(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 738 181**

(51) Int. CI.:

C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014 PCT/US2014/022135**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14138703**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014 E 14759649 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2964765**

(54) Título: **Promotores de levadura de Pichia pastoris**

(30) Prioridad:

08.03.2013 US 201361774982 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.01.2020

(73) Titular/es:

KECK GRADUATE INSTITUTE OF APPLIED LIFE SCIENCES (100.0%)
535 Watson Drive
Claremont, CA 91711, US

(72) Inventor/es:

TOLSTORUKOV, ILYA I. y
CREGG, JAMES M.

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Promotores de levadura de *Pichia pastoris*

Campo de la divulgación

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos aislados, métodos de expresión, células hospedadoras y vectores de expresión. Más particularmente, la invención se refiere a ácidos nucleicos aislados de *Pichia pastoris* en donde los ácidos nucleicos tienen actividad promotora. La invención también se refiere a métodos de expresión, células hospedadoras y vectores de expresión para el uso de *Pichia pastoris* promotores para producir proteínas.

Antecedentes y resumen de la invención

Los sistemas de expresión de levadura pueden usarse para producir proteínas de manera eficaz, tales como las enzimas, hormonas y proteínas de vacuna, en parte, porque algunas levaduras crecen rápidamente a altas densidades celulares, se cultivan en medios simples y económicos y son eucariotas por lo que pueden modificar las proteínas de una manera similar a las proteínas nativas en los mamíferos. Adicionalmente, con una secuencia de señal adecuada, la proteína expresada puede secretarse en el medio de cultivo para un aislamiento y purificación convenientes. Algunos sistemas de expresión de levadura también son aceptados en las industrias farmacéutica y alimentaria como seguros para la producción de productos farmacéuticos y productos alimenticios, a diferencia de los sistemas de expresión de hongos y bacterias, que en algunos casos pueden ser inseguros, por ejemplo, para la fabricación de alimentos para humanos.

De esta manera, es beneficioso para una diversidad de industrias, tales como las industrias de alimentos y piensos, las industrias de la salud humana y animal, y similares, desarrollar o mejorar los sistemas de expresión de levadura que se pueden usar para expresar altos niveles de proteínas para aumentar el rendimiento, reducir el gasto de aislamiento y purificación de proteínas, y reducir los costos de los productos de salud humana y animal y los productos alimenticios.

Se ha desarrollado una diversidad de tipos de sistemas de expresión de levadura que implican el uso de la expresión inducible o constitutiva de proteínas usando ácidos nucleicos que codifican proteínas homólogas o heterólogas, bajo el control de un promotor de levadura. Los promotores son elementos reguladores que están vinculados al extremo 5' de un ácido nucleico que codifica una proteína, y pueden interactuar con diversos factores reguladores en la célula hospedadora (por ejemplo, una célula hospedadora de levadura) para controlar la transcripción del ARN a partir del ADN. Los promotores también pueden controlar el tiempo de transcripción del ARN a partir del ADN. Por ejemplo, el promotor AOX 1 ha sido identificado en la levadura *Pichia pastoris,* y se usa comúnmente en los sistemas de expresión de levadura porque es un promotor estrechamente regulado, fuerte.

El documento WO2012/129036A2 describe promotores para expresión recombinante de alto nivel en células hospedadoras fúngicas.

El documento US2008/108108 describe promotores novedosos de *P. pastoris pastoris* y su uso para dirigir la expresión de proteínas en levaduras, preferentemente utilizando una estrategia de cruzamiento haploide.

Stadlmayer et al (2010), Journal of Biotechnology, vol. 150, n.º 4, páginas 519-529 describe la identificación y caracterización de promotores novedosos de *Pichia pastoris* para la producción de proteínas heterólogas.

Gabriel Potvin et al (2012), Biochemical Engineering Journal, vol. 64, páginas 91-105 describe los aspectos de ingeniería de bioprocesos de la producción de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris.*

El documento WO2008/1287001A2 describe sistemas de expresión.

Andreas Küberl et al (2011), Journal of Biotechnology, vol. 154, páginas 312-320 describe la secuencia del genoma de alta calidad de *Pichia pastoris* CB7435.

Debido a la importancia de los sistemas de expresión de levadura para una diversidad de industrias, incluyendo la industria farmacéutica humana, y las industrias de alimentos humanos y alimentación animal, la mejora de los sistemas de expresión de levadura es el foco de mucha investigación y desarrollo. En consecuencia, los presentes inventores han identificado promotores de *Pichia pastoris.* que son particularmente eficaces para el uso en la expresión de proteínas en levadura. Los promotores descritos en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, en sistemas para la expresión constitutiva de proteínas.

La materia objeto de la invención es como se establece en las reivindicaciones.

Un aspecto de la invención se refiere a un ácido nucleico aislado en donde el ácido nucleico aislado comprende una secuencia al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, o al menos un 90 % idéntica a un fragmento de la misma,

en donde dicha secuencia al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o al menos el 90 % idéntica a un fragmento de la misma exhibe actividad promotora, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de un promotor constitutivo de *Pichia pastoris* y en donde el ácido nucleico aislado está unido operativamente a una secuencia codificante heteróloga.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado anterior.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico aislado anterior o el vector de expresión anterior.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para producir una proteína, comprendiendo el método la etapa de cultivar en un medio de cultivo una célula hospedadora que comprende un primer casete de expresión que comprende un ácido nucleico aislado de SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, unido operativamente a una secuencia codificante heteróloga que codifica una proteína,

en donde el cultivo se realiza en condiciones que permiten la expresión de la proteína;
en donde la proteína se expresa usando el primer casete de expresión en combinación con un segundo casete de expresión, comprendiendo dicho segundo casete

(a) la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína unida operativamente a un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, en donde la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 tienen actividad promotora; o
(b) el ácido nucleico aislado de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, unido operativamente a la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 muestra la secuencia de nucleótidos del promotor Chr1-0469 (SEQ ID NO: 1).
La FIGURA 2 muestra la secuencia de nucleótidos del promotor UPP (SEQ ID NO: 2).
La FIGURA 3 muestra la secuencia de nucleótidos de la secuencia del promotor AOX1 (SEQ ID NO: 3).
La FIGURA 4 muestra la secuencia genómica 1000 pb en dirección 5' del codón de inicio ATG del promotor AOX1 (SEQ ID NO: 4).
La FIGURA 5 muestra el nivel de expresión de GFP para diversos transformantes en placas de réplica.
La FIGURA 6 muestra la actividad promotora relativa para los promotores pUPP, TEF2, Chr1-0469, GAP, AOX1 y DAS en diversas condiciones.
La FIGURA 7 muestra el mapa de un vector indicador. Se usaron vectores similares con el ORF tanto de la alfa como de la beta-galactosidasa, así como con o sin una señal de secreción (factor de cruzamiento alfa)
La FIGURA 8 muestra la secuencia de nucleótidos de los cebadores directos usados para el aislamiento del promotor Chr1-0469 (SEQ ID NO: 1) y el promotor UPP (SEQ ID NO: 2) de ADN genómico de *Pichia pastoris* por PCR. Los fragmentos de ADN correspondientes - los productos de estas reacciones de PCR - se introducen en el vector indicador con el ORF de alfa-galactosidasa (figura 7).
La FIGURA 9 (paneles A-C) muestra el nivel de expresión de alfa-galactosidasa de transformantes aislados con las construcciones promotor-indicador indicadas.
La FIGURA 10 muestra la actividad de la fitasa appA2 de *E. coli* en *Pichia pastoris.*

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado en donde el ácido nucleico aislado comprende una secuencia al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, o al menos el 90 % idéntica a un fragmento de la misma, en donde dicha secuencia al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o al menos el 90 % idéntica a un fragmento de la misma exhibe actividad promotora, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de un promotor constitutivo de *Pichia pastoris* y en donde el ácido nucleico aislado está unido operativamente a una secuencia codificante heteróloga.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico aislada es la SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma. En otras realizaciones, se proporcionan vectores de expresión, células hospedadoras y construcciones de ADN que comprenden estas secuencias promotoras.

Los promotores descritos anteriormente se han aislado de una cepa de levadura (es decir, NRRL Y11430) actualmente clasificada como cepa de levadura *Pichia pastoris*. Sin embargo, La clasificación puede cambiar en algún momento a una especie de *Komagataella* (por ejemplo, *Komagataella phaffii).*

En otra realización, se proporciona un método para producir una proteína usando estas secuencias promotoras. El método comprende las etapas de cultivar en un medio de cultivo una célula hospedadora que comprende un primer casete de expresión que comprende un ácido nucleico aislado de SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, unido

operativamente a una secuencia codificante heteróloga que codifica una proteína, en donde el cultivo se realiza en condiciones que permiten la expresión de la proteína; en donde la proteína se expresa usando el primer casete de expresión en combinación con un segundo casete de expresión, comprendiendo dicho segundo casete

(a) la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína unida operativamente a un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, en donde la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 tienen actividad promotora; o
(b) el ácido nucleico aislado de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, unido operativamente a la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína.

En otra divulgación ilustrativa, se proporciona una proteína aislada producida de acuerdo con este método.

La frase "consiste en" o "que consiste en" significa que la secuencia especificada por la SEQ ID NO. no tiene secuencias de nucleótidos adicionales distintas de las correspondientes a la SEQ ID NO.

De acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier sistema de expresión de levadura conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se describen diversos sistemas de expresión de levadura en las patentes de EE.UU. N.º 6.451.572, 6.841.370, 6.974.690, 7.320.876, 7.078.035, 7.138.260 y la publicación PCT N.º WO 2007/112739. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se puede usar cualquiera de estos sistemas de expresión de levadura. Como alternativa, se puede usar cualquier especie de levadura o sistema de expresión de levadura adecuado para la expresión de una proteína, incluyendo especies de levadura, tales como especies de *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae),* especies de *Kluyveromyces* (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis),* especies de *Torulaspora*, especies de *Yarrowia* (por ejemplo, *Yarrowia lipolitica),* especies de *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe).* En otra realización, pueden usarse especies de levaduras metilótrofas tales como especies de *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris* o *Pichia methanolica),* especies de *Hansenula* (por ejemplo, *Hansenula polymorpha),* especies de *Torulopsis*, especies de *Komagataella*, especies de *Candida* (por ejemplo, *Candida boidinii)* y especies de *Karwinskia*. En una realización, la proteína puede expresarse en la levadura metilótrofa *Pichia pastoris.* Las levaduras metilótrofas son capaces de utilizar metanol como única fuente de carbono para la producción de los recursos energéticos necesarios para mantener la función celular. Las levaduras metilótrofas contienen genes que codifican enzimas para la utilización de metanol tales como los genes que codifican la alcohol oxidasa. Cualquiera de estas células hospedadoras puede ser una cepa de célula hospedadora que sea heteróloga al promotor descrito en el presente documento (es decir, la célula hospedadora normalmente no contiene en la naturaleza el promotor descrito en el presente documento).

Puede usarse un sistema de expresión de levadura para producir una cantidad suficiente de la proteína intracelularmente, o secretarse de las células de levadura para que la proteína pueda aislarse y purificarse convenientemente del medio de cultivo. Como se usa en el presente documento, el término "expresión" significa la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico en una célula hospedadora. Un sistema de expresión de levadura puede incluir, pero no se limita a, la célula hospedadora de levadura y el vector de expresión (por ejemplo, una construcción de ADN) usados para expresar la proteína. El vector de expresión puede contener un promotor descrito en el presente documento y, como se conoce en la técnica, el promotor es heterólogo al vector de expresión (es decir, la combinación no se produce en la naturaleza). En una realización, la secreción de la proteína en el medio de cultivo se controla mediante un péptido señal (por ejemplo, el péptido señal del factor α de levadura, el péptido señal KILM1 de levadura, el péptido señal PHO1 de levadura o el péptido señal SUC2 de levadura) incorporado en el vector de expresión y que es capaz de dirigir la secreción de la proteína expresada fuera de la célula de levadura. En otras realizaciones, otros péptidos señal adecuados para facilitar la secreción de la proteína de células de levadura son conocidos por los expertos en la materia. En un aspecto, el péptido señal se escinde típicamente de la proteína después de la secreción.

En diversas realizaciones, Se puede usar cualquier vector de expresión conocido por el experto en la materia (por ejemplo, un vector que se replique de manera autónoma o se integre en el genoma del hospedador) y sea compatible con un sistema de expresión de levadura. Como se usa en el presente documento, el término "vector" significa cualquier plásmido, u otro vector, en forma bicatenaria o monocatenaria o en forma lineal o circular que puede transformar una célula de levadura mediante la integración en el genoma de la célula de levadura o mediante la existencia extracromosómica (por ejemplo, un plásmido de replicación autónoma). Como se conoce en la técnica, un vector (por ejemplo, vector de expresión o casete de expresión) es una construcción de ácido nucleico usada para transformar una célula hospedadora para la expresión de una proteína, polipéptido o péptido y el vector no se encuentra en la naturaleza en la célula hospedadora que transforma.

