(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 740 449**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/19 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12R 1/84 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2015** **E 15202233 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 3184642**

(54) Título: **Célula de levadura**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2020

(73) Titular/es:

BISY E.U. (100.0%)
Wetzawinkel 20A
8200 Hofstätten/Raab, AT

(72) Inventor/es:

VOGL, THOMAS

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 740 449 T3

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

DESCRIPCIÓN

Célula de levadura

La presente invención se refiere al uso de promotores ortólogos en células de levadura.

Proteínas recombinantes tales como productos biofarmacéuticos o biocatalizadores industrialmente relevantes se preparan lo más frecuentemente mediante la expresión génica heteróloga en microorganismos. *Escherichia coli, Sacharomyces cerevisiae y* hongos filamentosos se utilizan desde tiempos inmemoriales frecuentemente para la producción recombinante de proteínas. En los dos últimos decenios, las levaduras metilótrofas *Komagataella (Pichia) pastoris, Komagataella (Pichia) phaffii (Pp), Komagataella Kurtzmanii, Ogataea (Hansenula) polymorpha* (Hp), *Candida boidinii* (Cb) y *Ogataea (Pichia) methanolica* (Pm) se han establecido como cepas de producción alternativas eficientes. Estas cepas hacen posible alcanzar, en el caso de una elevada densidad celular, elevadas tasas de expresión para proteínas heterólogas. De las cuatro especies de levadura precedentemente mencionadas. *P. pastoris* (*Komagataella phaffii)* se ha empleado entretanto lo más frecuentemente para la producción heteróloga de proteínas.

Todas las levaduras metilótrofas presentan promotores potentes, rigurosamente regulados, que participan en la regulación de la expresión de genes de la utilización de metanol ("metanol utilization"; MUT). Habitualmente, promotores de genes de la utilización de metanol son reprimidos en fuentes de carbono represoras, tales como glucosa, y son fuertemente regulados al alza en presencia de metanol como fuente de carbono. Si la fuente de carbono represora está agotada o en presencia de una fuente de carbono no represora, se produce la activación del promotor mediante desrepresión, pudiendo variar considerablemente la intensidad de este efecto, no obstante, entre especies e incluso dentro del mismo organismo. El promotor del gen alcoholoxidasa-1 en *P. pastoris* GS115 (PPpAOX1), por ejemplo, presenta, bajo condiciones desrepresoras, en comparación con condiciones inducidas por metanol, solo una actividad del 2-4%. A diferencia de ello, el promotor del gen ortólogo (metanol-oxidasa, MOX) en *H. polymorpha* (PHpMOX), bajo condiciones desrepresoras, una actividad en comparación con condiciones inducidas por metanol de hasta el 70%. También los promotores de los genes ortólogos en *C. boidinii* (alcoholoxidasa-1, "AOD1") y *P. methanolica* (metanoloxidasa 1/2 "MOD1/2") muestran un comportamiento equiparable.

En el documento EP 0 242 007 se describe un procedimiento para la preparación de una oxidasa o composición que comprende oxidasa mediante células de levadura. La expresión de la oxidasa puede controlarse con ayuda de un promotor de metanoloxidasa (MOX).

Hartner FS et al. (Nucleic Acids Res 36(2008) :e76) describe una colección de promotores de AOX1 en *Pichia pastoris.*

Weinhandl K et al. (Microb Cell Fast 13(2014) :5) es un artículo recopilatorio sobre promotores dependientes de la fuente de carbono.

Gellissen G et al. (FEMS Yeast Res 5(2005):1079-1096) se ocupan de sistemas de expresión tales como *Hansenula polymorpha* y *PIchia pastoris* y los comparan.

En el documento WO 03/095653 se describen variantes de promotores FMD que, bajo condiciones desrepresoras, presentan una actividad de la expresión de proteínas significativamente más alta en comparación con el promotor de tipo salvaje.

La inducción de la expresión con metanol tóxico y combustible no se desea particularmente a gran escala industrial por motivos de la seguridad de funcionamiento, de modo que los promotores fuertemente desreprimidos representan una alternativa favorable. De manera correspondiente, en los últimos tiempos se desarrollaron variantes de PPpAOX1, promotores alternativos y nuevos promotores de MUT con diferentes propiedades desrepresoras, con el fin de posibilitar una expresión a escala industrial de proteínas exenta de metanol. Dado que las tasas de expresión de promotores de este tipo son, por norma general, con mucho, menores en comparación con promotores inducidos con metanol, es una misión de la presente invención proporcionar posibilidades alternativas para la sobre-expresión exenta de metanol inducible y potente de proteínas recombinantes en levaduras, tales como *P. pastoris*.

Este objetivo se alcanza con una célula de *Pichia pastoris* que comprende un promotor de una célula de levadura metilótrofa ortóloga, inducible por desrepresión, o una variante inducible por desrepresión del mismo, en el que el promotor ortólogo en la célula de levadura metilótrofa está en condiciones de controlar la expresión de polipéptidos bajo condiciones desrepresoras, en donde el promotor ortólogo es un promotor ortólogo formiato deshidrogenasa (FMD) de una célula de levadura metilótrofa y la variante es al menos 90% ident con el promotor, en donde el promotor ortólogo presenta una secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID Nº 1 y está unido operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo u homólogo, y se conserva el perfil de regulación original del promotor ortólogo en células de levadura del género Komagataella.

De manera sorprendente se ha demostrado que promotores que están en condiciones de controlar, en otras células de levadura metilótrofas que no pertenecen, preferiblemente, al género Komagataella (Pichia), la expresión de polipéptidos bajo condiciones desrepresoras (p. ej., aumentarla en comparación con condiciones no desrepresoras), presentan también en células de levadura del género Komagataella (Pichia) propiedades equiparables.

Además, se ha demostrado de manera sorprendente que un promotor formiato deshidrogenasa (FMD) de una célula de levadura metilótrofa, el cual de modo natural no se presenta en una célula de levadura del género Komagataella o bien en la misma célula de levadura, presenta precisamente en esta célula propiedades particulares. Un promotor FMD ortólogo es, en células de Komagataella, tanto bajo condiciones desrepresoras como bajo condiciones inducidas con metanol, significativamente más potente que todos los promotores que se presentan de forma natural en Komagataella hasta ahora sometidos a ensayo, que participan en la regulación de la expresión de genes de la utilización de metanol ("promotores MUT"). Así, un promotor FMD ortólogo es intensamente más potente bajo una condición desrepresora que los promotores CAT1 y GAP que se presentan de forma natural en células de Komagataella, por ejemplo. Sorprendentemente, promotores FMD ortólogos son ya bajo las condiciones de rastreo utilizadas bajo condiciones desrepresoras incluso similarmente potentes a los promotores AOX (AOX1 y AOX2) que se presentan de forma natural en Komagataella bajo condiciones inducidas por metanol. Efectos de este tipo se pueden potenciar habitualmente bajo dosificaciones de fuentes de C controladas en el ensayo del biorreactor. Esto significa que promotores FMD ortólogos pueden reemplazar a los promotores AOX habitualmente utilizados en Komagataella. En este caso, pueden alcanzarse rendimientos de expresión de proteínas esencialmente idénticos o incluso superiores que en el caso de sistemas de expresión inducidos por metanol habituales, sin utilizar, sin embargo, metanol como agente de inducción. En este caso, es sorprendente que un promotor formiato deshidrogenasa (FMD) de una célula de levadura metilótrofa (p. ej., de *H. polymorpha*), que también está significativamente desreprimido en esta célula de levadura (p. ej., en *H. polymorpha*), conserve este perfil de regulación también en otra célula de levadura metilótrofa (p. ej., *P. pastoris*). Estudios anteriores han demostrado, a diferencia de ello, que en el caso de una transferencia de promotores entre levaduras metilótrofas, el perfil de regulación del promotor extraño no es transferido (p. ej., el promotor AOX1 de *P. pastoris* no es reprimido de forma rigurosa en *H. polymorpha* como de forma natural en *P. pastoris*; véase, p. ej., Raschke WC et al. Gene 177 (1996): 163-167 y Rodriguez L. et al. Yeast 12 (1996): 815-822.). De manera correspondiente, la opinión general en el mundo científico es que la regulación diferente entre células de levadura metilótrofas no se produce mediante la secuencia del promotor, sino mediante mecanismos de regulación diferentes en las células de levadura (véase, p. ej., Hartner FS et al. Microb Cell Fact 5 (2006) :39-59). Sorprendentemente, se ha demostrado, sin embargo, que la fuerte activación de un promotor formiato deshidrogenasa (FMD) de una célula de levadura metilótrofa (p. ej., de *H. polymorpha*) mediante desrepresión no es solo transferible a otras células de levadura metilótrofas, tales como, p. ej., *Komagataella phaffii*, sino que incluso supera a las propiedades técnicas de los promotores fuertemente homólogos, tales como el del gen AOX1 y el del gen CAT1.

