó a 30°C durante 30 minutos, se recogieron las células por centrifugación, se lavaron en 10 mL de sorbitol 1,2 M y 10 mL de CAS (sorbitol 1,2 M, $CaCl_2$ 10 mM, Tris HCl 10 mM (Tris = Tris(hidroximetil)-aminometano) pH = 7,5) y se resuspendieron en 2 ml de CAS. Para la transformación, se mezcló 1 ml de células suspendidas en CAS con aproximadamente 0,1 mg de DNA plasmídico y se dejó a la temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió 1 ml de (20% polietilenglicol 4000, CaCl2 10 mM, Tris HCl 10 mM, pH = 7,5) y la mixtura se dejó durante 30 minutos más a la temperatura ambiente. Se centrifugó la mixtura y el sedimento se resuspendió en 0,1 ml de SOS (sorbitol 1,2 M, 33% v/v YPD, $CaCl_2$ 6,7 mM), y se incubó a 30ºC durante 2 horas. Se centrifugó luego la suspensión y el sedimento se resuspendió en 0,5 ml de sorbitol 1,2 M. Se añadieron luego 6 ml de top agar (el medio SC de Sherman et al. (1982) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) que contenía sorbitol 1,2 M más 2,5% de agar) a 52°C y la suspensión se vertió sobre placas que contenían el mismo medio que contenía sorbitol solidificado en agar.

Ejemplo 1

Interrupción del gen Δkex1::TRP1-ΔFA

La mutación del alelo de deleción trp1-FA se construyó como sigue:

Un fragmento de DNA sintético que codificaba el alelo trp1-ΔFA se sintetizó por PCR utilizando oligonucleótidos sintéticos (Horecka J, Jigami Y. (1999). The trp1-ΔFA designer deletion for PCR-based gene functional analysis in Saccharomyces cerevisiae. Yeast.: 15 (1769-74)) y técnicas estándar.

El fragmento trp1-ΔFA se compone de un fragmento de 476 pares de bases de la región 5' UTR de KEX1, fusionado directamente a un fragmento de 525 pares de bases de la región 3' UTR de KEX1, evitando así el solapamiento de la secuencia homóloga de DNA a la casete TRP1-FA utilizada como marcador seleccionable en el plásmido pFA6a-TRP1 (Longtine, M.S., McKenzie, A., Demarini, D., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae. Yeast: 14., (953-961)). El fragmento PCR de trp1-ΔFA se clonó al vector TOPO-CR2.1 como se describe por el fabricante (Invitrogen), dando como resultado el plásmido pFI379.

Se obtuvo una cepa de levadura de deleción de trp1- ΔFA como sigue:

El método utilizado para seleccionar la interrupción del gen TRP1 implica un procedimiento de contraselección. Se cultivóen medios que contenían ácido 5-fluoroantranílico da como resultado anti-metabolismo por las enzimas en el camino biosintético del triptófano. Las células de levadura, que carecen de las enzimas requeridas para la conversión de ácido antranílico en triptófano son resistentes al ácido 5-fluoroantranílico (Toyn, J.H., Gunyuzlu, P.L., White, H., Thompson, L.A. and G.F. Hollis (2000). A counterselection for the tryptophan pathway in yeast: 5-fluoroanthranilic acid resistance. Yeast: 16 (553-560)).

La cepa hospedadora de levadura NNY574 (MATα ura3-D0 leu2-D0 his3-D0 tpi1::URA3 yps1::HIS3 pep4::LEU2) se transformó con el plásmido pSA281, un vector de expresión de levadura para expresión secretora de un precursor análogo de amilina EEAEK(SEQ ID NO:1)-amilina (1-37)-K1 E, S28P, S29P, G38 para crear yFI754. La cadena principal plasmídica de pSA281 está basada en el vector de tipo cPOT que facilita el crecimiento en medios ricos que contienen glucosa como única fuente de carbono por complementación de la mutación delta-tpi1 de la cepa hospedadora.

Un fragmento trp1-ΔFA se amplificó por PCR utilizando pFI379 como molde y oligonucleótidos sintéticos y métodos estándar. El fragmento PCR trp1-ΔFA se utilizó directamente para transformación de yFI754 por el método LiAc (Gietz y Wood, 2002). Después de la transformación, las células de levadura se extendieron sobre agar YEPD y se incubaron durante una noche a 30ºC seguido por replicación en placa en un medio mínimo que contenía ácido 5-fluoroantranílico. La selección para las células de levadura que contenían el alelo de deleción trp1-ΔFA integrado en el genoma se realizó por contraselección respecto a la presencia del gen TRP1 utilizando ácido 5-fluoroantranílico (Toyn et al, 2000) dando como resultado la cepa de levadura trp1-ΔFA yFI810.