En una realización, el vector de expresión tiene sitios de escisión de endonucleasas de restricción para la inserción de fragmentos de ADN (por ejemplo, uno o más sitios de clonación y/o un sitio de clonación múltiple), y marcadores genéticos para la selección de transformantes. Por ejemplo, los marcadores genéticos para la selección de transformantes pueden incluir un marcador de selección que permita que una levadura transformada crezca en un medio carente de un nutriente necesario que no puede ser producido por una cepa deficiente, un marcador de selección que codifica una enzima para la cual se conocen sustratos cromogénicos, o un marcador de selección que proporciona resistencia a un medicamento, que incluyen, pero no se limitan a, G418, Nourseotricina (Nat), Zeocina,

Blasticidina o Higromicina. En otra realización, el vector de expresión tiene una secuencia terminadora para la terminación de la transcripción (por ejemplo, el terminador AOX 1 o HSP150). En otra realización, el vector de expresión tiene una región 3' no traducida en dirección 3' de la secuencia de codificación de la proteína con un sitio de poliadenilación. Como se usa en el presente documento, "región no traducida 3'" significa secuencias de nucleótidos que no se traducen en proteínas y se ubican en dirección 3' de una secuencia de codificación para una proteína. Típicamente, una región no traducida 3' incluye secuencias reguladoras para el procesamiento de ARNm. En otra realización, el vector de expresión tiene un origen de replicación (por ejemplo, un origen de replicación bacteriano) para su uso en la síntesis y amplificación del vector, por ejemplo, en un hospedador bacteriano. Diversos vectores de expresión se describen en las patentes de EE.UU. N.º 6.451.572, 6.841.370, 6.974.690, 7.320.876, 7.078.035, 7.138.260 y la publicación PCT N.º WO 2007/112739. La construcción y el uso de vectores de expresión se describen en Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001). En otra realización, el vector de expresión, o un fragmento del mismo, se puede sintetizar *de novo* o puede usarse PCR para amplificar y unir secciones de vectores de expresión.

Como se usa en el presente documento, "secuencias reguladoras" significa secuencias de nucleótidos que se encuentran típicamente en dirección 5' o en dirección 3' desde el extremo 5' o 3', respectivamente, de una secuencia codificante de proteínas. Las secuencias reguladoras no se traducen en proteínas. Las secuencias reguladoras incluyen, pero no se limitan a, secuencias que afectan al procesamiento o la estabilidad del ARN, tales como secuencias de señal de poliadenilación, potenciadores, sitios de unión del represor y promotores.

En una realización, la secuencia codificante de la proteína puede unirse operativamente en el vector de expresión a la secuencia promotora capaz de dirigir la expresión de la proteína, por ejemplo, en levadura. Como se usa en el presente documento, "unido operativamente" significa funcionalmente unido. Como se describe en el presente documento, el promotor puede ser un "promotor constitutivo". Un "promotor constitutivo" significa un promotor que regula la expresión de un gen de interés. La frase "promotor constitutivo" se conoce en la técnica. Un promotor constitutivo puede tener alguna actividad inducible, pero la actividad máxima obtenida con el promotor no es inducible.

Como se usa en el presente documento, "promotor" significa una secuencia de nucleótidos típicamente localizada en dirección 5' desde el extremo 5' de una secuencia codificante para una proteína que controla la transcripción del ARN a partir del ADN, en parte, al interactuar con diversos factores reguladores que controlan la transcripción. En una realización, el promotor puede derivar de la misma especie de levadura que la célula hospedadora de levadura usada para la expresión de proteínas. En otra realización, el promotor puede derivar de una especie de levadura diferente a la célula hospedadora de levadura usada para la expresión de proteínas. En una realización, un promotor puede incluir una secuencia de caja TATA que actúa como un sitio de reconocimiento para dirigir el inicio de la transcripción, que incluye, pero no se limita a uno o más elementos potenciadores transcripcionales. Los elementos potenciadores pueden ser proximales o distales a la secuencia de la caja TATA y pueden estar en una orientación normal de 5' a 3' o pueden estar en una orientación de 3' a 5'. En otra realización, un elemento potenciador puede ser un elemento potenciador nativo de la secuencia promotora o puede ser un elemento potenciador heterólogo insertado en la construcción del vector de expresión. Un "elemento potenciador" como se usa en el presente documento es un elemento regulador que puede estimular la actividad del promotor.

En diversas realizaciones ilustrativas descritas en el presente documento, el promotor puede ser un ácido nucleico aislado en donde el ácido nucleico aislado comprende una secuencia al menos el 92 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 2, o al menos el 92 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntico a un fragmento del mismo, en donde el ácido nucleico aislado comprende la secuencia de un promotor constitutivo de *Pichia pastoris*. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico aislada es la SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma en donde el ácido nucleico aislado comprende la secuencia de un promotor constitutivo de *Pichia pastoris*.

Como se usa en este documento, "un ácido nucleico aislado" significa un ácido nucleico que está sustancialmente libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico en el ADN genómico del organismo del cual deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, un ácido nucleico aislado de acuerdo con la invención puede contener menos de aproximadamente 2 kb, menos de aproximadamente 1 kb, menos de aproximadamente 0,5 kb, menos de aproximadamente 0,1 kb de secuencias de nucleótidos, menos de aproximadamente 0,05 kb o ninguna secuencia de nucleótidos que flanquea de forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico del organismo del cual deriva el ácido nucleico aislado.

Como se usa en el presente documento, "un fragmento del mismo" cuando se refiere a la molécula de ácido nucleico aislada significa un fragmento del ácido nucleico aislado de la SEQ ID NO: 2. En diversas realizaciones ilustrativas, el fragmento puede tener aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, aproximadamente 400 nucleótidos de longitud, aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, aproximadamente 700 nucleótidos de longitud, aproximadamente 800 nucleótidos de longitud o aproximadamente 900 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, el fragmento puede extenderse aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos,

aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos o aproximadamente 900 nucleótidos en dirección 5' desde el extremo 3' del ácido nucleico aislado de la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones más, el fragmento puede incluir aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos o aproximadamente 350 nucleótidos en dirección 5' y/o en dirección 3' de la secuencia de la caja TATA encontrada en la SEQ ID NO: 2.

En diversas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento pueden purificarse mediante técnicas para la purificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden separarse de los contaminantes por métodos físicos que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, técnicas de presión, o mediante el uso de una sustancia con afinidad por los ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN), tales como, por ejemplo, perlas de sílice. Después de lavar lo suficiente, los ácidos nucleicos aislados pueden suspenderse en agua o en un tampón. En otras realizaciones, están disponibles kits comerciales, tal como Qiagen™, Nuclisensm™ y Wizard ™(Promega) y Promegam™. Los métodos para purificar ácidos nucleicos se describen en Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001). Un ácido nucleico aislado como se describe en el presente documento puede ser un ácido nucleico aislado que también se purifica o el ácido nucleico aislado puede ser impuro. Un "ácido nucleico purificado" está sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Los ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento son capaces de hibridación específica, en condiciones de hibridación apropiadas (por ejemplo, tampón apropiado, fuerza iónica, temperatura, concentraciones de formamida y $MgCl_2$), a un ácido nucleico complementario. Los ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento pueden modificarse por sustitución, deleción, el truncamiento y/o pueden fusionarse con otras moléculas de ácido nucleico en donde los ácidos nucleicos aislados resultantes se hibridan específicamente con los ácidos nucleicos complementarios.

También están dentro del alcance de la divulgación los ácidos nucleicos complementarios a los ácidos nucleicos aislados, o fragmentos de los mismos, descritos en el presente documento y aquellos que hibridan con los ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento o aquellos que hibridan con sus complementos en condiciones altamente rigurosas. Como se usa en el presente documento, el término "complementario" se refiere a la capacidad de las secuencias de nucleótidos de purina y pirimidina de asociarse mediante enlaces de hidrógeno para formar moléculas de ácido nucleico bicatenarias. La Guanina y la citosina, la adenina y la timina, y la adenina y el uracilo son complementarios y pueden asociarse a través de enlaces de hidrógeno que dan como resultado la formación de moléculas de ácido nucleico bicatenario cuando dos moléculas de ácido nucleico tienen secuencias "complementarias". Las secuencias de ADN complementarias se denominan "complemento".

De acuerdo con la divulgación "condiciones altamente rigurosas" significa hibridación a 65 °C en 5X SSPE y 50 % de formamida, y lavado a 65 °C en 0,5X SSPE. Las condiciones para la hibridación de alta rigurosidad se describen en Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001). En algunos aspectos ilustrativos, la hibridación puede producirse a lo largo de la longitud completa del ácido nucleico aislado, o a lo largo de parte de su longitud, o en un fragmento del mismo.

También se incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen aproximadamente el 92 %, aproximadamente del 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % y el 99 % de identidad con los ácidos nucleicos aislados descritos aquí o con un fragmento de los mismos. Puede realizarse la determinación del porcentaje de identidad o similitud entre secuencias, por ejemplo, usando el programa GAP (Genetics Computer Group, software; ahora disponible a través de Accelrys en http://www.accelrys.com) y pueden realizarse alineaciones usando, por ejemplo, el algoritmo ClustalW (software VNTI, InforMax Inc.). Puede buscarse en una base de datos de secuencias usando la secuencia de ácido nucleico aislada de interés, o la secuencia de un fragmento de la misma. Los algoritmos para la búsqueda en la base de datos se basan típicamente en el software BLAST (Altschul et al., 1990). En algunas realizaciones, el porcentaje de identidad puede determinarse a lo largo de la longitud completa del ácido nucleico aislado.

Las técnicas para sintetizar los ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento son bien conocidas en la técnica e incluyen síntesis química y métodos recombinantes. Tales técnicas se describen en Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001). Las moléculas de ácido nucleico aisladas también pueden fabricarse comercialmente. Las técnicas para sintetizar los ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento son bien conocidas en la técnica. Los ácidos nucleicos aislados descritos en este documento pueden analizarse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como análisis de enzimas de restricción o secuenciación, para determinar la secuencia de los ácidos nucleicos aislados. De esta manera, los ácidos nucleicos aislados descritos aquí pueden ser sintéticos.

En aspectos ilustrativos, las células de levadura se transforman con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica la proteína de interés operativamente unida a uno de los promotores descritos en el presente documento usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. El término

"transformación" significa la transferencia de un ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico, en una célula hospedadora. En realizaciones ilustrativas, tales protocolos de transformación incluyen la electroporación, métodos de acetato de litio y uso de esferoplastos. En aspectos ilustrativos, la secuencia de codificación de ácido nucleico expresada puede ser una secuencia codificante de ácido nucleico heteróloga. Como se usa en el presente documento, una secuencia codificante heteróloga se define como un ácido nucleico artificial o sintético o un ácido nucleico que se origina a partir de una especie diferente de la especie de la que derivó la secuencia promotora. De esta manera, una secuencia de codificación heteróloga unida a un promotor descrito en el presente documento no se produce en la naturaleza.

En diversas realizaciones, las células de levadura transformadas pueden cultivarse mediante técnicas que incluyen fermentación discontinua y continua en un medio líquido o en un medio semisólido, o un medio sólido. Típicamente, "condiciones que permiten la expresión de la proteína" como se usa en el presente documento significa condiciones para la fermentación discontinua o continua de levadura en un medio líquido, pero el crecimiento en un medio semisólido, tal como el agar, no se excluye. Los medios de cultivo para células de levadura se conocen en la técnica y se complementan típicamente con una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa). Un medio de cultivo de levadura típico es el caldo YPD (Sunrise Science Products, Inc.) que comprende extracto de levadura (10 gramos), peptona Bacto (20 gramos) y dextrosa (20 gramos). En un aspecto ilustrativo, las células de levadura transformadas pueden cultivarse aeróbicamente a 30 °C en un ambiente de pH controlado (un pH de aproximadamente 6) y con la fuente de carbono (por ejemplo, glucosa) mantenida continuamente a un nivel predeterminado conocido para apoyar el crecimiento de las células de levadura a una densidad deseada dentro de un período específico de tiempo.

En un aspecto, se proporciona un método para producir una proteína. El método comprende la etapa de cultivar en un medio de cultivo una célula hospedadora que comprende un primer casete de expresión que comprende un ácido nucleico aislado de SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, unido operativamente a una secuencia codificante heteróloga que codifica una proteína, en donde el cultivo se realiza en condiciones que permiten la expresión de la proteína; en donde la proteína se expresa usando el primer casete de expresión en combinación con un segundo casete de expresión, comprendiendo dicho segundo casete

(a) la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína unida operativamente a un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, en donde la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 tienen actividad promotora; o

(b) el ácido nucleico aislado de la SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma, unido operativamente a la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína.