El uso de secuencias de promotor ortólogas tiene también otras ventajas técnicas. Por ejemplo, mediante su uso se reduce la posibilidad de una recombinación homóloga, con lo que resulta una mayor estabilidad genética de las cepas de expresión.

"Célula de levadura del género Komagataella" comprende todas las células de levadura de este género tales como, entre otras, *Komagataella kurtzmanii, Komagataella pastoris, Komagataella phaffii, Komagataella populi, Komagataella pseudopastoris, Komagataella ulmi* y *Komagataella* sp. 11-1192. "Células de levadura del género Komagataella" comprenden naturalmente también cepas específicas de los géneros precedentemente mencionados, tales como, p. ej., *Komagataella pastoris* GS115, X-33, KM71, KM71H, CBS7435 o NRLL Y11430, CBS704, BG10, BG11 o bien otros derivados de estas cepas.

El término "ortólogo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a moléculas de ácidos nucleicos o aminoácidos de diferentes especies que presentan al menos una homología funcional con las moléculas de ácidos nucleicos y aminoácidos correspondientes de otras especies. "Ortólogos" proceden de diferentes organismos que han resultado mediante la formación de la especie y que proceden también de un gen predecesor común. Las secuencias de los "ortólogos" pueden variar significativamente entre sí, pero la función biológica o bien bioquímica de los mismos no se ve, por norma general, afectada (p. ej., AOX de *Komagataella pastoris* es ortólogo a MOX de *Hansenula polymorpha* y viceversa, FMD de *Hansenula polymorpha* es ortólogo a FDH1 en *Komagataella pastoris,* y viceversa).

"Promotor", tal como se utiliza en esta memoria, comprende al menos un sitio de inicio de la transcripción ("transcription iniation start site"), un sitio de unión para un complejo de ácido nucleico-polimerasa y nucleótidos adicionales, de modo que estos dos elementos pueden ser funcionalmente activos y conservan el perfil de regulación original de la célula de partida del promotor ortólogo en células de levadura del género Komagataella. Estos nucleótidos adicionales pueden configurar, por ejemplo, sitios de unión del factor de transcripción ("transcription factor binding sites"). Un "promotor inducible mediante desrepresión" es un promotor que es activado bajo condiciones desrepresoras (véase más adelante), con lo cual pueden transcribirse moléculas de ácidos nucleicos operativamente unidas al mismo que codifican polipéptidos heterólogos u homólogos.

El promotor FMD ortólogo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente entre 50 y 2000, todavía más preferiblemente entre 100 y 1000, aún más preferiblemente entre 150 y 800 nucleótidos del tramo delante del codón de iniciación (aguas arriba del extremo 5') de la región que codifica una proteína/un polipéptido del gen que comprende el promotor correspondiente, preferiblemente la región del gen FMD que codifica FMD, que puede comprender 1 a 1000, preferiblemente 1 a 900, todavía más preferiblemente 1 a 800 nucleótidos. De manera particularmente preferida, el promotor ortólogo, preferiblemente el promotor FMD ortólogo, comprende los nucleótidos 1 a 1000 preferiblemente 1 a 900, todavía más preferiblemente 1 a 800, aguas arriba del extremo 5' de la región del gen que codifica el polipéptido, preferiblemente de la región del gen FMD, MOX que codifica FMD MOX.

"Variantes" del promotor ortólogo, preferiblemente del promotor formiato deshidrogenasa (FMD) ortólogo, comprenden moléculas de ácidos nucleicos que se diferencian en uno o varios (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50) nucleótidos de los promotores ortólogos que se presentan de forma natural, preferiblemente de los promotores FMD o bien MOX ortólogos. Variantes de promotores de este tipo son al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90%, todavía más preferiblemente al menos un 95%, aún más preferiblemente al menos un 98% idénticos con los tramos correspondientes de los promotores que se presentan de forma natural.

Las variantes empleables de acuerdo con la invención de promotores ortólogos pueden presentar, en comparación con los promotores que se presentan de forma natural, preferiblemente promotores FMD, deleciones, sustituciones e inserciones. Las variantes de los promotores presentan asimismo la propiedad de posibilitar la expresión de proteínas bajo condiciones desrepresoras. Preferiblemente, se emplean variantes que están en condiciones de expresar, bajo condiciones desrepresoras, al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, todavía más preferiblemente al menos el 70%, todavía más preferiblemente al menos el 80%, aún más preferiblemente al menos el 90%, todavía más preferiblemente al menos el 100%, todavía más preferiblemente al menos el 120%, todavía más preferiblemente al menos el 150% de la cantidad de proteínas que expresaría un célula de *Pichia pastoris* que comprende un promotor ortólogo que se presenta de forma natural, preferiblemente un promotor FMD ortólogo.

Procedimientos para la identificación y preparación de variantes de promotores son suficientemente conocidos. Habitualmente, se realizan mutaciones en el promotor, tras lo cual se examina si y cómo se han modificado las propiedades (p. ej., tasa de expresión de una proteína modelo) de la variante del promotor.

"Variantes" del promotor FMD ortólogo comprenden también variantes de promotor que comprenden los elementos reguladores del promotor ortólogo que se presenta de forma natural y de un promotor mínimo alternativo o bien un promotor del núcleo. El promotor mínimo o bien promotor del núcleo es la parte de un promotor que contiene solo aquellos elementos del promotor generales que son necesarios para la transcripción (caja TATA e inicio de la transcripción). Por lo tanto, los elementos reguladores de las variantes de acuerdo con la invención de los promotores ortólogos comprenden entre 50 y 2000, todavía más preferiblemente entre 100 y 1000, aún más preferiblemente entre 150 y 800 nucleótidos del tramo delante del codón de iniciación (aguas arriba del extremo 5') sin 20 a 100, preferiblemente sin 25 a 80, todavía más preferiblemente sin 30 a 70 nucleótidos inmediatamente delante del punto de inicio de la transcripción.

"Identidad" o bien "ident" designa el grado de coincidencia entre dos o más secuencias de ácidos nucleicos o bien aminoácidos que puede determinarse a través de la coincidencia entre las secuencias. El porcentaje de la "identidad" resulta a partir del porcentaje de los tramos idénticos en dos o más secuencias, teniendo en cuenta huecos u otras particularidades de la secuencia (es decir, % de identidad es el número de las posiciones idénticas/número total de las posiciones x 100). Un procedimiento particularmente preferido para la determinación de la identidad es el programa BLAST X del National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (véase, entre otros, Altschul S et al. J Mol Biol 215 (1990) :403-410). En este caso, se utiliza de manera preferida el algoritmo BLOSUM62 con los parámetros "hueco", "existencias":11 y "extensión":1.

Por la expresión "células de levadura metilótrofas, tal como se utiliza en esta memoria, se subsuman células de levadura que están en condiciones de crecer en medios nutricios que contienen como fuente de carbono compuestos con solo un átomo de carbono, p. ej., metanol.

"Condiciones desrepresoras", tal como se emplea en el cultivo de las células de levadura de acuerdo con la invención, significa que las células de levadura son cultivadas primeramente en presencia de una fuente de carbono represora (p. ej., glucosa), hasta que ésta se haya consumido en su mayor parte o por completo. Después de la reducción de la concentración de la fuente de carbono represora (p. ej., glucosa), las células se encuentran de nuevo en relación con la fuente de carbono represora o bien la glucosa, en condiciones desrepresoras. El poder de los efectos de represión puede ser función del tipo de la fuente de carbono.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el promotor FMD ortólogo está unido operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo u homólogo.

El promotor FMD ortólogo está unido operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo (no procedente de Komagataella) u homólogo (procedente de Komagataella) y, por consiguiente, puede

influir en o bien controlar la expresión de este polipéptido. El polipéptido a regular comprende al menos 5, preferiblemente al menos 10, todavía más preferiblemente al menos 50 restos aminoácidos y comprende, por consiguiente, moléculas que también se designan como péptidos o proteínas.

De manera particularmente preferida, la molécula de ácido nucleico codifica polipéptidos tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos, enzimas, proteínas estructurales, etc.

“Unida operativamente”, tal como se utiliza en esta memoria, significa que la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo u homólogo está unida de una manera al promotor que posibilita la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula de levadura de acuerdo con la invención. Por consiguiente, el promotor está unido operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos codificante cuando ésta influye en la transcripción de la secuencia codificante.

De acuerdo con otra forma de realización preferida de la presente invención, el polipéptido heterólogo u homólogo comprende un péptido señal, en particular un péptido señal de la secreción.

Con el fin de expulsar de la célula de levadura un polipéptido homólogo u heterólogo producido de forma recombinante, el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico comprende un péptido señal.