El alelo de interrupción del gen Δkex1::TRP1- FA se construyó como sigue:

Un fragmento de DNA sintético del alelo Δkex1-D0 compuesto de 518 pares de bases de la secuencia de DNA 5'UTR de KEX1 seguido por un sitio de la endonucleasa de restricción SphI, seguido por un sitio de la endonucleasa de restricción Sbf1, seguido por 304 pares de bases de la secuencia de DNA 3'UTR de KEX1 se construyó por síntesis de DNA in vitro a partir de una fuente comercial y se obtuvo clonado en un vector pMA (Geneart AG, BioPark, Josef-Engert-Str. 11, D-93053 Regensburg, Alemania). Este plásmido se designó pFI472. Un fragmento de DNA sintético que contenía la casete TRP1-FA flanqueada por los sitios de las endonucleasas de restricción SphI y Sbf1 se construyó por síntesis de DNA in vitro a partir de una fuente comercial y se obtuvo clonado en un vector pMA-RQ (GeneArt ag). Este plásmido se designó pFI468. Un plásmido, pFI473, que contenía el alelo de interrupción del gen Δkex1::TRP1-FA se construyó por ligación de dos fragmentos de DNA: un fragmento de 3163 pares de bases obtenido después de digestión de pFI472 con SphI y Sbf1 y un fragmento de 872 pares de bases obtenido después de digestión de pFI468 con SphI y Sbf1. Finalmente, se digirió pFI473 con XhoI e HincII y se aisló un fragmento de DNA de 1707 pares de bases que contenía el alelo Δkex1::TRP1-FA y se utilizó para transformación de yFI810 por el procedimiento de LiAc (Gietz, R.D. and Wood, R. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate / single-stranded carrier DNA / polyethylene glycol method. Methods in Enzymology: 350, (87 - 96)). Después de la transformación, las células de levadura se extendieron sobre placas mínimas sin triptófano a fin de seleccionar mutantes con la deleción Δkex1::TRP1-FA. Se caracterizaron transformantes TRP+ por PCR para confirmar la integración correcta del alelo Δkex1::TRP1-FA en el locus KEX1. Se aisló la cepa de levadura yFI815 como un mutante de deleción Δkex1::TRP1-FA (MATα ura3-D0 leu2-D0 his3-D0 trp1-delta-FA tpi1::URA3 yps1::HIS3 pep4::LEU2 kex1::TRP1-FA, pSA281).

Ejemplo 2

Interrupción del gen Δkex1::KanMX4

Una cepa de levadura con el gen KEX1 delecionado y el genotipo Matα his3D1 leu2D0 lys2D0 ura3D0 kex1D0::kanMX4 se adquirió de la colección de cepas de deleción Euroscarf (número de acceso Y14570). En esta cepa de levadura, el fragmento de DNA que codifica el marco de lectura abierto de KEX1 ha sido reemplazado con el marcador seleccionable dominante KanMX4, que confiere resistencia al antibiótico G418/geneticina (Wach A., Brachat, A., Pöelmann R. y Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in Saccharomyces cerevisiae. Yeast: 10 (1793-808).