El método puede comprender además la etapa de purificar la proteína del medio de la célula hospedadora cultivada. Como se usa en el presente documento, un "casete de expresión" significa los elementos de un vector de expresión que dirigen a la célula de levadura para fabricar ARN. Un casete de expresión comprende al menos secuencias reguladoras (por ejemplo, un promotor) y una secuencia codificante para el ARN y la proteína (es decir, un marco de lectura abierto, ORF). En diversos aspectos ilustrativos, la secuencia codificante de la proteína puede ser de una bacteria, una levadura, un hongo, o un virus.

En esta realización del método, la proteína se expresa usando el primer casete de expresión en combinación con un segundo casete de expresión. El segundo casete de expresión comprende 1) la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína unida operativamente a un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4, en donde la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4 tienen actividad promotora o 2) el ácido nucleico aislado de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, unido operativamente a la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína.

En otra realización más, la proteína se puede expresar usando el primer casete de expresión, el segundo casete de expresión y un tercer casete de expresión. En otro aspecto ilustrativo, el tercer casete de expresión puede comprender 1) la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína unida operativamente a un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4, en donde la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4 tienen actividad promotora, o cualquier otro promotor regulado por metanol conocido, tales como el AOX 1, AOX 2, FLD o secuencias promotoras DAS o 2) el ácido nucleico aislado de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 2 o un fragmento de las mismas, unido operativamente a la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína.

En otra realización, se puede usar cualquier número de casetes de expresión adicionales y los casetes de expresión pueden comprender 1) la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína unida operativamente a un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 en la que La SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4 tienen actividad promotora, o cualquier otro promotor regulado por metanol conocido, tales como el AOX 1, AOX 2, FLD o secuencias promotoras DAS o 2) el ácido nucleico aislado de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 2 o un fragmento de las mismas, unido operativamente a la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína. En otra realización, el primer casete de expresión, el segundo casete de expresión y el tercer casete de expresión como se describió anteriormente se utilizan en el método, junto con un

cuarto casete de expresión, un quinto casete de expresión y un sexto casete de expresión en donde todos los casetes de expresión comprenden el ácido nucleico aislado de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento del mismo, unido operativamente a la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína.

En aún otra realización, se proporciona un método para producir una o más proteínas. El método comprende la etapa de cultivar en un medio de cultivo una célula hospedadora que comprende un primer casete de expresión, un segundo casete de expresión y, opcionalmente, uno o más casetes de expresión adicionales, en donde cada uno de los casetes de expresión comprende 1) una secuencia codificante heteróloga que codifica una o más proteínas operativamente unidas a un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 en donde la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4 tiene actividad promotora, o 2) el ácido nucleico aislado de la SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma, unido operativamente a una secuencia codificadora heteróloga que codifica una o más proteínas, en donde el cultivo se realiza en condiciones que permiten la expresión de una o más proteínas. El método puede comprender además la etapa de purificar una de las una o más proteínas del medio de la célula hospedadora cultivada.

En cualquiera de las realizaciones descritas en los dos párrafos anteriores, el ácido nucleico aislado puede ser de al menos el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % homólogo al ácido nucleico aislado de cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma. En cualquiera de las realizaciones descritas en los dos párrafos anteriores, los casetes de expresión se pueden incluir en un vector de expresión o en múltiples vectores de expresión. En cualquiera de las realizaciones descritas en los dos párrafos anteriores, los vectores de expresión en los que se incorporan los casetes de expresión pueden ser vectores que se replican de forma autónoma o que se integran en el genoma de la célula huésped.

En diversas realizaciones ilustrativas, la proteína codificada por cualquiera de las secuencias codificantes heterólogas descritas en el presente documento unidas operativamente al promotor puede ser una proteína seleccionada del grupo que consiste en una toxina, un anticuerpo, una hormona, una enzima, un factor de crecimiento, una citocina, una proteína estructural, una proteína inmunogénica (por ejemplo, un antígeno de vacuna) y una proteína de señalización celular. En una realización, la proteína es una enzima para su uso en alimentación animal. En esta realización, la proteína puede seleccionarse del grupo que consiste en una fitasa, un mananasa, una galactosidasa, una amilasa, una glucanasa, una celulasa, una proteasa y una xilanasa. En otra realización, la proteína puede ser una enzima útil para la glicosilación. En otro aspecto, se puede expresar más de una proteína mediante el uso de casetes de expresión múltiples, cada uno con una secuencia codificante heteróloga, operativamente unida a un promotor. Sin embargo, estos ejemplos de proteínas no son limitantes y cualquier proteína o péptido o polipéptido capaz de expresarse en levaduras puede expresarse de acuerdo con los ácidos nucleicos aislados, vectores de expresión, células hospedadoras, construcciones de ADN, métodos y proteínas aisladas descritos en el presente documento. Las enzimas descritas anteriormente pueden ser de cualquier especie (por ejemplo, especies de hongos, tales como una especie de levadura).

Las proteínas expresadas en levadura para su uso de acuerdo con la presente invención pueden producirse en forma purificada por técnicas convencionales. Como se usa en el presente documento, "proteína aislada" significa una proteína purificada. Una proteína purificada está sustancialmente libre de otros contaminantes de células de levadura o contaminantes del medio de cultivo. Por ejemplo, "sustancialmente libre" de otros contaminantes de células de levadura o contaminantes del medio de cultivo significa que la proteína es al menos aproximadamente un 60 % pura, al menos aproximadamente el 70 % pura, al menos aproximadamente el 80 % pura, al menos aproximadamente el 90 % pura, al menos aproximadamente el 95 % pura, al menos aproximadamente el 98 % pura, aproximadamente el 60 % pura, aproximadamente el 70 % pura, aproximadamente el 80 % pura, aproximadamente el 90 % pura, aproximadamente el 95 % pura o aproximadamente el 98 % aproximadamente (todo basado en peso seco). Típicamente, la proteína se secreta en el medio de cultivo de levadura y se recoge del medio de cultivo.

En una realización ilustrativa, para la purificación del medio de cultivo la proteína puede, por ejemplo, someterse a precipitación con sulfato de amonio seguido de cromatografía en columna de DEAE-Sefarosa. En otras realizaciones, pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia tales como precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción de ácido, filtración en gel, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en columna de DEAE-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de lectina, cromatografía de afinidad, extracción disolvente-disolvente, ultrafiltración y HPLC.

Como alternativa, las etapas de purificación pueden no requerirse porque la proteína puede estar presente en concentraciones tan altas en el medio de cultivo que la proteína es esencialmente pura en el medio de cultivo (por ejemplo, del 70 al 80 % pura). En una realización, la proteína se recoge del medio de cultivo sin etapas de purificación adicionales enfriando el cultivo de levadura (por ejemplo, a aproximadamente 4 °C a aproximadamente 8 °C) y eliminando las células de levadura utilizando técnicas tales como la centrifugación, microfiltración y filtración por vacío rotativo. La proteína en el medio libre de células puede después concentrarse mediante técnicas tales como, por ejemplo, ultrafiltración y filtración por flujo tangencial.

En algunas realizaciones donde la proteína no se secreta en el medio de cultivo, las células de levadura pueden lisarse, por ejemplo, sometiendo a ultrasonidos, por calor o tratamiento químico, y el homogeneizado puede

centrifugarse para retirar los residuos celulares. El sobrenadante puede después someterse a precipitación con sulfato de amonio y técnicas de fraccionamiento adicionales, según sea necesario, tales como la filtración de gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en columna de DEAE-Sefarosa, cromatografía de afinidad, extracción disolvente-disolvente, ultrafiltración y HPLC para purificar la proteína. Debe entenderse que los métodos de purificación descritos anteriormente para la purificación de proteínas del medio de cultivo o de células de levadura lisadas no son limitantes y cualquier técnica de purificación conocida por los expertos en la técnica puede usarse para purificar la proteína expresada en levadura si se requieren tales técnicas para obtener una proteína sustancialmente pura.

Pueden prepararse diversas formulaciones de las preparaciones de proteínas purificadas de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, las proteínas pueden estabilizarse mediante la adición de otras proteínas (por ejemplo, gelatina y leche en polvo descremada), agentes químicos (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol, EDTA, sorbato de potasio, benzoato de sodio y agentes reductores y aldehídos), polisacáridos, monosacáridos, lípidos (aceites vegetales hidrogenados) y similares. En una realización, las proteínas para añadir a los productos alimenticios o mezclas de alimentos para animales pueden secarse (por ejemplo, secado por pulverización, secado en tambor y liofilización) y formularse como polvos, gránulos, píldoras, bloques minerales, líquidos y geles a través de procesos conocidos. En una realización, pueden usarse agentes gelificantes tales como gelatina, alginato, colágeno, agar, pectina y carragenina.

En realizaciones alternativas, la expresión de la proteína puede ser para la expresión intracelular, tal como para la acción enzimática en la levadura en un proceso de biotransformación, o para mostrarla en la superficie de la célula de levadura. Para tales realizaciones, la proteína, expresada como se describe en el presente documento, no se purifica.

En diversas realizaciones, las proteínas descritas anteriormente se seleccionan del grupo que consiste en una toxina, un anticuerpo, una hormona, una enzima, un factor de crecimiento, una citocina, una proteína estructural, una proteína inmunogénica (por ejemplo, un antígeno de vacuna) y una proteína de señalización celular. En otra realización, las proteínas descritas anteriormente se seleccionan del grupo que consiste en un anticuerpo, una hormona, una enzima, un factor de crecimiento, una citocina, una proteína estructural, una proteína inmunogénica (por ejemplo, un antígeno de vacuna) y una proteína de señalización celular. En otra realización más la secuencia codificante para una proteína, un fragmento de la misma, una proteína de fusión (por ejemplo, una proteína quimérica) o un péptido, pueden usarse de acuerdo con la invención. En otra realización, puede expresarse una proteína modificada, tales como una proteína mutada o una proteína con aminoácidos no naturales.

En una realización, las toxinas pueden ser proteínas tales como, por ejemplo, toxina botulínica o verotoxina-1, y después de la preparación usando los métodos, ácidos nucleicos aislados, vectores de expresión, células hospedadoras y construcciones de ADN descritas en el presente documento, las toxinas se pueden modificar usando un agente de direccionamiento para que se dirijan específicamente a las células enfermas. En otro aspecto ilustrativo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, un anticuerpo que no está humanizado, un nanocuerpo o un fragmento de anticuerpo, tales como un fragmento Fab de un anticuerpo o un anticuerpo monocatenario. En otra realización, la hormona puede ser, por ejemplo, una gonadotropina, una hormona adrenocorticotrófica, una hormona de crecimiento, vasopresina, oxitocina, somatostatina, gastrina o leptina. En otra realización ilustrativa, el factor de crecimiento puede ser insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento vascular endotelial, eritropoyetina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, trombopoyetina o una proteína morfogénica ósea. En un aspecto, la citocina puede ser IL-2, IFN-α, IFN-γ o GM-CSF. En una realización, la proteína no es una toxina de seda. En otro aspecto ilustrativo, las proteínas de la vacuna pueden ser cualquier proteína de vacuna adecuada que sea inmunogénica en un paciente o un animal, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas del VPH (por ejemplo, VPH 16 y VPH 18) y proteínas de la vacuna contra el tétanos, como ejemplos. En otra realización ilustrativa, las enzimas pueden ser, por ejemplo, enzimas para alimentos de animales como se analiza en el presente documento, acetilcolinesterasa o ciclooxigenasa, o cualquier otra enzima útil que pueda expresarse en levaduras. En otra realización, pueden expresarse proteínas estructurales, por ejemplo, netrinas, proteínas de unión a la actina o miosina y, en otra realización, proteínas de señalización celular tales como las proteínas *ras*, quinasas, la proteína ErbB2 (el receptor Her-2) puede expresarse usando los métodos, ácidos nucleicos aislados, vectores de expresión, células hospedadoras y construcciones de ADN descritas en el presente documento.

En una realización, la proteína es una enzima para su uso en alimentación animal. En esta realización, la proteína puede seleccionarse del grupo que consiste en una fitasa, un mananasa, una galactosidasa, una amilasa, una glucanasa, una celulasa, una proteasa y una xilanasa o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se puede expresar una diversidad de fitasas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Son ejemplos de genes de fitasa (es decir, una secuencia codificante de fitasa) que pueden expresarse de acuerdo con la invención los genes de fitasa derivados de bacterias, hongos filamentosos, plantas y levaduras, tales como los genes *appA* (número de registro de Gene Bank M58708) y *appA2* (número de registro de Gene Bank 250016) derivados de *Escherichia coli* y los genes *phyA* y *phyB* derivados del hongo *Aspergillus niger,* o cualquier mutante de estos genes que retiene o ha mejorado la actividad mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolasa (véase, por ejemplo, Rodriguez et al., Arch. of Biochem. and Biophys. 382: 105-112 (2000)). Los genes de alfa- y beta-galactosidasa

ejemplares son de especies de *Aspergillus* (por ejemplo, *Aspergillus alliaceus, Aspergillus orzae, Aspergillus nidulans, Aspergillus parasiticus,* y *Aspergillus niger).* Los genes de fitasa sustituidos, eliminados y truncados, o un fragmento de los mismos, también puede expresarse de acuerdo con la invención.