“Péptido señal”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un péptido unido en el extremo C o N del polipéptido que controla la segregación del polipéptido. La secuencia señal utilizada en la presente invención puede ser un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que inicia el transporte de una proteína a través de la membrana del retículo endoplasmático (ER). La secuencia de ácido nucleico de estas secuencias señal puede ser optimizada de manera correspondiente a la secuencia natural de la célula huésped original o en codones. Ejemplos no limitantes de la secuencia señal son MF-alfa (secuencia señal del “Mating-Faktor-Alpha” (Factor de Apareamiento Alfa)), la secuencia señal de la proteína CBH2 de *Trichoderma reesei*, la secuencia señal de la xilanasa A de *Thermomyces lanuginosus*, la señal de toxina asesina K1, el polipéptido señal para la secreción de invertasa, la secuencia señal de la toxina asesina de *Kluyveromyces lactis*, la secuencia señal de la toxina asesina de *Pichia acaciae,* la secuencia señal de la toxina asesina de *Hansemiaspora uvarum* y de *Pichia (Hansenula) anomala* o variantes de las mismas, tal como se describe, p. ej., en Cereghino et al. (Gene 519 (2013): 311-317). La secuencia señal preferida de la invención es MF-alfa (secuencia señal del “Mating-Faktor-Alpha”).

De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, el promotor FMD ortólogo procede de una célula de levadura metilótrofa, que se elige del grupo consistente en los géneros Hansenula (Ogataea), Candida, Komagataella y Pichia.

De acuerdo con otra forma de realización preferida de la presente invención, la célula de levadura metilótrofa se elige del grupo consistente en *Hansenula polymorpha, Candida boidinii, Pichia methanolica, Komagataella pastoris, Komagataella phaffii, Komagataella populi, Komagataella pseudopastoris, Komagataella ulmi* y *Komagataella* sp. 11-1192.

El promotor FMD ortólogo y la molécula de ácido nucleico unida operativamente al mismo que codifica el polipéptido heterólogo u homólogo pueden presentarse en el genoma como una construcción extracromosómica de ácido nucleico sobre un plásmido con una secuencia de replicación autónoma (ARS) o integrada en el genoma como vector/casete de expresión.

El promotor FMD ortólogo y la molécula de ácido nucleico unida operativamente al mismo pueden presentarse extracromosómicamente o integrados en el genoma de la célula de levadura de acuerdo con la invención.

De acuerdo con la invención, el promotor ortólogo comprende la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID Nº 1.

SEQ ID Nº 1:

AATGTATCTAAACGCAAACTCCGAGCTGGAAAAATGTTACCGGCGATGCGCGGACAATTT
AGAGGCGGCGATCAAGAAACACCTGCTGGGCGAGCAGTCTGGAGCACAGTCTTCGATGG
GCCCGAGATCCCACCGCGTTCCTGGGTACCGGGACGTGAGGCAGCGCGACATCCATCAAA
TATACCAGGCGCCAACCGAGTCTCTCGGAAAACAGCTTCTGGATATCTTCCGCTGGCGGC
GCAACGACGAATAATAGTCCCTGGAGGTGACGGAATATATATGTGTGGAGGGTAAATCTG
ACAGGGTGTAGCAAAGGTAATATTTTCCTAAAACATGCAATCGGCTGCCCCGCAACGGGA
AAAAGAATGACTTTGGCACTCTTCACCAGAGTGGGGTGTCCCGCTCGTGTGTGCAAATAG
GCTCCCACTGGTCACCCCGGATTTTGCAGAAAAACAGCAAGTTCCGGGGTGTCTCACTGG
TGTCCGCCAATAAGAGGAGCCGGCAGGCACGGAGTCTACATCAAGCTGTCTCCGATACAC
TCGACTACCATCCGGGTCTCTCAGAGAGGGGAATGGCACTATAAATACCGCCTCCTTGCG
CTCTCTGCCTTCATCAATCAAATC

SEQ ID Nº 2:

CGACGCGGAGAACGATCTCCTCGAGCTGCTCGCGGATCAGCTTGTGGCCCGGTAATGGAACCAG
GCCGACGGCACGCTCCTTGCGGACCACGGTGGCTGGCGAGCCCAGTTTGTGAACGAGGTCGTTT
AGAACGTCCTGCGCAAAGTCCAGTGTCAGATGAATGTCCTCCTCGGACCAATTCAGCATGTTCT
CGAGCAGCCATCTGTCTTTGGAGTAGAAGCGTAATCTCTGCTCCTCGTTACTGTACCGGAAGAG
GTAGTTTGCCTCGCCGCCCATAATGAACAGGTTCTCTTTCTGGTGGCCTGTGAGCAGCGGGGAC
GTCTGGACGGCGTCGATGAGGCCCTTGAGGCGCTCGTAGTACTTGTTCGCGTCGCTGTAGCCGG
CCGCGGTGACGATACCCACATAGAGGTCCTTGGCCATTAGTTTGATGAGGTGGGGCAGGATGGG
CGACTCGGCATCGAAATTTTTGCCGTCGTCGTACAGTGTGATGTCACCATCGAATGTAATGAGC
TGCAGCTTGCGATCTCGGATGGTTTTGGAATGGAAGAACCGCGACATCTCCAACAGCTGGGCCG
TGTTGAGAATGAGCCGGACGTCGTTGAACGAGGGGGCCACAAGCCGGCGTTTGCTGATGGCGCG
GCGCTCGTCCTCGATGTAGAAGGCCTTTTCCAGAGGCAGTCTCGTGAAGAAGCTGCCAACGCTC
GGAACCAGCTGCACGAGCCGAGACAATTCGGGGGTGCCGGCTTTGGTCATTTCAATGTTGTCGT
CGATGAGGAGTTCGAGGTCGTGGAAGATTTCCGCGTAGCGGCGTTTTGCCTCAGAGTTTACCAT
GAGGTCGTCCACTGCAGAGATGCCGTTGCTCTTCACCGCGTACAGGACGAACGGCGTGGCCAGC
AGGCCCTTGATCCATTCTATGAGGCCATCTCGACGGTGTTCCTTGAGTGCGTACTCCACTCTGT
AGCGACTGGACATCTCGAGACTGGGCTTGCTGTGCTGGATGCACCAATTAATTGTTGCCGCATG
CATCCTTGCACCGCAAGTTTTTAAAACCCACTCGCTTTAGCCGTCGCGTAAAACTTGTGAATCT
GGCAACTGAGGGGGTTCTGCAGCCGCAACCGAACTTTTCGCTTCGAGGACGCAGCTGGATGGTG
TCATGTGAGGCTCTGTTTGCTGGCGTAGCCTACAACGTGACCTTGCCTAACCGGACGGCGCTAC
CCACTGCTGTCTGTGCCTGCTACCAGAAAATCACCAGAGCAGCAGAGGGCCGATGTGGCAACTG
GTGGGGTGTCGGACAGGCTGTTTCTCCACAGTGCAAATGCGGGTGAACCGGCCAGAAAGTAAAT
TCTTATGCTACCGTGCAGTGACTCCGACATCCCCAGTTTTTGCCCTACTTGATCACAGATGGGG
TCAGCGCTGCCGCTAAGTGTACCCAACCGTCCCCACACGGTCCATCTATAAATACTGCTGCCAG
TGCACGGTGGTGACATCAATCTAAAGTACAAAAACAAA

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un polipéptido heterólogo, que comprende la etapa del cultivo de una célula de levadura de acuerdo con la presente invención.

La célula de levadura de acuerdo con la invención que comprende un promotor FMD ortólogo se adecua, en particular, para la sobre-expresión de polipéptidos homólogos o heterólogos. En virtud de las extraordinarias propiedades, con la célula de levadura de acuerdo con la invención es posible expresar un polipéptido o bien una proteína, tanto bajo condiciones desrepresoras como bajo condiciones inducidas por metanol o condiciones inductoras alternativas adecuadas y, eventualmente, segregarlo de la célula.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, durante el cultivo se induce la expresión del polipéptido heterólogo bajo condiciones desrepresoras o se aumenta su tasa de expresión.

La desrepresión del promotor puede alcanzarse mediante una tasa de alimentación reducida con una fuente de carbono represora (fuente de C: p. ej., glucosa, glicerol) o mediante el uso de una fuente de C no represora (p. ej., sorbitol). La fuente de C represora puede alcanzar sus propiedades mediante represión directa o mediante propiedades represoras de metabolitos de la fuente de C. La tasa de alimentación con fuentes de C represoras puede desplazarse hacia cero en el caso extremo. También son posibles efectos de inducción adicionales mediante otros compuestos tales como, p. ej., mediante ácidos grasos, formaldehido o ácido fórmico.

Con el fin de aumentar el rendimiento de proteínas durante el cultivo o bien durante su expresión, durante el cultivo se añade, bajo condiciones desrepresoras, preferiblemente metanol.

Las condiciones de cultivo generales, tales como temperatura, medio, etc., son suficientemente conocidas por el experto en la materia (véase, p. ej., Krainer FW et al. Microbial Cell Factories 11 (2012) : 22).

La presente invención se define con mayor detalle con ayuda de las siguientes Figuras y Ejemplos, pero sin estar limitada a estos.