Se aisló DNA genómico de Y14570 y se utilizó como molde en una reacción PCR estándar con oligonucleótidos sintéticos oTLKH 68 (cccggaaccgaaaaacaatgtgga) (SEQ ID NO:2) and oILLa482 (agttcagtagtgtgaattaaataaaacagtcagttcttgatggattgtacccttttaaag-aatttatctttatg) (SEQ ID NO:3) a fin de ampliar un fragmento de DNA sintético que contenía la casete del alelo de deleción Δkex1::KANMX4. Este fragmento de DNA se utilizó directamente para transformación de yFI650 (cepa hospedadora NNY574 con el plásmido pSA082 de cPOT) por el método LiAc (Gietz, R.D. and Wood, R. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate / single-stranded carrier DNA / polyethylene glycol method. Methods in Enzymology: 350, (87 - 96)). Después de la transformación, las células de levadura se extendieron sobre agar YEPD y se incubaron durante una noche a 30ºC seguido por replicación en placa sobre agar selectivo YEPD + 200 mg/L de G418. Las colonias de levadura que aparecieron al cabo de 3 días de incubación ulterior a 30ºC se aislaron y caracterizaron por PCR para confirmar la integración correcta del alelo Δkex1::KanMX4 en el locus KEX1. La cepa de levadura yFI750 se aisló como un mutante de deleción Δkex1::KanMX4 (MATα ura3-D0 leu2-D0 his3-D0 trp1-delta-FA tpi1::URA3 yps1::HIS3 pep4::LEU2 kex1::KanMX4, pSA082). La eliminación del plásmido cPOT de yFI750 se indujo por cultivo durante muchas generaciones sin selección de glucosa. La cepa de levadura resultante, yFI751 (MATα ura3-D0 leu2-D0 his3-D0 trp1-delta-FA tpi1::URA3 yps1::HIS3 pep4::LEU2 kex1::KanMX4) se utilizó como nueva cepa hospedadora para transformación con vectores de expresión de levadura del tipo cPOT.

Ejemplo 3

Se utilizó el análisis LC-MS utilizando un instrumento LC/MSD TOF (Agilent) para determinar la masa molecular de los péptidos secretados en sobrenadantes de levadura conforme a los ajustes recomendados por el fabricante. La simplificación del cromatograma TIC se realizó utilizando el software acompañante. Las abundancias de las especies de longitud total y delecionada de glicina se obtuvieron a partir del espectro simplificado y se utilizaron para estimación del porcentaje de péptido de longitud total frente al conjunto de péptido de longitud total y delecionado de glicina (Tabla 1).

Tabla 1:

Hospedador	NNY574			yFI751 (conforme a la invención)		
	KEX1			Δkex1		
Péptido secretado	Plásmido	Cepa	% Longitud total	Plásmido	Cepa	% Longitud total
Amilina extendida en el terminal N (1-37) K1E, S28P, S29P, G38	pSA281	yFI754	64	pSA281	yFI797	95
PP (1-36) K26 G37	pSA328	yFI757	44	pSA328	yFI798	97

En la Tabla 1 se ve que la expresión de los polipéptidos con una glicina C-terminal como en una cepa que tiene un gen KEX1 delecionado (no-funcional) duplica aproximadamente la expresión del producto de longitud total.

Ejemplo 4

Construcción de sistemas de expresión de levadura y producción de EEAEK- amilina (1-37) K1E, S28P, S29P, G38

Los plásmidos de expresión son del tipo C-POT, similares a los descritos en EP 171.142. Éstos son vectores de expresión basados en 2μ, caracterizados por contener el gen de triosa-fosfatoisomerasa (POT) de Schizosaccharomyces pombe para el propósito de selección y estabilización del plásmido en S. cerevisiae. Los plásmidos contienen también el promotor y el terminador de triosa-fosfatoisomerasa de S. cerevisiae. Estas secuencias son similares a las secuencias correspondientes en el plásmido pKFN1003 (descrito en WO 90100075) como lo son todos secuencias restantes excepto las siguientes: 1) La secuencia del fragmento EcoRI-XbaI que codifica la proteína de fusión del conductor y el producto insulina. 2) Se ha introducido una mutación silenciosa que da como resultado la eliminación de un sitio NcoI en la región 2μ del vector de expresión. Con objeto de facilitar la clonación de proteínas de fusión diferentes, la secuencia de DNA que codifica el conductor pre-pro de MFα1 ha sido modificada para incorporar un sitio NcoI (véase Figura 1) y se designa como conductor pre-pro MFα1*. Así, el fragmento NcoI-XbaI está reemplazado simplemente por un fragmento NcoI-XbaI que codifica la molécula precursora de interés. Tales fragmentos NcoI-XbaI pueden construirse sintéticamente o sintetizarse utilizando oligonucleótidos sintéticos y PCR conforme a técnicas estándar. Además del conductor α pueden utilizarse otros conductores. Un fragmento de DNA sintético que contenía secuencias codificantes de EEAEAK-amilina (1-37) K1E, S28P, S29P, G38 se obtuvo de Geneart AG, BioPark, Josef-Engert-Str. 11, D-93053 Regensburg, Alemania. La amilina sintética (1-37) K1E, S28P, S29P, G38 se suministró con secuencias de DNA 5' que codificaban una extensión N-terminal EEAEK (SEQ ID NO:1) para facilitar la expresión en levadura. El DNA sintético se digirió con NcoI y XbaI y se ligó al fragmento vector NcoI-XbaI del vector de expresión tipo cPOT modificado (Figura 1). Esto dio como resultado el plásmido de expresión pSA281 que codificaba EEAEK-amilina (1-37) K1E, S28P, S29P, G38 con la secuencia EEAEKCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTYG (SEQ ID NO: 4). La secuencia de DNA

tiene la secuencia siguiente: gaagaagctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaa-gattggctaattttttggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatacttatggt (SEQ ID NO:5).