En una realización, la proteína expresada usando los métodos descritos en el presente documento puede usarse en alimentos para animales que comprenden una mezcla de alimentos para animales. En diversas realizaciones, puede usarse cualquier mezcla de alimento para animales conocida en la técnica tales como harina de colza, harina de semilla de algodón, harina de soja y harina de maíz. Los ingredientes opcionales de la mezcla de alimento para animales incluyen azúcares y carbohidratos complejos tales como monosacáridos, disacáridos y polisacáridos hidrosolubles e insolubles en agua. Los ingredientes de aminoácidos opcionales que pueden añadirse a la mezcla del alimento son arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, tirosina etilo HCl, alanina, ácido aspártico, glutamato de sodio, glicina, prolina, serina, cisteína etilo HCl y análogos y sales de los mismos. Las vitaminas que pueden añadirse opcionalmente son tiamina HCl, riboflavina, piridoxina HCl, niacina, niacinamida, inositol, cloruro de colina, pantotenato de calcio, biotina, ácido fólico, ácido ascórbico y vitaminas A, B, K, D, E y similares. Minerales, ingredientes proteicos, incluyendo la proteína obtenida de la harina de carne o harina de pescado, huevo líquido o en polvo, solubles de pescado, proteína de suero concentrada, aceites (por ejemplo, aceite de soja), almidón de maíz, calcio, fosfato inorgánico, sulfato de cobre, sal y caliza pueden añadirse también. También pueden añadirse antioxidantes.

En otra divulgación, se proporciona un kit que comprende un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 2, o un fragmento de las mismas. En una divulgación ilustrativa, el ácido nucleico aislado o el fragmento, puede ser el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntico al ácido nucleico aislado de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 2, o al fragmento de la misma. En diversas realizaciones ilustrativas, el fragmento puede tener aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, aproximadamente 400 nucleótidos de longitud, aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, aproximadamente 700 nucleótidos de longitud, aproximadamente 800 nucleótidos de longitud o aproximadamente 900 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones y divulgaciones el fragmento puede extenderse aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos o aproximadamente 900 nucleótidos en dirección 5' desde el extremo 3' del ácido nucleico aislado de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 2. En otras realizaciones y divulgaciones más el fragmento puede incluir aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos o aproximadamente 350 nucleótidos en sentido ascendente y/o descendente de la secuencia de la caja TATA encontrada en cada una de las SEQ ID NO: 1 a 2.

En una divulgación, el vector de expresión (es decir, con el promotor heterólogo) incluido en el kit puede tener cualquiera de los otros elementos descritos en el presente documento, tales como un marcador de selección, un sitio de clonación, tales como un sitio de clonación múltiple, un potenciador, una secuencia de terminación, una secuencia de péptido señal y similares. En otro aspecto, el vector de expresión puede ser un vector que se replica de forma autónoma o se integra en el genoma de la célula hospedadora. En otra realización, el vector de expresión puede circularizarse o linealizarse (es decir, digerirse con una enzima de restricción para que un gen de interés pueda clonarse fácilmente en el vector de expresión). En otra divulgación, el kit puede incluir un vector de expresión y un ORF de control que codifica un marcador o un gen de control para la expresión (por ejemplo, un ORF que codifica un fragmento LacZ-α) para su uso como control para mostrar que el vector de expresión es competente a ligación y para usarse con un gen de interés.

En otra divulgación ilustrativa, el kit puede contener un tubo que contiene un plásmido de expresión circular. En otra divulgación, el kit puede contener un tubo con un vector de expresión lineal que se digiere con una enzima de restricción para que esté listo para clonar un gen de interés. En una divulgación, el tubo puede estar esterilizado. En cualquiera de estas divulgaciones, el kit también puede incluir un vector de expresión circular o lineal y un ORF de control que codifica un marcador o un gen de control para la expresión (por ejemplo, un ORF que codifica un fragmento de LacZ-α) para su uso como control para mostrar que el vector de expresión se puede ligar con un gen de interés y/o para mostrar que la célula hospedadora es competente para la transformación.

En otra divulgación más, el kit puede contener múltiples vectores de expresión diferentes. En otra divulgación, los múltiples vectores de expresión diferentes pueden contener el mismo promotor, pero diferentes marcadores seleccionables, tales como los genes de resistencia a los fármacos G418, Nourseotricina (Nat), Zeocina, Blasticidina o Higromicina. En esta divulgación, el kit también puede contener alícuotas de los fármacos (por ejemplo, G418, Nourseotricina (Nat), Zeocina, Blasticidina o Higromicina) en tubos u otros recipientes, separados de los vectores correspondientes.

En cualquiera de las divulgaciones del kit descritas anteriormente, el ácido nucleico aislado puede consistir en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 2 o un fragmento de las mismas. La frase "consiste en" significa que la secuencia especificada por la SEQ ID NO: no tiene secuencias de nucleótidos adicionales distintas de las que corresponden a

la SEQ ID NO:.

En otra divulgación ilustrativa, el kit puede incluir otros componentes para su uso con el vector de expresión, tales como componentes para la transformación de células de levadura, enzimas de restricción para incorporar una secuencia codificante de proteínas de interés en el vector de expresión, ligasas, componentes para la purificación de construcciones de vectores de expresión, tampones (por ejemplo, un tampón de ligadura), instrucciones para su uso (por ejemplo, para facilitar la clonación) y cualquier otro componente adecuado para su uso en un kit para fabricar y usar los vectores de expresión descritos en el presente documento. En otra divulgación, el vector de expresión o cualquier otro componente del kit puede incluirse en el kit en un tubo sellado (por ejemplo, esterilizado o no esterilizado) o en cualquier otro recipiente o envase adecuado (por ejemplo, esterilizado o no esterilizado). Los kits descritos en los párrafos anteriores que incluyen el vector de expresión comprenden el vector de expresión que comprende un promotor descrito en el presente documento unido operativamente al vector que es heterólogo al promotor (es decir, la combinación no se produce en la naturaleza).

Los siguientes ejemplos proporcionan métodos ilustrativos para llevar a cabo la práctica de la presente invención. Como tales, estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de secuencias promotoras y plásmidos que contienen promotores

Se crearon "chips" de micromatrices para medir los niveles de ARN de *Pichia pastoris* por Affymetrix (Affymetrix, Inc.) usando secuencia de ADN genómico de *Pichia* proporcionada por el Dr. James Cregg. Los chips de micromatrices se sondaron con muestras de ARN de cultivos de levadura cultivados en diferentes fuentes de carbono, incluyendo metanol, glicerol y etanol. Los cultivos se recogieron en diversos puntos de tiempo en la fase media log y se congelaron para el posterior aislamiento del ARN según lo recomendado por Affymetrix. Se siguieron los protocolos convencionales de Affymetrix para sondar micromatrices Affymetrix.

El ARN total de cada muestra de células se extrajo mediante un método de rotura de perlas de vidrio/extracción con fenol/liCl. El ARN se convirtió en ADNc y, posteriormente, se amplificó y se marcó para sondar chips Affymetrix. Los ADNc etiquetados se hibridaron a chips de microarrays de *Pichia pastoris* Affymetrix y se evaluaron utilizando el software Affymetrix. El análisis de los datos identificó los genes inducidos por el metanol (en relación con el glicerol) o los genes expresados en la mayoría de las condiciones (es decir, expresados de forma constitutiva) como se muestra en la Tabla 1.

La Tabla 1 enumera los niveles relativos de ARNm de los genes indicados que comparan la actividad del promotor de las células de *Pichia pastoris* cultivadas en medios con metanol, glicerol o etanol como la fuente de carbono.

Tabla 1. Actividad relativa de los promotores

Proteína	Gen	Actividad de Promotor Relativa			
		Metanol	Inanición de MeOH	Glicerol	Etanol
Proteína hipotética	UPP	9942	8297	9512	10673
Factor de Alargamiento de Traducción de Proteínas 1A	TEF2	8910	5626	9309	9471
Proteína hipotética	Chr1-0469	6904	192	7673	7618
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	GAP	5685	4688	6701	6069
AOX1 Promedio	AOX1	9127	4974	610	361
Dihidroxi-acetona sintasa	DAS	8533	2591	1211	796

La Figura 6 muestra la actividad promotora relativa para pUPP, TEF2, Chr1-0469, GAP, AOX1 y DAS usando las fuentes de carbono metanol (la barra más a la izquierda en cada conjunto de barras), inanición de metanol (barra segunda desde la izquierda en cada conjunto de barras), glicerol (barra tercera desde la izquierda en cada conjunto de barras) y etanol (barra de la derecha en cada conjunto de barras). Las proteínas hipotéticas son los ORF para los promotores UPP y Chr1-0469.

Los promotores de dos genes expresados constitutivamente se clonaron y se probaron con vectores indicadores. Todos los plásmidos indicadores carecían de elementos promotores para dirigir la expresión del ORF indicador; como alternativa, se puso en su lugar un esquema de clonación que utiliza enzimas de restricción Tipo II (es decir, BsaI) para introducir fragmentos de ADN (promotores) en dirección 5' del ORF. Todas las construcciones contenían la misma secuencia del terminador transcripcional 3'AOX1 después del codón de parada del ORF indicador.

Un plásmido indicador, pTZ-GFP, es un derivado de pJAZ (resistencia a la zeocina como un marcador de selección) sin el promotor AOX1, pero con un ORF de proteína fluorescente verde (GFP) como un gen indicador para la

expresión intracelular. Un segundo grupo de plásmidos indicadores contiene genes marcadores seleccionables para la resistencia a zeocina o G418 y los ORF de alfa-galactosidasa o beta-galactosidasa de *Aspergillus* como indicadores para la expresión intracelular. El tercer grupo de plásmidos indicadores tiene la señal del factor de cruzamiento pre-pro-alfa (aMF) de *S. cerevisiae* para la secreción fusionada en marco con la secuencia de codificación de appA2 de *E. coli* para la fosfatasa (fitasa), como el ORF indicador. Ninguna de las secuencias de plásmidos indicadores se expresa en *Pichia pastoris* sin la introducción de una secuencia que tenga actividad promotora en dirección 5' del ORF indicador.

Dos de los promotores constitutivos más activos, de los genes UPP y Chr1-0469, consistieron en el ADN ~ 1000 pb "en dirección 5'" de ORF de función desconocida. Estas secuencias promotoras se amplificaron utilizando cebadores de PCR y ADN genómico de *Pichia pastoris*. Se confirmó la secuencia de los productos de la PCR, antes de la ligadura en plásmidos indicadores. El promotor UPP se clonó usando sitios BsaI colocados estratégicamente en los cebadores que flanquean al promotor. El promotor Chr1-0469 contiene sitios de reconocimiento para BsaI y BsmBI; por lo tanto, los extremos de clonación se crearon mediante un procedimiento de desnaturalización-hibridación por PCR. En resumen, el promotor se amplificó con dos conjuntos de cebadores. Los productos de la PCR representan dos moléculas de ADN bicatenario casi idénticas excepto que los extremos están desplazados en 4 pb (uno es cuatro nucleótidos más cortos desde el extremo 5' y cuatro nucleótidos más largos desde el extremo 3' y los otros cuatro nucleótidos más largos del extremo 5' y cuatro nucleótidos más cortos del extremo 3'). Los dos productos diferentes de PCR se mezclan, se desnaturalizan y se hibridan para crear moléculas promotoras con las extensiones monocatenarias de 4 bases adecuadas en cada extremo de la molécula (extremos "pegajosos" para facilitar la clonación). Los extremos de clonación, generados por digestión BsaI o por desnaturalización-hibridación de PCR, fueron complementarios a los fines creados en los plásmidos indicadores. Los promotores que regulan los genes AOX1 y GAP1 de *Pichia pastoris* se introdujeron en las mismas construcciones indicadoras que los controles.

Las construcciones de plásmidos específicas del promotor se linealizaron mediante digestión con enzimas de restricción específicas y se introdujeron en las células de *Pichia pastoris* de tipo silvestre mediante electroporación. Los transformantes que contenían el ADN plasmídico integrado en el genoma de la cepa hospedadora se seleccionaron en agar YPD con zeocina o G418. Se purificaron colonias individuales de la transformación (de nuevo en placas selectivas), después, se recogieron múltiples clones en placas maestras YPD. Estas placas maestras se replicaron en placas a una serie de placas de diagnóstico con medios de agar que contienen uno de los siguientes compuestos como la única fuente de carbono para el crecimiento de las células de *Pichia pastoris*: glucosa (es decir, dextrosa), glicerol, metanol o etanol (todo al 1 % p/v). Las placas se incubaron a 30 °C durante 20 a 44 horas antes de puntuar.