La Fig. 1 muestra las intensidades de fluorescencia de una proteína informadora fluorescente verde (una variante mejorada de la proteína fluorescente verde (GFP)) en el cultivo de células de levadura del género Komagataella, en las que un ácido nucleico que codifica la proteína fluorescente verde está unido operativamente a promotores ortólogos y endógenos. Los promotores ortólogos (y promotores endógenos de *P. pastoris* como referencia) fueron unidos operativamente al gen informador GFP y transformados como vectores en *P. pastoris*. Las cepas se cultivaron en placas de microtitulación con 96 pocillos (“deep well plate” (DWP) – placa de pocillos profundos) en medio mínimo (BMD1) durante 60 h y, a continuación, se indujeron con metanol. La fluorescencia de la proteína informadora y la DO 600 (como medida de la biomasa) se midieron bajo condiciones reprimidas en glucosa (16 h), condiciones desreprimidas (60 h) y diferentes momentos después de la inducción con metanol. Las mediciones de fluorescencia se normalizaron en relación con los valores DO 600. Los valores medios y las desviaciones estándar se muestran en cada caso para cuatro transformantes.

La Fig. 2 muestra el transcurso en el tiempo de mediciones de la expresión de proteínas. Cepas elegidas de la Fig. 1 se cultivaron en matraces agitados. La fluorescencia de la proteína (Fig. 2A; relación RFU/ = D 600; “RFU”, “relative fluorescence unit”, “unidad de fluorescencia relativa”), la DO 600 (Fig. 2B) y la cantidad de glucosa (Fig. 2C) se midieron a lo largo del tiempo. La concentración de glucosa al comienzo de las mediciones ascendió a 55,5 mM (10 g/l). Se muestran los valores medios (MV) y las desviaciones estándar de en cada caso tres transformantes.

Las Figs. 3A a 3C muestran que el promotor HpFMD ortólogo está también en condiciones de regular al alza la expresión de otras proteínas informadoras, tales como peroxidasa de rábano picante (HRP) (Fig. 3A), lipasa B de Candida Antarctica (CalB) (Fig. 3B) y una hidroxinitriloliasa de Manihot esculenta (MeHNL) (Fig. 3C). Las cepas se cultivaron después de 60 h en DWP en medio mínimo hasta el consumo de glucosa (“agotamiento”) y, a continuación, se indujeron adicionalmente con metanol. Las actividades enzimáticas de HRP y CalB se midieron en el material sobrenadante del cultivo. La actividad de MeHNL se midió con las células disgregadas. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de en cada caso cuatro transformantes.

EJEMPLO:

Materiales y Métodos

Clonación de los promotores

Los promotores ortólogos se amplificaron mediante PCR y se clonaron delante de un gen informador GFP. Para ello, se utilizó el plásmido informador pPpT4mutZeoMlyI-intARG4-eGFP-BmrIstuffer (Vogl T et al. ACS Synth Biol. 2015, DOI: 10.1021/acssynbio.5b00199; publicado el 22 de noviembre de 2015).

Este plásmido se basa en el vector pPpT4 que se describió por Näätsaari L et al. (PLoS One 7 (2012): e39720). Los promotores se clonaron sin costuras (es decir, sin puntos de corte de enzimas de restricción o secuencias de enlazador entre el promotor y el codón de inicio) con el fin de obtener el contexto natural. Los cebadores se diseñaron con ayuda de referencias de la bibliografía (Promotores HpFMD (Song H, et al. Biotechnol Lett 25 (2003):1999-2006; Ledeboer AM, et al. Nucleic Acids Res 13 (1985):3063-3082), Promotor CbAOD1 (Yurimoto H, et al. Biochim Biophys Acta 1493(2000):56-63), Promotor CbFLD1 (Lee B, et al. Microbiology 148(2000):2697-704), Promotores Pm MODI y MOD2 (Raymond CK, et al. Yeast 14 (1998):11-23; Nakagawa T, et al. J Biosci Bioeng 91 (2001):225-7; Nakagawa T, et al. Yeast 23 (2006):15-22). Las secuencias de cebador utilizadas están indicadas en la Tabla A:

Tabla A: Cebadores para la amplificación de los promotores ortólogos

Nombre	Secuencia	SEQ ID Nº
HpFMDfwd	AATGTATCTAAACGCAAACTCCGAGCTG	3
HpFMDrev	GATTTGATTGATGAAGGCAGAGAGCGCAAG	4
HpMOXfwd	TCGACGCGGAGAACGATCTCCTCGAGCT	5
HpMOXrev	TTTGTTTTTGTACTTTAGATTGATGTCACCAC-CGTGCACTGGCAG	6
PmMOD1fwd	CGAGATGGTACATACTTAAAAGCTGCCATATTGAG	7
PmMOD1rev	TTTGAGAAATTAATAGTAAGATTTTTTTTTCGTAAAAGTTT-TGATTGAGTTAATTC	8
PmMOD2fwd	GGATCCACTACAGTTTACCAATTGATTACGCCAATAG	9
PmMOD2rev	TTTGAATTTTAGTTTTAGATAGATAAATATAATTTTCA-ATCCTGTTATAAAATAGTATAT	10
CbAOD1fwd	GGAGTATACGTAAATATATAATTATATATAATCATATATAT-GAATACAATGAAAG	11
CbAOD1rev	TATTGAAAAATAATTTTGTTTTTTTTTTTTTGTTTTTT-TAAAAGTTCGTTAAAATTCG	12
CbFLD1fwd	GGATCCCTTCAACAGCGGAGTCTCAAAC	13
CbFLD1rev	TTTTGTGGAATAAAAAATAGATAAATATGATTTAGTG-TAGTTGATTCAATCAATTGAC	14

ADN genómico de las cepas Hp (*Hansenula polymorpha*) DSM 70277, Cb (*Candida boidinii*) DSM 70026 y Pm (*Pichia methanolica*) DSM 2147 se aisló y se utilizó como molde para las reacciones PCR. Los productos de la PCR se clonaron mediante clonaciones TA ("TA cloning") en el vector pPpT4mutZeoMlyI-intARG4-eGFP-BmrIstuffer (véase también el documento US 2015/0011407 y Vogl T et al. (ACS Synth Biol. 2015, DOI: 10.1021/acssynbio.5b00199; publicado el 22 de noviembre de 2015)). Los vectores de control con respecto a los promotores endógenos de *P. pastoris* AOX1, CAT1 y GAP se pueden deducir del documento US 2015/0011407.

Los vectores informadores alternativos que contienen HRP (isoenzima A2A; Näätsaari L, et al. BMC Genomics 15 (2014): 227), CalB y MeHNL aguas abajo de los promotores correspondientes, se tomaron o construyeron del documento US 2015/0011407, recortando el gen informador eGFP de los vectores eGFP arriba mencionados (enzimas de restricción NheI y NotI) y sin costuras se incorporaron los productos de la PCR de HRP, CalB y MeHNL mediante clonación por recombinación ("recombination cloning"). Para las amplificaciones por PRC se utilizaron los cebadores indicados en la Tabla B.

Tabla B: Cebadores para la clonación de promotores por encima ("aguas arriba") de diferentes genes informadores

Cebador	Secuencia	SEQ ID Nº
pHpFMD-MFalpha-Gib	cttgcgctctctgccttcatcaatcaaatcatg agattcccatctattttcaccgctgtc	15
AOX1TT-NotI-CalB	caaatggcattctgacatcctcttgagcggccg cttatggggtcacgataccggaacaag	16
AOX1TT-NotI-HRPA2A	caaatggcattctgacatcctcttgagcggccg cttaggatccgttaactttcttgcaatcaagtc	17
seq-pHpHMD-149..126fwd	actggtgtccgccaataagaggag	18
pHpFMD-MeHNL	cttgcgctctctgccttcatcaatcaaatcatg gttactgctcacttcgtcttgattcac	19
AOX1TT-NotI-MeHNL	caaatggcattctgacatcctcttgagcggccg cttaagcgtaagcgtcggcaacttcctg	20
pCAT1-MeHNL-Gib	cacttgctctagtcaagacttacaattaaaatg gttactgctcacttcgtcttgattcac	21