El plásmido de expresión se propagó en E. coli, se cultivó en presencia de ampicilina y se aisló utilizando técnicas estándar (Sambrook et al., 1989). El DNA plasmídico se comprobó respecto a inserción por nucleasas de restricción apropiadas (v.g. EcoRI, NcoI, XbaI) y se demostró, por análisis de la secuencia, que contenía la secuencia apropiada de la Ext_Amylin (1-37) K1 E, S28P, S29P, G38.

El plásmido se transformó en las cepas de S. cerevisiae NNY547 e yFI751. Se seleccionaron transformantes de levadura que alojaban el plásmido por utilización de glucosa como fuente de carbono en placas de agar YPD al 2% (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa). Las cepas de levadura resultantes se inocularon en 5 mL de medio de crecimiento que contenía glucosa como la única fuente de carbono. El cultivo se llevó a cabo a 30ºC durante 3 días. Después de centrifugación, se retiró el sobrenadante para análisis LC/MS, por cuyo método se confirmó la identidad de las moléculas secretadas como se ha descrito arriba.

Ejemplo 5

Construcción de sistemas de expresión de levadura y producción de la molécula análoga de PP precursora PP(1-36) K26 G37

Fragmentos de DNA sintético que contenían la secuencia codificante PP(1-36) K26, G37 se obtuvieron de Geneart AG, BioPark, Josef-Engert-Str. 11, D-93053 Regensburg, Alemania. El DNA sintético se digirió con NcoI y XbaI y se ligó al fragmento vector NcoI-XbaI del vector de expresión modificado tipo cPOT (Figura 1). Esto dio como resultado el plásmido de expresión pSA228 que codificaba PP(1-36) K26 G37 con la secuencia de aminoácidos siguiente APLEPVYPGDNATPEQMAQYAADLRKYINMLTRPRYG (SEQ ID NO:6). La secuencia de DNA correspondiente es como sigue: gcaccattggaaccagtttacccaggtgataacgcaactccagag-cagatggctcagtatgctgcagatttaagaaagtatataaatatgttaacaagaccaagatatggt (SEQ ID NO:7).

Se comprobó la identidad del vector de expresión, se transformó el plásmido en S.cerevisiae y la cepa de levadura se cultivó, recogiéndose la proteína secretada como se ha descrito arriba.

Ejemplo 6

Construcción de sistemas de expresión de levadura y producción de EEAEK-amilina (1-37) K1E, S28P, S29P, X37, G38

Para examinar el efecto de la identidad del aminoácido próximo al residuo glicina C-terminal, fragmentos sintéticos de DNA que contenían la secuencia codificante EEAEK-amilina (1-37) K1 E, S28P, S29P, X37, G38, en la que el residuo de aminoácido (residuo de aminoácido núm. 37) unido al Gly C-terminal es A, G, F, I, M, S, P, T, W, R, L, Q o N se obtuvieron de Geneart AG, BioPark, Josef-Engert-Str. 11, D-93053 Regensburg, Alemania. El DNA sintético se digirió con NcoI y XbaI y se ligó al fragmento vector NcoI-XbaI del vector de expresión tipo cPOT modificado (Figura 1).
Esto dio como resultado plásmidos de expresión que codificaban
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTAG (SEQ ID NO:8),
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTGG (SEQ ID NO:9),
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTFG (SEQ ID NO:10),
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTIG (SEQ ID NO:11),
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTMG (SEQ ID NO 12),
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTSG (SEQ ID NO:13),
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTPG (SEQ ID NO:14),
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTTG (SEQ ID NO:15),
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTWG (SEQ ID NO:16),
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTRG (SEQ ID NO:17),
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTLG (SEQ ID NO:18),
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTQG (SEQ ID NO:19) y
EEAEKCNTATCATQR-LANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTNG (SEQ ID NO:20).