Ejemplo 2: Determinación de la expresión de GFP en transformantes

Se comparó el nivel relativo de expresión de GFP entre los diversos transformantes. En este ejemplo, las placas de réplica se expusieron a luz UV utilizando un transiluminador y la intensidad de fluorescencia de las diferentes cepas se comparó mediante visualización directa. Las células de *Pichia* sin expresión de GFP, colonias negativas, no demostraron fluorescencia de GFP bajo iluminación UV. La intensidad de la fluorescencia observada se correlacionó con un aumento en la expresión de GFP.

La Figura 5 es un ejemplo de la expresión de GFP para diversos transformantes en placas de réplica con diferentes fuentes de carbono. La ubicación de las diferentes cepas promotoras de *Pichia* en cada panel es la misma y el panel "YPD Maestro" identifica la ubicación de las cepas por su designación de promotor: AOX1, PUPP, GAP1, 0001, 0002, 0003, 0004, 0005, 0006, 0007 y Vector (control simulado). La parte inferior de la Figura 5, etiquetada como "Expresión de GFP inducida por Dex, Gly, MeOH o EtOH" muestra que la fuente de carbono usada en cada panel es dextrosa (D), glicerol (G), metanol (M) o etanol (E), respectivamente. Los datos muestran que el promotor UPP es tan fuerte o más fuerte que el promotor GAP en las condiciones probadas y es más fuerte que el promotor AOX en la mayoría de las condiciones probadas.

Ejemplo 3: Determinación de la actividad relativa de alfa y beta-galactosidasas de transformantes

El promotor UPP y las secuencias del promotor Chr1-0469 se amplificaron utilizando cebadores de PCR y ADN genómico de *Pichia pastoris* (las secuencias de los cebadores directos utilizados para la amplificación de los fragmentos del promotor se muestran en la FIGURA 8). Se confirmaron las secuencias de los productos de PCR, antes de la ligadura en el plásmido indicador alfa-GAL (FIGURA 7). Los promotores que regulan los ORF GAP, TEF2, DAS y AOX1 de *Pichia pastoris* se introdujeron en el mismo plásmido indicador que los controles. Las secuencias de los fragmentos del promotor insertado se confirmaron mediante la secuenciación de las inserciones completas, en ambas direcciones, usando cebadores específicos de plásmidos ubicados en dirección 5' del fragmento insertado (cebadores directos) y en la región 5' de la ORF de alfa-galactosidasa (cebadores inversos). Las construcciones de plásmidos específicas del promotor se linealizaron mediante digestión con enzimas de restricción específicas y se introdujeron en células de tipo salvaje de *Pichia pastoris* mediante electroporación y se seleccionaron los transformantes que contenían el ADN plasmídico integrado en el genoma de la cepa hospedadora. Las células de los transformantes de una sola colonia bien aislados se purificaron y se recogieron en una placa maestra de YPD y se incubaron a 30 °C. La placa maestra fue posteriormente replicada en placa en una serie de

placas de diagnóstico con medios de agar que contenían uno de los siguientes compuestos como la única fuente de carbono para el crecimiento de las células de *Pichia pastoris*: glucosa (es decir, dextrosa), glicerol, metanol o etanol (todo al 1 % p/v) y sustrato cromogénico alfa-X-Gal. Estas placas se incubaron a 30 °C durante 44 horas (FIGURA 9).

El nivel de expresión de las diferentes construcciones del gen indicador promotor-alfa-galactosidasa, se determinó mediante la observación de la alfa-galactosidasa de las placas de agar YPD hechas con tampón fosfato 100 mM, pH 6,5 y alfa-X-GAL como sustrato cromogénico. La actividad del indicador se detectó como un producto de color azul en o alrededor de las células. La actividad del indicador se demostró con los promotores UPP y Chrl-0469.

Las designaciones del promotor en la FIGURA 9 corresponden al promotor Chrl-0469 (SEQ ID NO: 1) y al promotor UPP (SEQ ID NO: 2). La longitud de cada fragmento del promotor se indica con la posición +1 igual a la A en el codón de inicio ATG del gen correspondiente en el genoma de *Pichia pastoris* (por lo tanto, las secuencias del promotor son de -1 a -1500). Se usan como controles fragmentos de otros promotores de *Pichia pastoris* así como un vector indicador sin ninguna secuencia promotora. Los transformantes se incubaron en placas de agar que contenían X-alfa-GAL, un sustrato cromogénico para la alfa-galactosidasa y una de las cuatro fuentes de carbono indicadas. Las placas A y B en la Figura 9, panel A, se colocaron en placas de réplica sobre diferentes fuentes de carbono en las placas A y B, respectivamente, mostrado en la Figura 9, paneles B y C, respectivamente. De esta manera, las designaciones en la Figura 9, el panel A de las placas A y B se refiere a la Figura 9, paneles B y C, respectivamente. Las observaciones de N.º 1 y N.º 2 se refieren a SEQ ID NO: 1 y 2 (es decir, al promotor utilizado para expresar α-galactosidasa). El nivel de expresión de α-galactosidasa con los promotores se muestra en las tablas etiquetadas como Placa A y Placa B a continuación en las diversas fuentes de carbono. El nivel de expresión de α-galactosidasa se muestra como 0, +1, +2, +3, +4 y +5, aumentando el nivel de expresión de 0 a +5.

De forma similar, la ORF de beta-galactosidasa se usó para el análisis de la expresión de las construcciones indicadoras con el promotor Chr1-0469 y las secuencias del promotor UPP en los transformantes de *Pichia pastoris*. En estos experimentos, el nivel de expresión del gen indicador de beta-galactosidasa se determinó en placas con beta-X-GAL como un sustrato cromogénico. La actividad del reportero con beta-galactosidasa ORF también se demostró con los promotores UPP y Chr1-0469.

Expresión relativa de alfa-galactosidasa, Placa A, de la Figura 9.

Promotor (SEQ ID/nombre)	Figura 9 (Panel/fila/columna)	Fuente de carbono	Expresión relativa de A-gal (1 - 5)
Control	A/C/1	Glucosa	0
Control	A/F/1	Glucosa	0
Control	A/E/2	Glucosa	0
UPP-513 (N.º 2)	A/F/5	Glucosa	4
UPP-354 (N.º 2)	A/G/1	Glucosa	4
DAS	A/G/2	Glucosa	0
1-0469 (N.º 1)	A/G/3	Glucosa	4
GAP	A/G/4	Glucosa	3
Control	A/C/1	Glicerol	0
Control	A/E/1	Glicerol	0
Control	A/E/2	Glicerol	0
UPP-513 (N.º 2)	A/F/5	Glicerol	3
UPP-354 (N.º 2)	A/G/1	Glicerol	4
DAS	A/G/2	Glicerol	0
1-0469 (N.º 1)	A/G/3	Glicerol	3
GAP	A/G/4	Glicerol	2
Control	A/C/1	Metanol	1
Control	A/E/1	Metanol	0
Control	A/E/2	Metanol	1
UPP-513 (N.º 2)	A/F/5	Metanol	3
UPP-354 (N.º 2)	A/G/1	Metanol	4
DAS	A/G/2	Metanol	2
1-0469 (N.º 1)	A/G/3	Metanol	3
GAP	A/G/4	Metanol	3
Control	A/C/1	Etanol	0
Control	A/E/1	Etanol	0
Control	A/E/2	Etanol	0

(continuación)

Promotor (SEQ ID/nombre)	Figura 9 (Panel/fila/columna)	Fuente de carbono	Expresión relativa de A-gal (1 - 5)
UPP-513 (N.º 2)	A/F/5	Etanol	3
UPP-354 (N.º 2)	A/G/1	Etanol	4
DAS	A/G/2	Etanol	0
1-0469 (N.º 1)	A/G/3	Etanol	3
GAP	A/G/4	Etanol	2

Expresión relativa de alfa-galactosidasa, Placa B, de la Figura 9

Promotor (SEQ ID/nombre)	Figura 9 (Panel/fila/columna)	Fuente de carbono	Expresión relativa de A-gal (1 - 5)
UPP-513 (N.º 2)	B/F/1	Glucosa	4
UPP-345 (N.º 2)	B/F/2	Glucosa	4
DAS	B/F/3	Glucosa	0
1-0469 (N.º 1)	B/F/4	Glucosa	3
GAP	B/F/5	Glucosa	4
UPP 222 (No: 2)	B/G/2	Glucosa	3
UPP-513 (N.º 2)	B/F/1	Glicerol	4
UPP-345 (N.º 2)	B/F/2	Glicerol	4
DAS	B/F/3	Glicerol	0
1-0469 (N.º 1)	B/F/4	Glicerol	3
GAP	B/F/5	Glicerol	4
UPP 222 (No: 2)	B/G/2	Glicerol	3
UPP-513 (N.º 2)	B/F/1	Metanol	5
UPP-345 (N.º 2)	B/F/2	Metanol	5
DAS	B/F/3	Metanol	3
1-0469 (N.º 1)	B/F/4	Metanol	3
GAP	B/F/5	Metanol	3
UPP 222 (No: 2)	B/G/2	Metanol	4
UPP-513 (N.º 2)	B/F/1	Etanol	4
UPP-345 (N.º 2)	B/F/2	Etanol	4
DAS	B/F/3	Etanol	0
1-0469 (N.º 1)	B/F/4	Etanol	3
GAP	B/F/5	Etanol	4
UPP 222 (No: 2)	B/G/2	Etanol	3

Ejemplo 4: Determinación de la actividad de fitasa de transformantes

El nivel de actividad de la fitasa se determinó en los diversos transformantes. El medio de agar en las placas se suplementó con tampón fosfato 100 mM, pH 6,5, y fitato de calcio. La actividad de la fitasa actúa para convertir la sustancia de fitato de calcio coloide no transparente en material transparente, formando un halo transparente alrededor de las colonias que expresan y secretan una fosfatasa (fitasa). Un aumento de la expresión de la fitasa por parte de las células da lugar a un aumento de la secreción de la enzima, como lo demuestra un halo más ancho observado alrededor de la colonia celular. La actividad del indicador se demostró con los promotores UPP y Chr1-0469 (FIGURA 10). En la figura 10, los transformantes que albergan secuencias promotoras GAP, el promotor Chr1-0469 (SEQ ID NO: 1) y el promotor UPP (SEQ ID NO: 2) se clonan en dirección 5' del ORF que consiste en el factor pre-pro alfa de *S. cerevisiae* fusionado en marco con el ADN que codifica la fitasa appA2 de *E. coli*. Las células se colocaron en manchas en placas de diagnóstico con fitato de calcio y glucosa o metanol y se incubaron durante 27 horas a 30 °C. El nivel de expresión de fitasa con los promotores se indica con 0, +1, +2, +3, +4 y +5, aumentando el nivel de expresión de 0 a +5. Los niveles relativos de expresión de fitasa se muestran en la tabla a continuación representando N.º 1 y N.º 2 la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente.

Tabla X.

Actividad fitasa relativa de la Figura 10		
Promotor (SEQ: ID)	Fuente de carbono	Actividad relativa 1 - 5 (5 es la actividad más alta)
GAP	glucosa	2
N.º 1	glucosa	2
N.º 2, c	glucosa	5
N.º 2, d	glucosa	5

(continuación)

Actividad fitasa relativa de la Figura 10		
Promotor (SEQ: ID)	Fuente de carbono	Actividad relativa 1 - 5 (5 es la actividad más alta)
N.º 2, e	glucosa	5
GAP	metanol	1
N.º 1	metanol	2
N.º 2, c	metanol	2
N.º 2, d	metanol	2
N.º 2, e	metanol	2

LISTADO DE SEQUENCIAS

<110> KECK GRADUATE INSTITUTE OF APPLIED LIFE SCIENCES

<120> PROMOTORES DE LEVADURA DE PICHIA PASTORIS

<130> 62472-229032

<140> PCT/US2014/022135
<141> 07-03-2014

<150> 61/774.982
<151> 08-03-2013

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1003
<212> ADN
<213> Pichia pastoris