Para ello, se utilizaron como moldes de PCR los vectores HRP y CalB mencionados en la bibliografía (documento US 2015/0011407) y Vogl T. et al. (ACS Synth Biol. 2015, DOI: 10.1021/acssynbio.5b00199; publicado el 22 de noviembre de 2015). La secuencia de MeHNL se optimizó para el codón de *P. pastoris* y se diseñó como fragmento de ADN de doble cadena sintético con colgantes al promotor AOX1 y el terminador (véase la Tabla B). Este fragmento se utilizó como molde para las PCR. Se utilizó la secuencia:

cgacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattattgaaagaattccgaaacg**ATG**GTTACTGC
TCACTTCGTCTTGATTCACACTATCTGTCATGGTGCTTGGATCTGGCACAAGTTGAAGCCAGCA
TTGGAGAGAGCTGGACATAAGGTTACCGCTCTTGATATGGCTGCATCTGGTATTGATCCTCGTC
AAATCGAACAAATCAATTCATTCGACGAGTACTCAGAGCCACTGCTGACCTTCTTGGAAAAGTT
GCCTCAAGGTGAAAAGGTGATCATCGTTGGTGAATCCTGTGCTGGATTGAACATTGCCATTGCA
GCTGATAGATATGTCGATAAGATCGCTGCTGGTGTCTTCCACAACTCTCTGTTACCAGATACTG
TTCACTCTCCATCTTACACTGTCGAGAAGTTGTTAGAATCATTCCCAGATTGGAGAGATACTGA
ATACTTTACTTTCACTAACATCACTGGAGAGACTATCACCACCATGAAACTTGGATTCGTTTTG
TTGAGAGAAAACCTTTTCACCAAGTGTACTGATGGTGAATACGAATTGGCCAAGATGGTTATGA
GAAAGGGTTCTTTGTTTCAGAATGTTCTTGCACAAAGACCAAAGTTCACCGAAAAGGGTTACGG
TTCTATCAAGAAGGTCTACATCTGGACTGATCAGGACAAGATCTTCCTGCCAGACTTCCAAAGA
TGGCAAATCGCAAACTACAAACCAGATAAGGTCTACCAAGTCCAAGGTGGTGATCACAAGTTAC
AATTGACCAAGACCGAAGAGGTCGCTCACATCTTGCAGGAAGTTGCCGACGCTTACGCT**TAA**gc
ggccgctcaagaggatgtcagaatgccatttgcctg (SEQ ID Nr. 22)

La secuencia que codifica la proteína está representada aquí en mayúsculas, el codón de inicio y de parada en negrillas, los colgantes respecto al vector para la clonación por recombinación están representados en minúsculas, los lugares de corte EcorI y NotI que se utilizan típicamente para clonaciones en la familia de vectores pPpT4 están subrayados.

Para la amplificación por PCR de los genes HRP y CalB pudo utilizarse el mismo cebador directo (pHpFMD-MFalfa-Gib), dado que ambos genes están fusionados con una secuencia señal MFalfa. Se secuenciaron los genes clonados en los vectores mediante cebadores que se unen en el terminador AOX1 y los promotores respectivos (seqpHpHMD-149..126fwd para el promotor HpFMD).

Cepas, Materiales, Mediciones de Fluorescencia y Ensayos Enzimáticos

La actividad enzimática de HRP y CalB se determinaron con los sustratos sal de diamonio de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y butirato de p-nitrofenilo (p-NPB) según los protocolos en Krainer FW (Microb Cell Fact 11 (2012): 22.

Para las transformaciones de todas las comparaciones de promotor con GFP se utilizó la cepa de tipo salvaje CBS7435. Los plásmidos HRP y CalB se transformaron en la cepa mutS (Näätsaari et al., PLoS One 2012; 7:e39720), dado que ésta muestra una mayor expresión de proteínas (Krainer FW, et al. Microb Cell Fact 11 (2012): 22). Para las mediciones de la actividad de MeHNL las células se lisaron mediante la disgregación con Y-PER (Thermo Fischer Scientific Y-PER™ Reactivo de Extracción de Proteínas de Levadura) según los datos del fabricante y la actividad se midió con un "Ensayo de Cianogénesis de Mandelonitrilo", tal como se describe en Wiedner R et al. (Comput Struct Biotechnol J10 (2014): 58-62) (concentración final de mandelonitrilo 15 mM).

Resultados

Seis promotores heterólogos de los genes HpFMD, HpMOX, CbFLD1, CbAOD1, PmMOD1 y PmMOD2 se sometieron a ensayo en *P. pastoris*, Los promotores se compararon, a saber, con el promotor AOX1 inducible con metanol, el promotor GAP constitutivo y el promotor CAT1 desreprimido/inducible con metanol en *P. pastoris.* Los promotores ortólogos se amplificaron mediante PCR de ADN genómico y se clonaron en el vector con GFP como gen informador. Se utilizaron las siguientes secuencias de promotor:

HpFMD (SEQ ID Nº 1):

AATGTATCTAAACGCAAACTCCGAGCTGGAAAAATGTTACCGGCGATGCGCGGACAATTTAGAG
GCGGCGATCAAGAAACACCTGCTGGGCGAGCAGTCTGGAGCACAGTCTTCGATGGGCCCGAGAT
CCCACCGCGTTCCTGGGTACCGGGACGTGAGGCAGCGCGACATCCATCAAATATACCAGGCGCC
AACCGAGTCTCTCGGAAAACAGCTTCTGGATATCTTCCGCTGGCGGCGCAACGACGAATAATAG
TCCCTGGAGGTGACGGAATATATATGTGTGGAGGGTAAATCTGACAGGGTGTAGCAAAGGTAAT
ATTTTCCTAAAACATGCAATCGGCTGCCCCGCAACGGGAAAAAGAATGACTTTGGCACTCTTCA
CCAGAGTGGGGTGTCCCGCTCGTGTGTGCAAATAGGCTCCCACTGGTCACCCCGGATTTTGCAG
AAAAACAGCAAGTTCCGGGGTGTCTCACTGGTGTCCGCCAATAAGAGGAGCCGGCAGGCACGGA
GTCTACATCAAGCTGTCTCCGATACACTCGACTACCATCCGGGTCTCTCAGAGAGGGGAATGGC
ACTATAAATACCGCCTCCTTGCGCTCTCTGCCTTCATCAATCAAATC

HpMOX (SEQ ID Nº 2):

CGACGCGGAGAACGATCTCCTCGAGCTGCTCGCGGATCAGCTTGTGGCCCGGTAATGGAACCAG
GCCGACGGCACGCTCCTTGCGGACCACGGTGGCTGGCGAGCCCAGTTTGTGAACGAGGTCGTTT
AGAACGTCCTGCGCAAAGTCCAGTGTCAGATGAATGTCCTCCTCGGACCAATTCAGCATGTTCT
CGAGCAGCCATCTGTCTTTGGAGTAGAAGCGTAATCTCTGCTCCTCGTTACTGTACCGGAAGAG
GTAGTTTGCCTCGCCGCCCATAATGAACAGGTTCTCTTTCTGGTGGCCTGTGAGCAGCGGGGAC
GTCTGGACGGCGTCGATGAGGCCCTTGAGGCGCTCGTAGTACTTGTTCGCGTCGCTGTAGCCGG
CCGCGGTGACGATACCCACATAGAGGTCCTTGGCCATTAGTTTGATGAGGTGGGGCAGGATGGG
CGACTCGGCATCGAAATTTTTGCCGTCGTCGTACAGTGTGATGTCACCATCGAATGTAATGAGC
TGCAGCTTGCGATCTCGGATGGTTTTGGAATGGAAGAACCGCGACATCTCCAACAGCTGGGCCG
TGTTGAGAATGAGCCGGACGTCGTTGAACGAGGGGGCCACAAGCCGGCGTTTGCTGATGGCGCG
GCGCTCGTCCTCGATGTAGAAGGCCTTTTCCAGAGGCAGTCTCGTGAAGAAGCTGCCAACGCTC
GGAACCAGCTGCACGAGCCGAGACAATTCGGGGGTGCCGGCTTTGGTCATTTCAATGTTGTCGT
CGATGAGGAGTTCGAGGTCGTGGAAGATTTCCGCGTAGCGGCGTTTTGCCTCAGAGTTTACCAT
GAGGTCGTCCACTGCAGAGATGCCGTTGCTCTTCACCGCGTACAGGACGAACGGCGTGGCCAGC
AGGCCCTTGATCCATTCTATGAGGCCATCTCGACGGTGTTCCTTGAGTGCGTACTCCACTCTGT
AGCGACTGGACATCTCGAGACTGGGCTTGCTGTGCTGGATGCACCAATTAATTGTTGCCGCATG
CATCCTTGCACCGCAAGTTTTTAAAACCCACTCGCTTTAGCCGTCGCGTAAAACTTGTGAATCT
GGCAACTGAGGGGGTTCTGCAGCCGCAACCGAACTTTTCGCTTCGAGGACGCAGCTGGATGGTG
TCATGTGAGGCTCTGTTTGCTGGCGTAGCCTACAACGTGACCTTGCCTAACCGGACGGCGCTAC
CCACTGCTGTCTGTGCCTGCTACCAGAAAATCACCAGAGCAGCAGAGGGCCGATGTGGCAACTG
GTGGGGTGTCGGACAGGCTGTTTCTCCACAGTGCAAATGCGGGTGAACCGGCCAGAAAGTAAAT
TCTTATGCTACCGTGCAGTGACTCCGACATCCCCAGTTTTTGCCCTACTTGATCACAGATGGGG
TCAGCGCTGCCGCTAAGTGTACCCAACCGTCCCCACACGGTCCATCTATAAATACTGCTGCCAG
TGCACGGTGGTGACATCAATCTAAAGTACAAAAACAAA

CbFLD1 (SEQ ID Nº 23):