Las secuencias de DNA correspondientes son como sigue:
gaagaagctgaaaaagaatgtaa-tactgctacttgtgctactcaaagattggctaattttttggttcattcttctaataattttt-ggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatactgctggt (SEQ ID NO:21);
gaagaagctgaaaaagaatgtaa-tactgctacttgtgctactcaaagattggctaattttttggttcattcttctaataattttggtccaat tttgccaccaac-taatgttggttctaatactggtggt (SEQ ID NO:22);
gaagaagctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaagattggctaattttttt-ggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatacttttggt (SEQ ID NO:23);

gaagaa-gctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaagattggctaatttttt-
ggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatactattggt (SEQ ID NO:24);
gaagaa-gctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaagattggctaatttttt-
ggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatactatgggt (SEQ ID NO:25);
gaagaagctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaagattggctaatttttt-
ggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatacttctggt (SEQ ID NO:26);
gaagaagctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaagattggctaatttttt-
ggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatactcctggt (SEQ ID NO:27);
gaagaa-gctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaagattggctaatttttt-
ggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatactactggt (SEQ ID NO:28);
gaagaa-gctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaagattggctaatttttt-
ggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatacttggggt (SEQ ID NO:29);
gaagaagctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaagattggctaatttttt-
ggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatactagaggt (SEQ ID NO:30);
gaagaagctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaagattggctaatttttt-
ggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatactcttggt (SEQ ID NO:31);
gaagaagctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaagattggctaatttttt-
ggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatactcaaggt (SEQ ID NO:32) y
gaagaagctgaaaaagaatgtaatactgctacttgtgctactcaaagattggctaatttttt-
ggttcattcttctaataattttggtccaattttgccaccaactaatgttggttctaatactaatggt (SEQ ID NO:33).

Se verificó la identidad del vector de expresión, se transformó el plásmido en S.cerevisiae, se cultivó la cepa de levadura, y la proteína secretada se recogió y se analizó como se ha descrito arriba en los ejemplos 3 y 4. Las abundancias de las especies de longitud total y delecionada de glicina se obtuvieron a partir de los espectros simplificados y se utilizaron para estimación del porcentaje de péptido de longitud total frente al conjunto de péptido de longitud total y delecionado de glicina. Los resultados aparecen en la Tabla 2. En la Tabla 2 se ve que el Gly C-terminal en la molécula de amilina se escinde cuando el residuo de aminoácido unido al Gly es uno de Tyr, Phe, Met, Leu, Trp, Ala, Ile y Arg.

Tabla 2

Aminoácido siguiente a Gly (X37)	% de Longitud total
Tyr	45,5
Phe	47,6
Met	60,6
Leu	74,4
Trp	85,3
Ala	85,6
Ile	87,6
Arg	94,1
Gly	100
Ser	100
Pro	100
Asn	100
Thr	100
Gln	100

REIVINDICACIONES

1. Método para producción de un polipéptido amidado C-terminal en el cual el método comprende los pasos siguientes
a) cultivo de una cepa de levadura que tiene un gen KEX1 no-funcional y que comprende una secuencia de DNA que codifica un polipéptido con un Gly C-terminal en condiciones para expresión del polipéptido en la cepa de levadura, b) α-amidación in vitro del polipéptido expresado del paso a) o directamente en la célula de producción si la célula tiene la maquinaria necesaria para α-amidación in vivo y c) aislamiento y purificación del péptido amidado en el terminal C.

2. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual el polipéptido se aísla del medio de cultivo.

3. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es del grupo constituido por Tyr, Phe, Met, Leu, Trp, Ala, Ile y Arg.

4. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es del grupo constituido por Tyr, Trp, Phe, Val, Leu, Ile y Met.

5. Método conforme a la reivindicación 4, en el cual el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es Val, Leu, Ile o Met.

6 Método conforme a la reivindicación 4, en el cual el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es Tyr, Trp o Phe.

7. Método conforme a la reivindicación 6, en el cual el residuo de aminoácido unido al Gly C-terminal es Tyr.

8. Método conforme a cualquiera de las realizaciones 1-7, en el cual la cepa de levadura tiene al menos un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido por PEP4, YPS1, MKC7, YPS3, YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

9. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido por PEP4, YPS1 y MKC7.

10. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4, YPS1 e YPS3.

11. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4, YPS3 y MKC7.

12. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 e YPS1.

13. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4, e YPS3.

14. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 y MKC7.

15. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3, YPS1 y MKC7.

16. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 e YPS1.

17. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 y MKC7.

18. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 e YPS5.

19. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 e YPS6.

20. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 e YPS7.

21. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 y PRB1.

22. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 y STE13.

23. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of PEP4 y KEX2.

24. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 e YPS5.

25. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 e YPS6.

26. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 e YPS7.

27. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 y PRB1.

28. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 y STE13.

29. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS3 y KEX2.

30. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS1 y PRB1.

31. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS1 y STE13.

32. Método conforme a la reivindicación 8, en el cual la cepa de levadura tiene un gen adicional de proteasa no-funcional seleccionado del grupo constituido of YPS1 y KEX2.

33. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen PEP4 no-funcional.

34. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen YPS1 no-funcional.

35. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen MKC7 no-funcional.

36. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen YPS3 no-funcional.

37. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen YPS5 no-funcional.

38. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen YPS6 no-funcional.

39. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen YPS7 no-funcional.

40. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen PRB1 no-funcional.

41. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen STE13 no-funcional.

42. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene un gen KEX1 no-funcional y un gen KEX2 no-funcional.

43. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y uno solo de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

44. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y dos de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

45. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y tres de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

46. Método conforme a la reivindicación 1, en el cual la cepa de levadura tiene una silenciación del gen KEX1 y cuatro de los genes de proteasa seleccionados del grupo siguiente PEP4, YPS1, MKC7(YPS2), YPS3(YPS4), YPS5, YPS6, YPS7, PRB1, STE13 y KEX2.

47. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el gen KEX1 ha sido delecionado.

48. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el gen KEX1 se ha hecho no-funcional por mutación, v.g. por recombinación homóloga.

49. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el polipéptido tiene de 25 a aproximadamente 45 residuos de aminoácidos en la cadena principal.

50. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el polipéptido se selecciona del grupo constituido por amilina, análogos de amilina, PP y análogos de PP, PYY y análogos de PYY, GLP-1 y análogos de GLP1, oxitocina, vasopresina, calcitonina, gastrina, NPY, FMRF-amida, secretina, GFHR, CRF, neuroquinina A, péptido liberador de gastrina, y α-MSH.

51. Método conforme a la reivindicación 49-50, en el cual el polipéptido se selecciona del grupo constituido por PP, PYY y amilina.

52. Método conforme a la reivindicación 49-50, en el cual el polipéptido es amilina.

53. Método conforme a la reivindicación 49-50, en el cual el polipéptido es PP.

54. Método conforme a la reivindicación 49-50, en el cual el polipéptido es PYY.

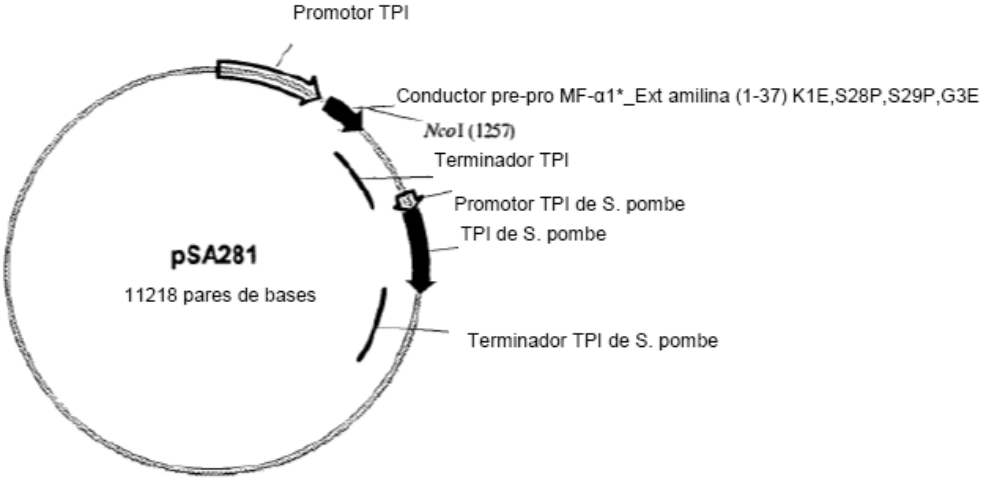
Promotor TPI
Conductor pre-pro MF-α1*_Ext amilina (1-37) K1E,S28P,S29P,G3E
NcoI (1257)
Terminador TPI
Promotor TPI de S. pombe
TPI de S. pombe
pSA281
11218 pares de bases
Terminador TPI de S. pombe

Fig. 1