<400> 1

tgccaggatc tgaccactac aagaagcgta attaagtatt tattatgtag cttgaggaat 60

tgatttctaa aggccaaaga tgatgtagag caatagtaga gtgattagca agtttctgaa 120

catgttttgt ggtcgggtat taggcgccgt acctctgtat ttttttttt tggcagatgg 180

gatgaccact gtgcttacat aattttcgat gggccctttt ggaaacgacc actccttccg 240

atcacgtaat actaggcgag tatcactacg cgtcggtatc cgcattttag ccgctttaac 300

gacaaggtca gggtaaatac tgtgttgcat gggcgatgcc gtaggatctg gccaacttgg 360

aacagagcag cccaccgcgt aggcagcgct tgggaccagt ttgttagcca atcagttccc 420

ccgtctgagt ccctacacgc tcaggcttgc atggatatgc atgaaaaatg tcaactcagt 480

cgcacacagg gatgctgttg tcgtggtgag aaaaagctaa aatagcaaac ccatagcaat 540

cgagagactg tgattggaag caaaagaacc aggcattgac taggaaagac tgacaagaaa 600

attagacggt gccagtggta tttcattgaa ttgcactgaa cacgcctccc atttccttcc 660

ctcaatccat tcaaagggct aattaaacct tatctcggcc tacattagtt gtcatggaaa 720

cgtctcactt tctctctgtg tcccacagta gcgagtaggc ggagagacca aaaatggtct 780

ctcggcccta atcaaaacat cctttgtcgc gttgttttca gatcgattcg caatctgaga 840

gaaaaacaat aacaccaaaa taaaaagctt ggaaaaagaa gacatgattc acatccacta 900

gtaaaatata aatactcctg ccgcctcccc ctttcctttc ttcttattcc tcaactcact 960

gtttcagttt attccaacta ctttcactca cttatcaaaa atg 1003

<210> 2
<211> 773
<212> ADN
<213> Pichia pastoris

<400> 2

gggtgaaagc caaccatctt tgtttcgggg aaccgtgctc gccccgtaaa gttaattttt 60

ttttcccgcg cagctttaat ctttcggcag agaaggcgtt ttcatcgtag cgtgggaaca 120

gaataatcag ttcatgtgct atacaggcac atggcagcag tcactatttt gctttttaac 180

cttaaagtcg ttcatcaatc attaactgac caatcagatt ttttgcattt gccacttatc 240

taaaaatact tttgtatctc gcagatacgt tcagtggttt ccaggacaac acccaaaaaa 300

aggtatcaat gccactaggc agtcggtttt atttttggtc acccacgcaa agaagcaccc 360

acctctttta ggttttaagt tgtgggaaca gtaacaccgc ctagagcttc aggaaaaacc 420

agtacctgtg accgcaattc accatgatgc agaatgttaa tttaaacgag tgccaaatca 480

agatttcaac agacaaatca atcgatccat agttacccat tccagccttt tcgtcgtcga 540

gcctgcttca ttcctgcctc aggtgcataa ctttgcatga aaagtccaga ttagggcaga 600

ttttgagttt aaaataggaa atataaacaa atataccgcg aaaaaggttt gtttatagct 660

tttcgcctgg tgccgtacgg tataaataca tactctcctc ccccccctgg ttctcttttt 720

cttttgttac ttacatttta ccgttccgtc actcgcttca ctcaacaaca aaa 773

<210> 3
<211> 939
<212> ADN
<213> Pichia pastoris

<400> 3

```
gatctaacat ccaaagacga aaggttgaat gaaacctttt tgccatccga catccacagg      60
tccattctca cacataagtg ccaaacgcaa caggagggga tacactagca gcagaccgtt     120
gcaaacgcag gacctccact cctcttctcc tcaacaccca cttttgccat cgaaaaacca     180
gcccagttat tgggcttgat tggagctcgc tcattccaat tccttctatt aggctactaa     240
caccatgact ttattagcct gtctatcctg gccccctgg cgaggttcat gtttgtttat      300
ttccgaatgc aacaagctcc gcattacacc cgaacatcac tccagatgag ggctttctga     360
gtgtggggtc aaatagtttc atgttcccca aatggcccaa aactgacagt ttaaacgctg     420
tcttggaacc taatatgaca aaagcgtgat ctcatccaag atgaactaag tttggttcgt     480
tgaaatgcta acggccagtt ggtcaaaaag aaacttccaa aagtcggcat accgtttgtc     540
ttgtttggta ttgattgacg aatgctcaaa aataatctca ttaatgctta gcgcagtctc     600
tctatcgctt ctgaaccccg gtgcacctgt gccgaaacgc aaatggggaa acacccgctt     660
tttggatgat tatgcattgt ctccacattg tatgcttcca agattctggt gggaatactg     720
ctgatagcct aacgttcatg atcaaaattt aactgttcta acccctactt gacagcaata     780
tataaacaga aggaagctgc cctgtcttaa acctttttt ttatcatcat tattagctta      840
ctttcataat tgcgactggt tccaattgac aagcttttga ttttaacgac ttttaacgac     900
aacttgagaa gatcaaaaaa caactaatta ttcgaaacg                            939
```

<210> 4
<211> 1001
<212> ADN
<213> Pichia pastoris

<400> 4

```
catgttggta ttgtgaaata gacgcagatc gggaacactg aaaaataaca gttattattc      60
gagatctaac atccaaagac gaaaggttga atgaaacctt tttgccatcc gacatccaca     120
ggtccattct cacacataag tgccaaacgc aacaggaggg gatacactag cagcagaccg     180
ttgcaaacgc aggacctcca ctcctcttct cctcaacacc cacttttgcc atcgaaaaac     240
cagcccagtt attgggcttg attggagctc gctcattcca attccttcta ttaggctact     300
aacaccatga ctttattagc ctgtctatcc tggcccccct ggcgaggttc atgtttgttt     360
atttccgaat gcaacaagct ccgcattaca cccgaacatc actccagatg agggctttct     420
gagtgtgggg tcaaatagtt tcatgttccc caaatggccc aaaactgaca gtttaaacgc     480
tgtcttggaa cctaatatga caaaagcgtg atctcatcca agatgaacta agtttggttc     540
gttgaaatgc taacggccag ttggtcaaaa agaaacttcc aaaagtcggc ataccgtttg     600
tcttgtttgg tattgattga cgaatgctca aaaataatct cattaatgct tagcgcagtc     660
tctctatcgc ttctgaaccc cggtgcacct gtgccgaaac gcaaatgggg aaacacccgc     720
tttttggatg attatgcatt gtctccacat tgtatgcttc caagattctg gtgggaatac     780
tgctgatagc ctaacgttca tgatcaaaat ttaactgttc taacccctac ttgacagcaa     840
tatataaaca gaaggaagct gccctgtctt aaacctttt ttttatcatc attattagct      900
tactttcata attgcgactg gttccaattg acaagctttt gattttaacg acttttaacg     960
acaacttgag aagatcaaaa aacaactaat tattcgaaac g                        1001
```

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 5
atccctacac gctcaggctt 20

<210> 6
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 6
nnnggtctcn atcctcgctg ggtgaaagcc aac 33

<210> 7
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 7
nnnggtctcn atccgcagat acgttcagtg gtttcc 36

<210> 8
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 8
nnnggtctcn atccagtacc tgtgaccgca attc 34

<210> 9
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 9
nnnggtctcn atcctgcctc aggtgcataa ctt 33

<210> 10
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 10
nnnggtctcn atccaatgga ccaaattgtt gcaaggt 37

<210> 11
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 11
nnnggtctcc atccctttgt tgagcaaca 29

<210> 12
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 12
nnnggtctcg atccgcccaa acgaacag 28

<210> 13
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 13
nnnggtctcc atccaaagac gaaaggttga atga 34

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado en donde el ácido nucleico aislado comprende una secuencia al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o al menos el 90 % idéntica a un fragmento de la misma, en donde dicha secuencia al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o al menos el 90 % idéntica a un fragmento de la misma exhibe actividad promotora, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de un promotor constitutivo de *Pichia pastoris* y en donde el ácido nucleico aislado está unido operativamente a una secuencia codificante heteróloga.

2. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1 en donde la secuencia del ácido nucleico aislado es la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma.

3. El ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la secuencia es la SEQ ID NO: 2.

4. El ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la secuencia codificante heteróloga codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en una toxina, un anticuerpo, una hormona, una enzima, un factor de crecimiento, una citocina, una proteína estructural, una proteína inmunogénica y una proteína de señalización celular.

5. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 4, en donde la proteína es una enzima para su uso en alimentación animal.

6. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 5, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en una mananasa, una amilasa, una glucanasa, una proteasa, una celulasa y una xilanasa.

7. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 5, en donde la proteína es una fitasa.

8. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 5, en donde la proteína es una galactosidasa.

9. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el vector de expresión de la reivindicación 9.

11. La célula hospedadora de la reivindicación 10, en donde la célula hospedadora es una especie de *Pichia*.

12. La célula hospedadora de la reivindicación 11, en donde la especie de *Pichia* es *Pichia pastoris*.

13. La célula hospedadora de la reivindicación 10, en donde la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en especies de *Hansenula*, especies de *Pichia*, especies de *Saccharomyces*, especies de *Yarrowia*, especies de *Candida*, especies de *Schizosaccharomyces*, especies de *Torulaspora* y especies de *Kluveromyces*.

14. Un método para producir una proteína, comprendiendo el método la etapa de cultivar en un medio de cultivo una célula hospedadora que comprende un primer casete de expresión que comprende un ácido nucleico aislado de SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, unido operativamente a una secuencia codificante heteróloga que codifica una proteína,
en donde el cultivo se realiza en condiciones que permiten la expresión de la proteína;
en donde la proteína se expresa usando el primer casete de expresión en combinación con un segundo casete de expresión, comprendiendo dicho segundo casete

(a) la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína unida operativamente a un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, en donde la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 tienen actividad promotora; o
(b) el ácido nucleico aislado de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, unido operativamente a la secuencia codificante heteróloga que codifica la proteína.

SECUENCIA DEL PROMOTOR Chr1-0469 (SEQ ID NO: 1)

TGCCAGGATCTGACCACTACAAGAAGCGTAATTAAGTATTTATTATGTAGCTT
GAGGAATTGATTTCTAAAGGCCAAAGATGATGTAGAGCAATAGTAGAGTGAT
TAGCAAGTTTCTGAACATGTTTTGTGGTCGGGTATTAGGCGCCGTACCTCTGT
ATTTTTTTTTTTTGGCAGATGGGATGACCACTGTGCTTACATAATTTTCGATGG
GCCCTTTTGGAAACGACCACTCCTTCCGATCACGTAATACTAGGCGAGTATCA
CTACGCGTCGGTATCCGCATTTTAGCCGCTTTAACGACAAGGTCAGGGTAAAT
ACTGTGTTGCATGGGCGATGCCGTAGGATCTGGCCAACTTGGAACAGAGCAG
CCCACCGCGTAGGCAGCGCTTGGGACCAGTTTGTTAGCCAATCAGTTCCCCC
GTCTGAGTCCCTACACGCTCAGGCTTGCATGGATATGCATGAAAAATGTCAA
CTCAGTCGCACACAGGGATGCTGTTGTCGTGGTGAGAAAAAGCTAAAATAGC
AAACCCATAGCAATCGAGAGACTGTGATTGGAAGCAAAAGAACCAGGCATT
GACTAGGAAAGACTGACAAGAAAATTAGACGGTGCCAGTGGTATTTCATTGA
ATTGCACTGAACACGCCTCCCATTTCCTTCCCTCAATCCATTCAAAGGGCTAA
TTAAACCTTATCTCGGCCTACATTAGTTGTCATGGAAACGTCTCACTTTCTCTC
TGTGTCCCACAGTAGCGAGTAGGCGGAGAGACCAAAAATGGTCTCTCGGCCC
TAATCAAAACATCCTTTGTCGCGTTGTTTTCAGATCGATTCGCAATCTGAGAG
AAAAACAATAACACCAAAATAAAAAGCTTGGAAAAAGAAGACATGATTCAC
ATCCACTAGTAAAATATAAATACTCCTGCCGCCTCCCCCTTTCCTTTCTTCTTA
TTCCTCAACTCACTGTTTCAGTTTATTCCAACTACTTTCACTCACTTATCAAAA
ATG

FIG. 1

SECUENCIA DEL PROMOTOR UPP (SEQ ID NO: 2)

GGGTGAAAGCCAACCATCTTTGTTTCGGGGAACCGTGCTCGCCCCGTAAAGTTAA
TTTTTTTTTCCCGCGCAGCTTTAATCTTTCGGCAGAGAAGGCGTTTTCATCGTAGC
GTGGGAACAGAATAATCAGTTCATGTGCTATACAGGCACATGGCAGCAGTCACT
ATTTTGCTTTTTAACCTTAAAGTCGTTCATCAATCATTAACTGACCAATCAGATTT
TTTGCATTTGCCACTTATCTAAAAATACTTTTGTATCTCGCAGATACGTTCAGTGG
TTTCCAGGACAACACCCAAAAAAAGGTATCAATGCCACTAGGCAGTCGGTTTTAT
TTTTGGTCACCCACGCAAAGAAGCACCCACCTCTTTTAGGTTTTAAGTTGTGGGA
ACAGTAACACCGCCTAGAGCTTCAGGAAAAACCAGTACCTGTGACCGCAATTCA
CCATGATGCAGAATGTTAATTTAAACGAGTGCCAAATCAAGATTTCAACAGACA
AATCAATCGATCCATAGTTACCCATTCCAGCCTTTTCGTCGTCGAGCCTGCTTCAT
TCCTGCCTCAGGTGCATAACTTTGCATGAAAAGTCCAGATTAGGGCAGATTTTGA
GTTTAAAATAGGAAATATAAACAAATATACCGCGAAAAAGGTTTGTTTATAGCTT
TTCGCCTGGTGCCGTACGGTATAAATACATACTCTCCTCCCCCCCCTGGTTCTCTT
TTTCTTTTGTTACTTACATTTTACCGTTCCGTCACTCGCTTCACTCAACAACAAAA