GGATCCCTTCAACAGCGGAGTCTCAAGCAGTGGCTATTATCAGTGTATTTAATTACTGATGCAT
TGTATTATAGTGCATACATAGTTAATAATTACTCTCTGTTATCATTGAAAATTTTGAAATTCTC
ACTCTCACGCAGTGCAAAACTTTGCCTAATTGAGTAAGTGGAACGCAATATTTAGGCTACATAT
TTTGGATTCCCTTAAGTATGTAATCAAAGATCATTCATACTGCCATCTTATAATATTGGAGTAT
TATTATGTTGCTATACTGTTCTACCTGTTTATTCTATTGTATGCGTCTAAATCTTTCCATCAGT
TTCTATACTATCTTTCGTTTGCAATGAAATATTACTCCAATTCGCTTGTTTCAACTCGCTTGCC
TTCTCTCTTGCCTTCTTTTTTTCTTTTCATTTTATCGTTGTTTAAACGGTATATAAATATGTAA
CGTTGTCGCTTAGTTTTGAGAAATCACTTTTGTTGCTCTCAATTCTGTTTTGACATCTTAAGGT
TAGTCAATTGATTGAATCAACTACACTAAATCATATTTATCTATTTTTTATTCCACAAAA

CbAOD1 (SEQ ID Nº 24):

GGAGTATACGTAAATATATAATTATATATAATCATATATATGAATACAATGCAATGAAAGTGAA
TATGATAAGATTGAAATAATAACAAACAGCGATAAATATATCTCAAAATGGAGTTACACAACAA
ATAATAATAAAATATAAATTATAAATTATAAATTATAAAAGAATAAAAAATAAACCCCACTAAT
TTATTTTATTAAAAGATAGATTGGTATCTTTACTTAATAACAATTCTGAAACTTTATTCACTTA
ATTTTATTTAACTTATTTAATTTATTTTTACCCCAGTTTTTCAGTACAATGCAGCTCCGAAACT
TTATTTGGCTGTGATTTGGCTGTGATTTGGCTGTGATTTGGCTTGGCTTGGCTGGCTGGAATTG
TCTCCTGCAGGAATTGCTCGGGGTCCGGTTCTCCCGCTGGCTGGCTATTTGGCGGGCTGGCTAT
TTGGCGGGCTGGCTGGCTGGCTGCTCTGCCATCTGCTGTGGCCACCCCGCATCTCTGGATGCAC
GCCGTGCAGCTGGACGTGCGTCTACCCTGCAGCCGTGTGCCTTATTTCCCAATCTCCCAATCTC
TCAATCTGCCAGTCAGCCAAAACACCGGCCAGGCAGGCAGGCAGGCAGGCAGGCAGGCAGTGAA
GCCTTCCCACGCCCCACTCCGCATAAACATCCCCAGCAGTTTCCCCAGCAGTTTCCCCAGCTTT
TCAATTTAATAAAATAGCCTGTTTCTGTTTCTGTTTTATATTATACAATTTTTTATCCTAATAA
TTACTCTTTCGGGAATTAAATAATAATTATATCATATACCCATATCACATTTTACTATATTTAC
TATCTATAAATAAATTCATATTATAATATTAATTTATATTCGCTTAATTAAAATGCTCTTTTCC
ATCATCATCATCATCATCATCATCACGAGTTTTCGGTTATCAATACTCTTTTCATTAATTTCTA
GAATTTCATTATTTATTTTTTATTGACTGGAAATTTTCAATCAATTTTATTTATTTTTATTTAT
TTATTTTCATATTCTTAGATTTAAACTTTTTAGATGACCGCTATTTTACTTACTTACTTACTGT
TGTTTTATATTATGATAAGAATTAATTTTCATATTTATGATGATGATGATGTAAATTTAACCTA
GTATACTATTTTAAAGTTATCACTATCTTTTAGTGCTGGCATTTTTTATTCTATTTTCATATAT
GTATATACGTAAATTAAGTATCATCACGCTGCTTACTGTACGTTTAAAATGTGGAGATGGAAAT
AGAGATGGGGATGAAGATGAAGATGATGAGAATTATAAACCATTCATTCATTAATCAATCAATA
TAACTTATAAAAAAATTTATATTTAAATGAATTAATTTCCTTTATTTTAATAATATCGTTAATT
CTTTTAAATTCTATTTTATTTTAATTCTTTCTTTATCATAGTTATCATATAACAATTATATAAC
ATAGATACACAATTATTATTTCATTATCATATTATTTTTTAAAATATTGATTATTTTTAAAATA
ATATCTTAATTAATTAATTTTTACGAATATACAAATTTTAACGACTTACTTTTTTTAACGAATT
TTAACGAACTTTTAAAAAAACAAAAAAAAAAAAACAAAATTATTTTTCAATA

PmMOD1 (SEQ ID Nº 25):

CGAGATGGTACATACTTAAAAGCTGCCATATTGAGGAACTTCAAAGTTTTATCTGTTTTTAGAA
TTAAAAGACGATTGTTGTAACAAAACGTTGTGCCTACATAAACTCAAATTAATGGAAATAGCCT
GTTTTGAAAAATACACCTTCTTAAGTACTGACAAAGTTTTGTTAAATGACTATCGAACAAGCCA
TGAAATAGCACATTTCTGCCAGTCACTTTTAACACTTTCCTGCTTGCTGGTTGACTCTCCTCAT
ACAAACACCCAAAAGGGAAACTTTCAGTGTGGGGACACTTGACATCTCACATGCACCCCAGATT
AATTTCCCCAGACGATGCGGAGACAAGACAAAACAACCCTTTGTCCTGCTCTTTTCTTTCTCAC
ACCGCGTGGGTGTGTGCGCAGGCAGGCAGGCAGGCAGCGGGCTGCCTGCCATCTCTAATCGCTG
CTCCTCCCCCCTGGCTTCAAATAACAGCCTGCTGCTATCTGTGACCAGATTGGGACACCCCCCT
CCCCTCCGAATGATCCATCACCTTTTGTCGTACTCCGACAATGATCCTTCCCTGTCATCTTCTG
GCAATCAGCTCCTTCAATAATTAAATCAAATAAGCATAAATAGTAAAATCGCATACAAACGTCA
TGAAAAGTTTTATCTCTATGGCCAACGGATAGTCTATCTGCTTAATTCCATCCACTTTGGGAAC
CGTTCTCTCTTTACCCCAGATTCTCAAAGCTAATATCTGCCCCTTGTCTATTGTCCTTTCTCCG
TGTACAAGCGGAGCTTTTGCCTCCCATCCTCTTGCTTTGTTTCGGTTATTTTTTTTTCTTTTGA
AACTCTTGGTCAAATCAAATCAAACAAAACCAAACCTTCTATTCCATCAGATCAACCTTGTTCA
ACATTCTATAAATCGATATAAATATAACCTTATCCCTCCCTTGTTTTTTACCAATTAATCAATC
TTCAAATTTCAAATATTTTCTACTTGCTTTATTACTCAGTATTAACATTTGTTTAAACCAACTA
TAACTTTTAACTGGCTTTAGAAGTTTTATTTAACATCAGTTTCAATTTACATCTTTATTTATTA
ACGAAATCTTTACGAATTAACTCAATCAAAACTTTTACGAAAAAAAAATCTTACTATTAATTTC
TCAAA

PmMOD2 (SEQ ID Nº 26):

GGATCCACTACAGTTTACCAATTGATTACGCCAATGTGTTTATTTCACCAAGTAATTACAAAAC
TGAGATTTGGTTATGTCATTATGTATTTTCGGCAATGGCTGTAATTTAAACTGGATTAGGGTTA
ATTAACGTTTAGCCTACGAAAGCGGCTAGCTTTTATTTCTGCTTTTGTTTTGAGCCCGTTTCTA
ATTCCAATCTTTGCAATTTCGTTCCATCTTTTAAAATTAAGTGCTCTTTTCTAATCTGATAAAG
ATAAGCCATCGTAGAGTAAGTAAAACAAAATAATGTACTGTATATTAAGCGGAAAAACTTGGAA
AAGTCGTATGATGTTGAAGGAGCAAAGAATGACTAATATTAGGAGATTTAAGCAAACAATGTTG
AGGGGAACAGGACGATTAACCCCTTATAGAGGAAGCGTCTTTGATGTTCGAAGGGGGAGGGGTC
AAAAGCACTGAGCAGTGCTAATTAGTAACCAATTTCTGTAAGCAATGAAACTTGTTGCTATTGG
AAATACTATTAAGTAATACAAGGTACAGACTAATGGGGGTGAGCCGGTAGTTCAGGCTATCTTA
TAGACAGACTATTCCGGATTGTCTAATCATTGGTGCACCTGGTTAATAATTATCAGTCAACTCT
TTTACGGTGCTGATAGGTCTTTGCGAACTTGCCCTTGTGGAATTTGGTTGTTAATCAAACTGTT
CTGTATTTCATGTCATACTACTATTGATATTATTAATGTTACTTACTCATCTGGCCATTTAACA
GGTTTGAAGCTTTAATGCTCTTAACTAACAGCAATCCATCACCGTCAACCTTAACCCCCCTGGT
GCTTGCTGTCTTTATCCTTCGTATCTTTTTCATGTTGCACCGCCCTGTTCCTTATACGGTTGTT
CCCCCATAGGCTAACTTCTCTGTTTCCGACCATCTCTGCAATAACAAAGAATTCTATACGCTTA
CACTATAATCATACAATGACTCTACATGCCATTTTCACTTTACTTACTTGCCATCGGAAGATAC
TGAATCAGAAAGCCATAGTAACTACATAACTTCAAAACACACCCTTTTTACAGATTAGTTACAA
TTTTGTCAATGTTTGTTTGATAACCCAAGGTGGAACGTTTCCAGTTAGACCTGTTTAATCCAAC
TCACTTTACCACCCCAAAACTTTCCTACCGTTAGACAAATACTGGCTAAATCTGACGAAAACAA
CCAATCAACAATTGAATCCACTGGGAGGTATCTCTAATCCACTGACAAACTTTGCTAAAACAAG
AAAAAGTGGGGGCCTCCGTTGCGGAGAAGACGTGCGCAGGCTTAAAAACACAAGAGAACACTTG
GAAGTACCCCAGATTTTTAGCTTCCTACTATTCTGACACCCCCTATTCAAGCACGACGGTGATT
GATTCATTCAATTTTGCTGCTCCAATGATAGGATAAACCCTTTTGGACTTCAATCAGACCTCTG
TCCTCCATAGCAATATAAATACCTTCTAGTTGCCCCACTTCCTCTCTCCTGTACTGCCCCAATG
AGTGACTTATTCAAGTTACTTTCTCTCTTTTCCTAACAATTAAACAAGAAGCTTTATTATAACA
TTAATATACTATTTTATAACAGGATTGAAATTATATTTATCTATCTAAAACTAAAATTCAAA

Transformantes de *P. pastoris* que contenían plásmidos con los promotores CbAOD1, PmMOD1 y PmMOD2 no mostraron fluorescencia de la proteína informadora (Fig. 1). El promotor CbFLD1 mostró una represión en glucosa y una débil inducción por parte de metanol de aproximadamente el 10% del promotor PpAOX1. Sorprendentemente, ambos promotores de *H. polymorpha* sometidos a ensayo conservaron su perfil de regulación natural de *H. polymorpha* y mostraron también en Pichia pastoris represión, desrepresión e inducción con metanol (Figs. 1 y 2). El promotor HpFMD superó de manera sorprendente, bajo condiciones desreprimidas, al promotor PpGAP constitutivo e incluso alcanzó, sin alimentación adicional con fuentes de C para el abastecimiento de energía, aproximadamente el 75% del promotor PpAOX1 inducido con metanol. La expresión desreprimida del promotor HpFMD superó la fluorescencia de la proteína informadora del promotor MUT endógeno más potente de P. pastoris (PpCAT1) aproximadamente en 3,5 veces. Tras la inducción con metanol, en promotor HpFMD superó incluso al promotor PpAOX1 aproximadamente dos veces. Estos resultados a pequeña escala (Fig. 1) se confirmaron mediante experimentos en matraces agitados (Fig. 2), mostrándose mediante mediciones con glucosa también claramente el perfil de regulación desreprimido. Un refuerzo adicional de las ventajas técnicas del promotor HpFMD se puede alcanzar mediante una tasa de alimentación optimizada en el biorreactor.

Con el fin de examinar si la fuerte expresión inesperada del promotor HpFMD puede ser reproducida para otras proteínas que no sean GFP, el promotor HpFMD se clonó delante de las secuencias codificantes de proteínas adicionales: las proteínas secretadas de peroxidasa de rábano picante (HRP) y lipasa B de Candida antárctica (CalB) y la hidroxinitril-liasa intracelular de Manihot esculenta (MeHNL) (Figs. 3A a 3C).

Con referencia a los rendimientos finales en proteína activa en el sobrenadante del cultivo en el experimento con matraces agitados se igualó la expresión desreprimida de todas las proteínas mediante el promotor HpFMD de la expresión constitutiva mediante el promotor GAP y superó claramente a la expresión desreprimida mediante el promotor CAT1. Las actividades enzimáticas inducidas por metanol del promotor HpFMD superaron a la actividad del promotor AOX1 en 2,5 veces.

La fuerte expresión del promotor HpFMD también se podía observar en el caso de cuatro proteínas informadoras secretadas, como también intracelulares diferentes (eGFP, HRP, CalB, MeHNL). El promotor HpFMD ortólogo superó incluso a los promotores endógenos en P. pastoris.

De manera interesante, los promotores ortólogos no muestran o bien muestran identidades de secuencia muy bajas con respecto a los promotores en Pichia. Una búsqueda según BLAST del promotor HpFMD no proporcionó resultados significativos en el genoma de Pichia pastoris, tampoco un alineamiento directo del promotor HpFMD con respecto al promotor PpFDH1 proporcionó similitudes significativas (BLASTN 2.2.32+, secuencias Blast 2, ajuste para 'Secuencias algo similares (blastn)', tipo de molécula: ácido nucleico.

Una identidad de la secuencia baja de este tipo es una propiedad deseable de los promotores, dado que estas secuencias extrañas no pueden recombinarse con secuencias idénticas en el genoma de Pichia y, de esta forma, no pueden perderse, p. ej., mediante fenómenos de recombinación homólogos con secuencias similares ya presentes en el genoma.

Sorprendentemente, promotores ortólogos pueden representar herramientas altamente aprovechables para la expresión de proteínas, tal como se muestra mediante las actividades 2,5 veces mayores por parte del promotor HpFMD. De manera inesperada, el promotor HpFMD conservó también en P. pastoris su perfil de regulación desreprimido de H. polimorpha y, por consiguiente, representa el promotor desreprimido más fuerte en P. pastoris. Con ello, pueden posibilitarse procesos de producción eficientes libres de metanol tóxico y altamente inflamatorio.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Technische Universität Graz

<120> Célula de levadura

<130> 47851

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 623
<212> ADN
<213> Hansenula polymorpha

<400> 1
aatgtatcta aacgcaaact ccgagctgga aaaatgttac cggcgatgcg cggacaattt 60

agaggcggcg atcaagaaac acctgctggg cgagcagtct ggagcacagt cttcgatggg 120

cccgagatcc caccgcgttc ctgggtaccg ggacgtgagg cagcgcgaca tccatcaaat 180

ataccaggcg ccaaccgagt ctctcggaaa acagcttctg gatatcttcc gctggcggcg 240

caacgacgaa taatagtccc tggaggtgac ggaatatata tgtgtggagg gtaaatctga 300

cagggtgtag caaaggtaat attttcctaa aacatgcaat cggctgcccc gcaacgggaa 360

aaagaatgac tttggcactc ttcaccagag tggggtgtcc cgctcgtgtg tgcaaatagg 420

ctcccactgg tcaccccgga ttttgcagaa aaacagcaag ttccggggtg tctcactggt 480

gtccgccaat aagaggagcc ggcaggcacg gagtctacat caagctgtct ccgatacact 540

cgactaccat ccgggtctct cagagagggg aatggcacta taaataccgc ctccttgcgc 600

tctctgcctt catcaatcaa atc 623

<210> 2
<211> 1510
<212> ADN
<213> Hansenula polymorpha

<400> 2
cgacgcggag aacgatctcc tcgagctgct cgcggatcag cttgtggccc ggtaatggaa 60

ccaggccgac ggcacgctcc ttgcggacca cggtggctgg cgagcccagt ttgtgaacga 120

ggtcgtttag aacgtcctgc gcaaagtcca gtgtcagatg aatgtcctcc tcggaccaat 180

tcagcatgtt ctcgagcagc catctgtctt tggagtagaa gcgtaatctc tgctcctcgt 240

tactgtaccg gaagaggtag tttgcctcgc cgcccataat gaacaggttc tctttctggt 300

ggcctgtgag cagcggggac gtctggacgg cgtcgatgag gcccttgagg cgctcgtagt 360

acttgttcgc gtcgctgtag ccggccgcgg tgacgatacc cacatagagg tccttggcca 420

ttagtttgat gaggtggggc aggatgggcg actcggcatc gaaatttttg ccgtcgtcgt 480

acagtgtgat gtcaccatcg aatgtaatga gctgcagctt gcgatctcgg atggttttgg 540

aatggaagaa ccgcgacatc tccaacagct gggccgtgtt gagaatgagc cggacgtcgt 600

tgaacgaggg ggccacaagc cggcgtttgc tgatggcgcg gcgctcgtcc tcgatgtaga 660

aggccttttc cagaggcagt ctcgtgaaga agctgccaac gctcggaacc agctgcacga 720

gccgagacaa ttcgggggtg ccggctttgg tcatttcaat gttgtcgtcg atgaggagtt 780

cgaggtcgtg gaagatttcc gcgtagcggc gttttgcctc agagtttacc atgaggtcgt 840

ccactgcaga gatgccgttg ctcttcaccg cgtacaggac gaacggcgtg gccagcaggc 900

ccttgatcca ttctatgagg ccatctcgac ggtgttcctt gagtgcgtac tccactctgt 960

agcgactgga catctcgaga ctgggcttgc tgtgctggat gcaccaatta attgttgccg 1020

catgcatcct tgcaccgcaa gtttttaaaa cccactcgct ttagccgtcg cgtaaaactt 1080

gtgaatctgg caactgaggg ggttctgcag ccgcaaccga acttttcgct tcgaggacgc 1140

agctggatgg tgtcatgtga ggctctgttt gctggcgtag cctacaacgt gaccttgcct 1200

aaccggacgg cgctacccac tgctgtctgt gcctgctacc agaaaatcac cagagcagca 1260

gagggccgat gtggcaactg gtggggtgtc ggacaggctg tttctccaca gtgcaaatgc 1320

gggtgaaccg gccagaaagt aaattcttat gctaccgtgc agtgactccg acatccccag 1380

tttttgccct acttgatcac agatggggtc agcgctgccg ctaagtgtac ccaaccgtcc 1440

ccacacggtc catctataaa tactgctgcc agtgcacggt ggtgacatca atctaaagta 1500

caaaaacaaa 1510

<210> 3
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 3
aatgtatcta aacgcaaact ccgagctg 28