FIG. 2

SECUENCIA DEL PROMOTOR AOX1 (SEQ ID NO: 3)

GATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCC
ACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGC
AGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTT
TGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAA
TTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCC
CCTGGCGAGGTTCATGTTTGTTTATTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACC
CGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTT
CCCCAAATGGCCCAAAACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGACA
AAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGC
CAGTTGGTCAAAAAGAAACTTCCAAAAGTCGGCATACCGTTTGTCTTGTTTGGTA
TTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTAT
CGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCT
TTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAA
TACTGCTGATAGCCTAACGTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTG
ACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCA
TCATTATTAGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATT
TTAACGACTTTTAACGACAACTTGAGAAGATCAAAAAACAACTAATTATTCGAA
ACG

FIG. 3

SECUENCIA GENÓMICA, 1000 PB EN DIRECCIÓN 5' DEL ATG DEL PROMOTOR AOX1 (SEQ ID NO: 4)

CATGTTGGTATTGTGAAATAGACGCAGATCGGGAACACTGAAAAATAACAGTTA
TTATTCGAGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATC
CGACATCCACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGAT
ACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACA
CCCACTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCT
CATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATC
CTGGCCCCCCTGGCGAGGTTCATGTTTGTTTATTTCCGAATGCAACAAGCTCCGC
ATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGT
TTCATGTTCCCCAAATGGCCCAAAACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTA
ATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATG
CTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAAACTTCCAAAAGTCGGCATACCGTTTGTCTT
GTTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAATGCTTAGCGCAGT
CTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAAC
ACCCGCTTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTG
GTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACC
CCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTT
TTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGC
TTTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAACTTGAGAAGATCAAAAAACAACTAATT
ATTCGAAACG

FIG. 4

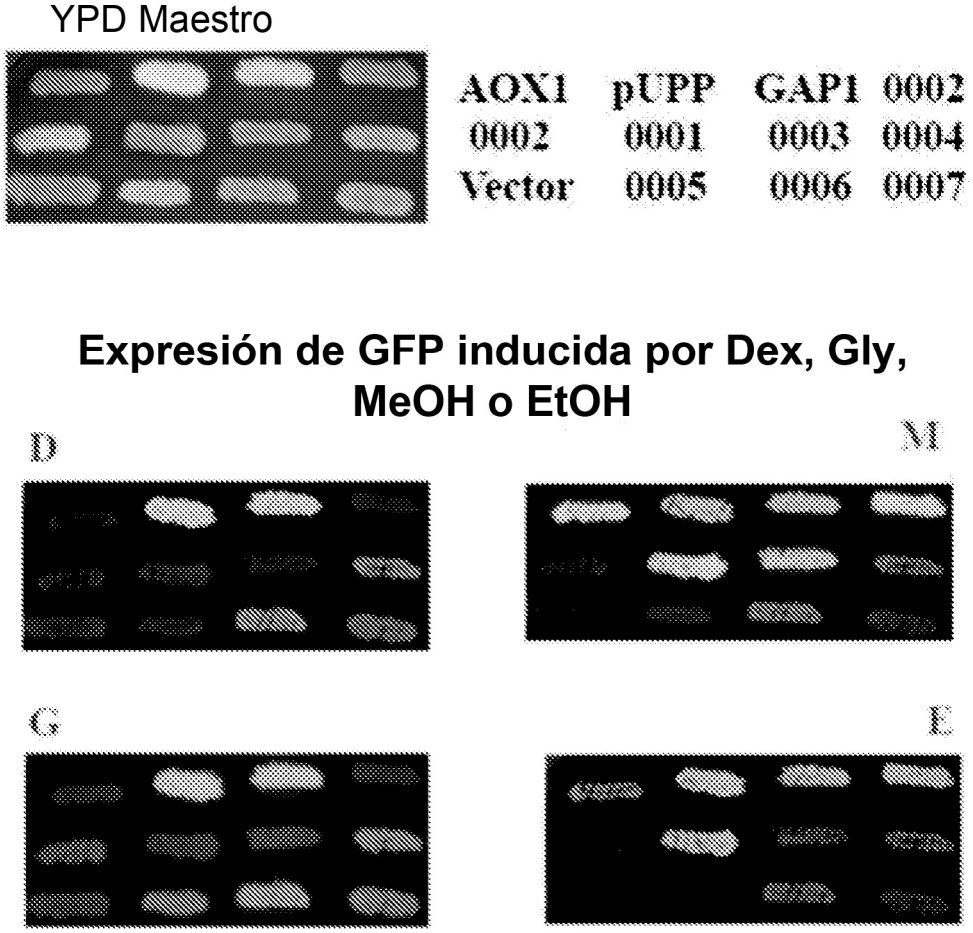
YPD Maestro
AOX1 pUPP GAP1 0002
0002 0001 0003 0004
Vector 0005 0006 0007
Expresión de GFP inducida por Dex, Gly, MeOH o EtOH
D
M
G
E

FIG. 5

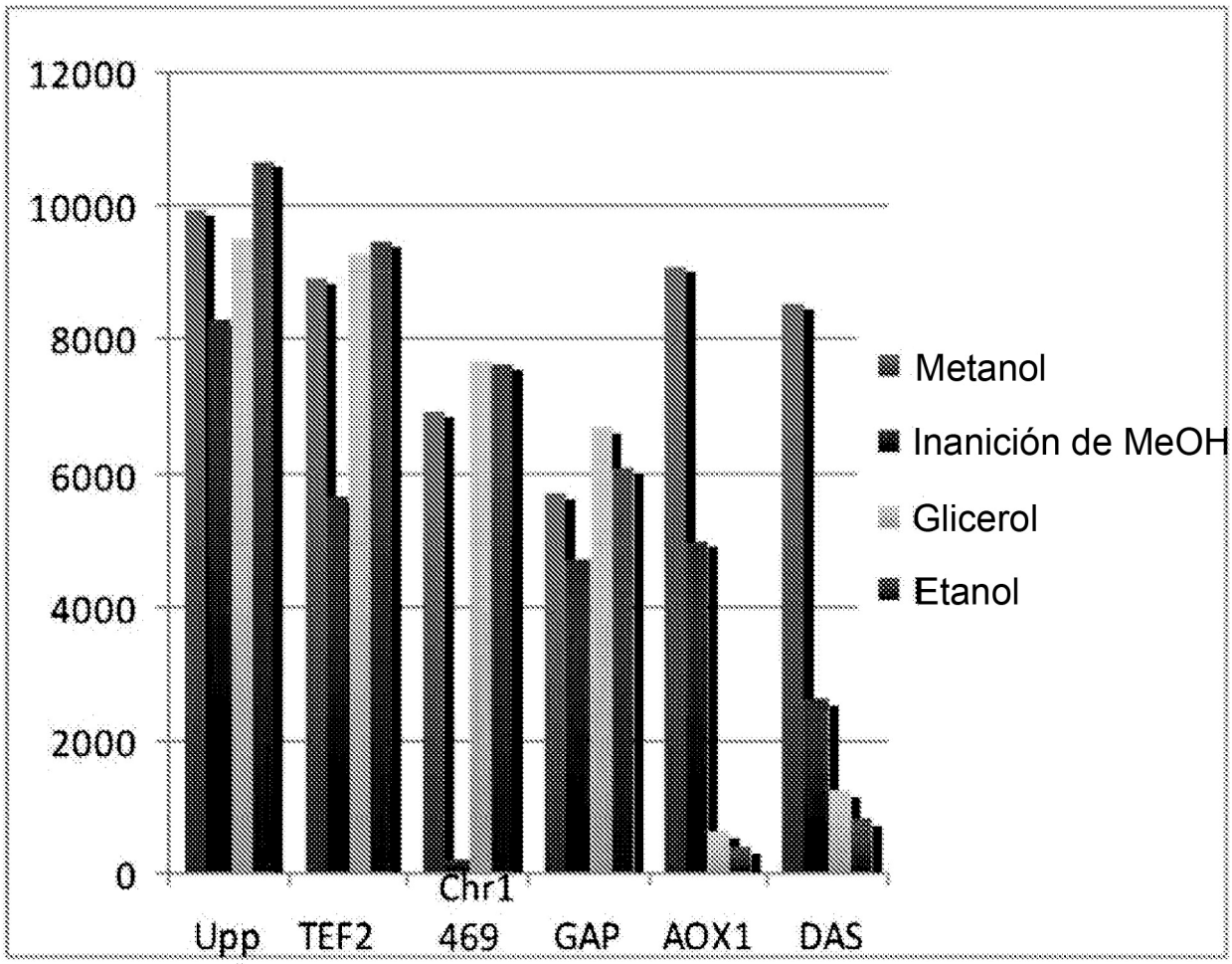
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Upp
TEF2
Chr1
469
GAP
AOX1
DAS
Metanol
Inanición de MeOH
Glicerol
Etanol

FIG. 6

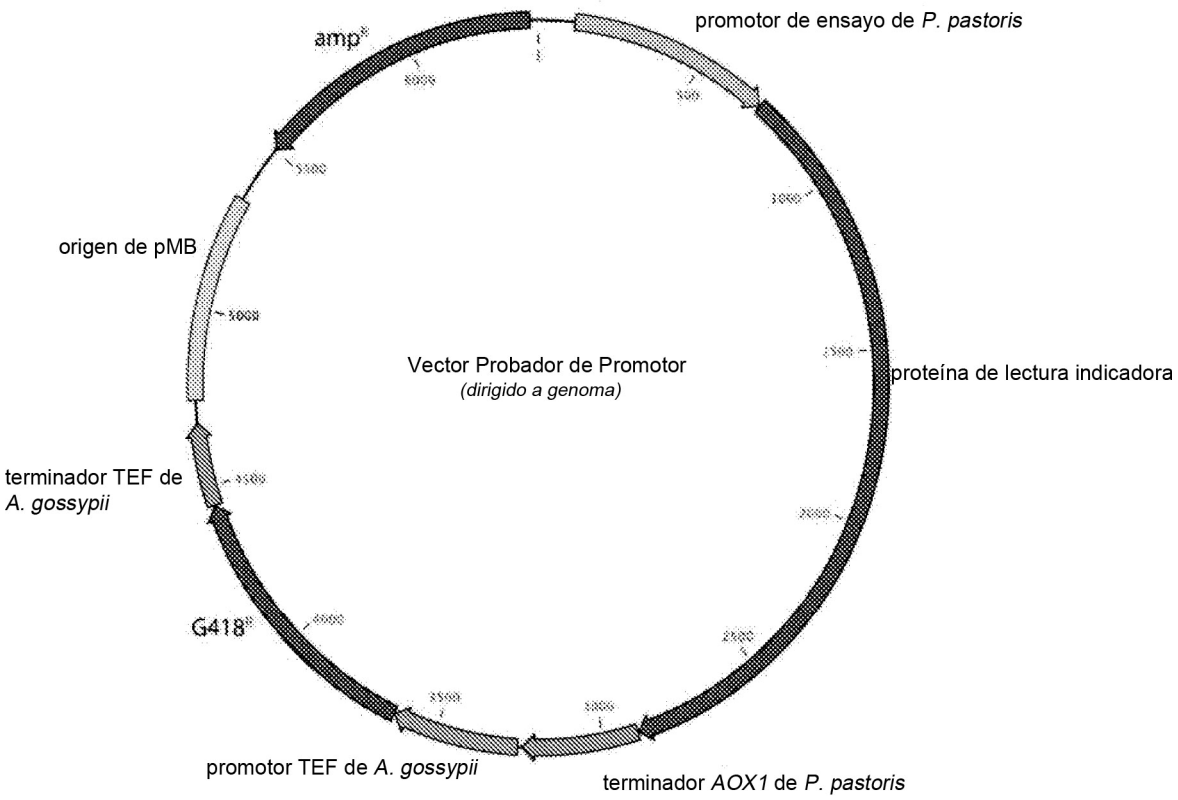
promotor de ensayo de *P. pastoris*
amp^R
origen de pMB
Vector Probador de Promotor
(dirigido a genoma)
proteína de lectura indicadora
terminador TEF de
A. gossypii
G418^R
promotor TEF de *A. gossypii*
terminador *AOX1* de *P. pastoris*

FIG. 7

Promotor	SEQ ID NO:	Cebador directo	Secuencia del cebador	Posición del cebador en la Secuencia del promotor
Chr1-0469	1	095F-long	ATCCCTACACGCTCAGGCTT	-570
Upp	2	014-F778	NNNGGTCTCNATCCTCGCTGGGTGAAAGCCAAC	-778
Upp	2	014-F513	NNNGGTCTCNATCCGCAGATACGTTCAGTGGTTTCC	-513
Upp	2	014-F354	NNNGGTCTCNATCCAGTACCTGTGACCGCAATTC	-354
Upp	2	014-F4	NNNGGTCTCNATCCTGCCTCAGGTGCATAACTT	-221
GAP		GAP-F1	NNNGGTCTCNATCCAATGGACCAAATTGTTGCAAGGT	-619
DAS		226F620	NNNGGTCTCCATCCCTTTGTTGAGCAACA	-382
DAS		226F518	NNNGGTCTCGATCCGCCCAAACGAACAG	-483
AOX		AOXF1	NNNGGTCTCCATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGA	-931

FIG. 8

Ensayo de placa Alfa-X-Gal para la actividad alfa-Galactosidasa de transformantes de *Pichia pastoris* que albergan un indicador sintético alfa-gal ORF fusionado con una secuencia promotora aislada (SEQ ID NO:). Ningún promotor se ha insertado en un plásmido control. Todas las construcciones se integran en el genoma de los transformantes.

Posición	1	2	3	4	5
Fila	Placa A				
A		XXX	XXX	XXX	
B	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
C	Control	XXX	XXX	XXX	XXX
D	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
E	Control	Control	XXX	XXX	XXX
F	XXX	XXX	XXX	XXX	NO:2(-513)
G	NO:2 (-354)	DAS	NO:1 (-570)	GAP	
H	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
I	XXX	XXX	XXX	XXX	
J		XXX	XXX		

Posición	1	2	3	4	5
Fila	Placa B				
A	XXX	XXX	XXX	XXX	
B	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
C	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
D	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
E	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
F	NO:2 (-513)	NO:2 (-354)	DAS	NO:1 (-570)	GAP
G	XXX	NO:2 (-221)	XXX	XXX	
H	XXX	XXX	XXX	XXX	
I		XXX	XXX	XXX	
J			XXX		

FIG. 9, Panel A

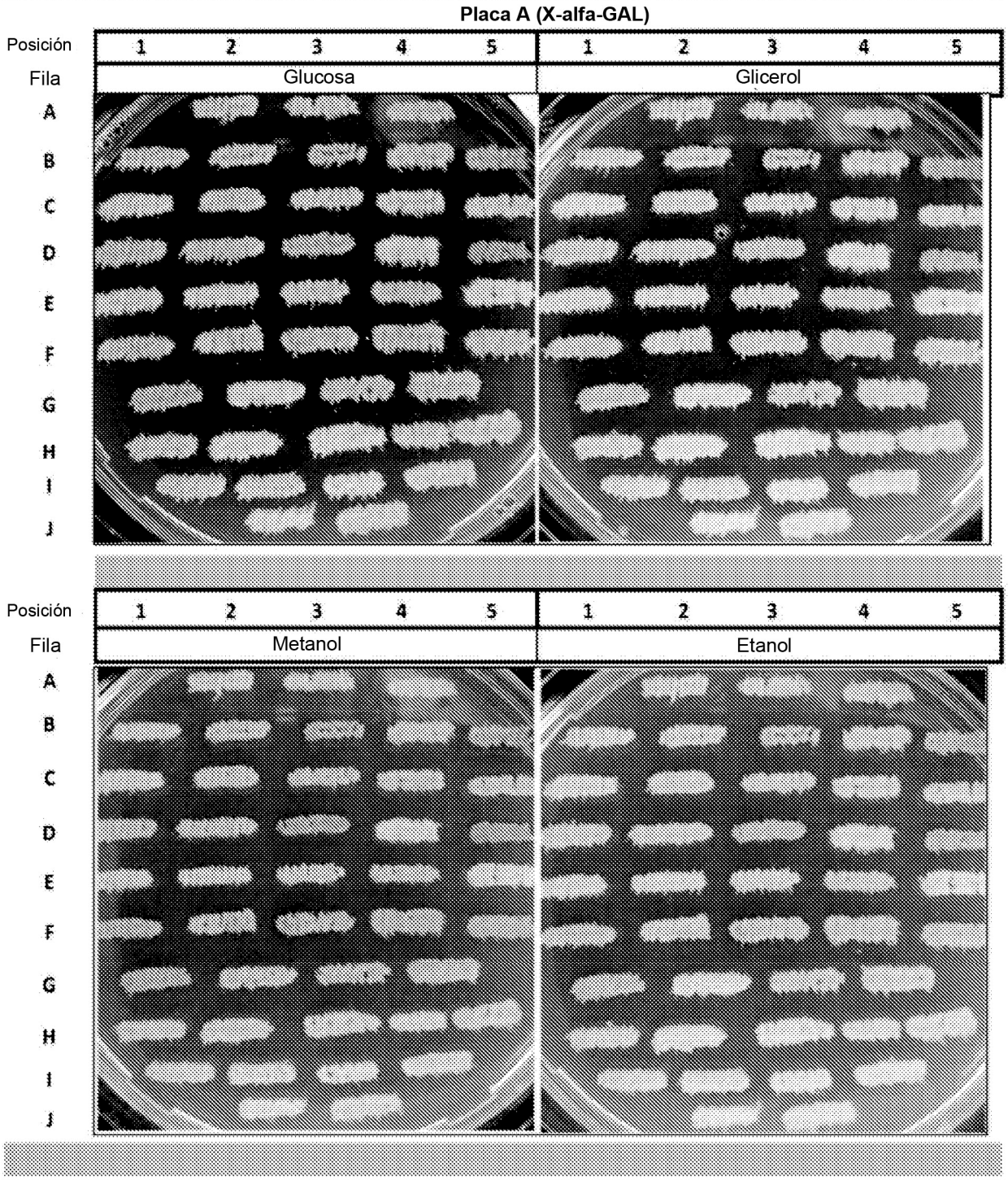
Placa A (X-alfa-GAL)
Posición
Fila
1 2 3 4 5 1 2 3 4 5
Glucosa
Glicerol
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
Posición
Fila
1 2 3 4 5 1 2 3 4 5
Metanol
Etanol
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J

FIG. 9, Panel B

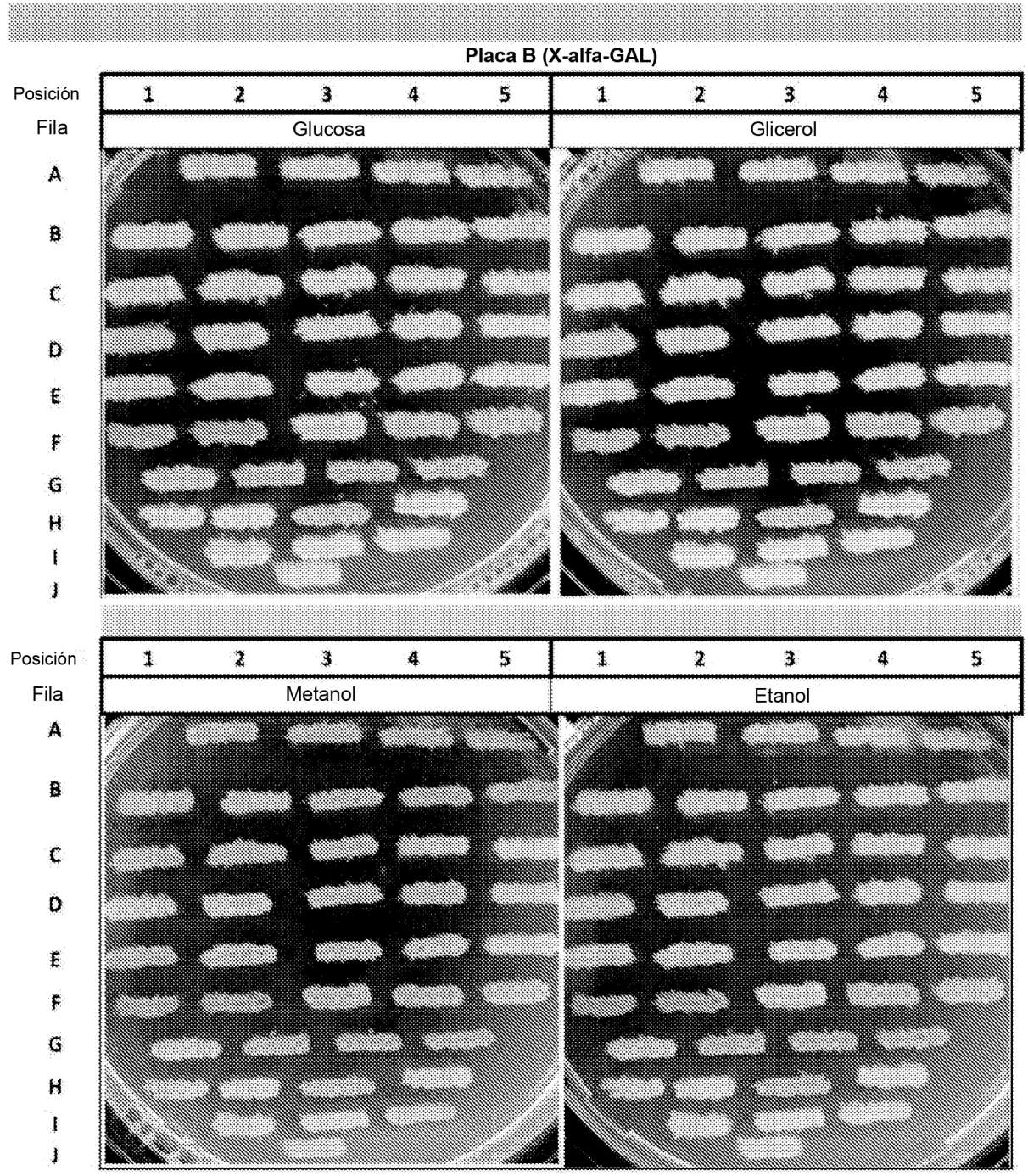
Placa B (X-alfa-GAL)
Posición
Fila
1 2 3 4 5 1 2 3 4 5
Glucosa
Glicerol
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
Posición
Fila
1 2 3 4 5 1 2 3 4 5
Metanol
Etanol
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J

FIG. 9, Panel C

Actividad fitasa (ensayo en placa). Los transformantes de Pichia pastoris que albergan construcciones de promotor aislado que regulan la levadura están fusionados al factor de cruzamiento pro alfa, en marco con la fitasa Eco 1 appAZ, integrados en el genoma de las células de Pichia hospedadoras. Los cultivos se colocaron en puntos en la superficie de placas de diagnóstico que contenían fitato cálcico (glucosa, panel superior, y metanol, panel inferior) y se incubaron durante 27 horas.

A	B	C	D	E
GAP	N.º 1	N.º 2	N.º 2	N.º 2

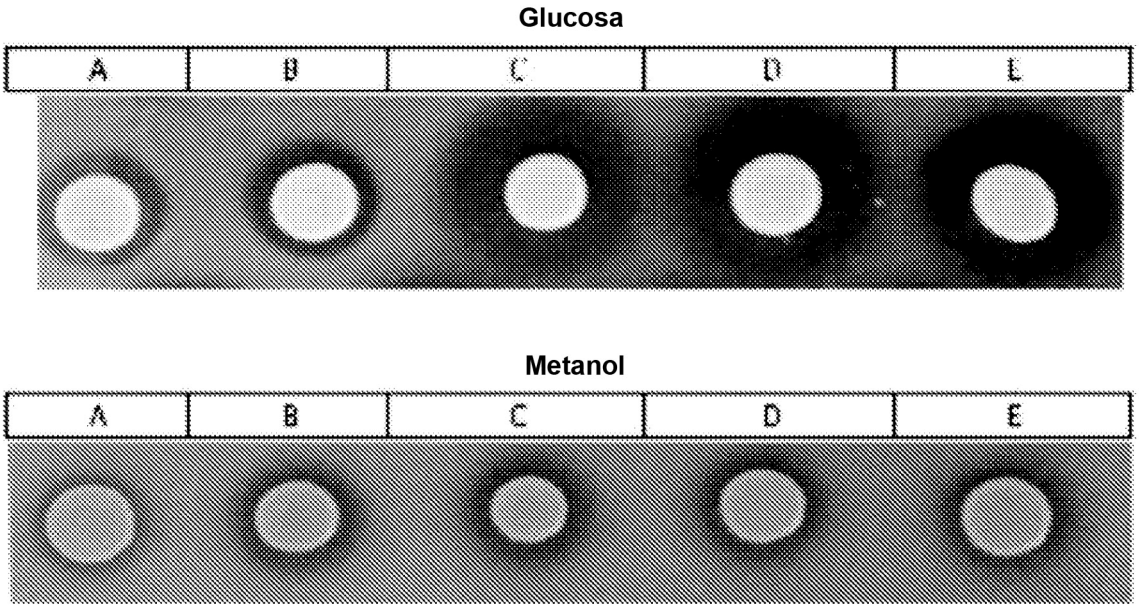

FIG. 10