<210> 4
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 4
gatttgattg atgaaggcag agagcgcaag 30

<210> 5
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5
tcgacgcgga gaacgatctc ctcgagct 28

<210> 6
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6
tttgtttttg tactttagat tgatgtcacc accgtgcact ggcag 45

<210> 7
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 7
cgagatggta catacttaaa agctgccata ttgag 35

<210> 8
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 8
tttgagaaat taatagtaag attttttttt cgtaaaagtt ttgattgagt taattc 56

<210> 9
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 9
ggatccacta cagtttacca attgattacg ccaatag 37

<210> 10
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 10
tttgaatttt agttttagat agataaatat aattttcaat cctgttataa aatagtatat 60

<210> 11
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 11
ggagtatacg taaatatata attatatata atcatatata tgaatacaat gaaag 55
<210> 12
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 12
tattgaaaaa taattttgtt tttttttttt tgtttttttta aaagttcgtt aaaattcg 58

<210> 13
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 13
ggatcccttc aacagcggag tctcaaac 28

<210> 14
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 14
ttttgtggaa taaaaaatag ataaatatga tttagtgtag ttgattcaat caattgac 58

<210> 15
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 15
cttgcgctct ctgccttcat caatcaaatc atgagattcc catctatttt caccgctgtc 60

<210> 16
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 16
caaatggcat tctgacatcc tcttgagcgg ccgcttatgg ggtcacgata ccggaacaag 60

<210> 17
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 17
caaatggcat tctgacatcc tcttgagcgg ccgcttagga tccgttaact ttcttgcaat 60
caagtc 66

<210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 18
actggtgtcc gccaataaga ggag 24

<210> 19
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 19
cttgcgctct ctgccttcat caatcaaatc atggttactg ctcacttcgt cttgattcac 60

<210> 20
<211> 61
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 20
caaatggcat tctgacatcc tcttgagcgg ccgcttaagc gtaagcgtcg gcaacttcct 60

g 61

<210> 21
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 21
cacttgctct agtcaagact tacaattaaa atggttactg ctcacttcgt cttgattcac 60

<210> 22
<211> 868
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 22
cgacaacttg agaagatcaa aaaacaacta attattgaaa gaattccgaa acgatggtta 60

ctgctcactt cgtcttgatt cacactatct gtcatggtgc ttggatctgg cacaagttga 120

agccagcatt ggagagagct ggacataagg ttaccgctct tgatatggct gcatctggta 180

ttgatcctcg tcaaatcgaa caaatcaatt cattcgacga gtactcagag ccactgctga 240

ccttcttgga aaagttgcct caaggtgaaa aggtgatcat cgttggtgaa tcctgtgctg 300

gattgaacat tgccattgca gctgatagat atgtcgataa gatcgctgct ggtgtcttcc 360

acaactctct gttaccagat actgttcact ctccatctta cactgtcgag aagttgttag 420

aatcattccc agattggaga gatactgaat actttacttt cactaacatc actggagaga 480

ctatcaccac catgaaactt ggattcgttt tgttgagaga aaacctttc accaagtgta 540

ctgatggtga atacgaattg gccaagatgg ttatgagaaa gggttctttg tttcagaatg 600

ttcttgcaca aagaccaaag ttcaccgaaa agggttacgg ttctatcaag aaggtctaca 660

tctggactga tcaggacaag atcttcctgc cagacttcca aagatggcaa atcgcaaact 720

acaaaccaga taaggtctac caagtccaag gtggtgatca caagttacaa ttgaccaaga 780

ccgaagaggt cgctcacatc ttgcaggaag ttgccgacgc ttacgcttaa gcggccgctc 840

aagaggatgt cagaatgcca tttgcctg 868

<210> 23
<211> 572
<212> ADN
<213> Candida boidinii

<400> 23
ggatcccttc aacagcggag tctcaagcag tggctattat cagtgtattt aattactgat 60

gcattgtatt atagtgcata catagttaat aattactctc tgttatcatt gaaaattttg 120

aaattctcac tctcacgcag tgcaaaactt tgcctaattg agtaagtgga acgcaatatt 180

taggctacat attttggatt cccttaagta tgtaatcaaa gatcattcat actgccatct 240

tataatattg gagtattatt atgttgctat actgttctac ctgtttattc tattgtatgc 300

gtctaaatct ttccatcagt ttctatacta tctttcgttt gcaatgaaat attactccaa 360

ttcgcttgtt tcaactcgct tgccttctct cttgccttct ttttttcttt tcattttatc 420

gttgtttaaa cggtatataa atatgtaacg ttgtcgctta gttttgagaa atcacttttg 480

ttgctctcaa ttctgttttg acatcttaag gttagtcaat tgattgaatc aactacacta 540

aatcatattt atctattttt tattccacaa aa 572

<210> 24
<211> 1652
<212> ADN
<213> Candida boidinii

<400> 24
ggagtatacg taaatatata attatatata atcatatata tgaatacaat gcaatgaaag 60

tgaatatgat aagattgaaa taataacaaa cagcgataaa tatatctcaa aatggagtta 120

cacaacaaat aataataaaa tataaattat aaattataaa ttataaaaga ataaaaaata 180

aaccccacta atttatttta ttaaaagata gattggtatc tttacttaat aacaattctg 240

aaactttatt cacttaattt tatttaactt atttaattta tttttacccc agtttttcag 300

tacaatgcag ctccgaaact ttatttggct gtgatttggc tgtgatttgg ctgtgatttg 360

gcttggcttg gctggctgga attgtctcct gcaggaattg ctcggggtcc ggttctcccg 420

ctggctggct atttggcggg ctggctattt ggcgggctgg ctggctggct gctctgccat 480

ctgctgtggc caccccgcat ctctggatgc acgccgtgca gctggacgtg cgtctaccct 540

gcagccgtgt gccttatttc ccaatctccc aatctctcaa tctgccagtc agccaaaaca 600

ccggccaggc aggcaggcag gcaggcaggc aggcagtgaa gccttcccac gccccactcc 660

gcataaacat ccccagcagt ttccccagca gtttccccag cttttcaatt taataaaata 720

gcctgtttct gtttctgttt tatattatac aatttttat cctaataatt actctttcgg 780

gaattaaata ataattatat catataccca tatcacattt tactatattt actatctata 840

aataaattca tattataata ttaatttata ttcgcttaat taaaatgctc ttttccatca 900

tcatcatcat catcatcatc acgagttttc ggttatcaat actcttttca ttaatttcta 960

gaatttcatt atttattttt tattgactgg aaattttcaa tcaattttat ttatttttat 1020

ttatttattt tcatattctt agatttaaac tttttagatg accgctattt tacttactta 1080

cttactgttg ttttatatta tgataagaat taattttcat atttatgatg atgatgatgt 1140

aaatttaacc tagtatacta ttttaaagtt atcactatct tttagtgctg gcatttttta 1200

ttctattttc atatatgtat atacgtaaat taagtatcat cacgctgctt actgtacgtt 1260

taaaatgtgg agatggaaat agagatgggg atgaagatga agatgatgag aattataaac 1320

cattcattca ttaatcaatc aatataactt ataaaaaaat ttatatttaa atgaattaat 1380

ttcctttatt ttaataatat cgttaattct tttaaattct attttatttt aattctttct 1440

ttatcatagt tatcatataa caattatata acatagatac acaattatta tttcattatc 1500

atattatttt ttaaaatatt gattattttt aaaataatat cttaattaat taatttttac 1560

gaatatacaa attttaacga cttacttttt ttaacgaatt ttaacgaact tttaaaaaaa 1620

caaaaaaaaa aaaacaaaat tatttttcaa ta 1652

<210> 25
<211> 1157
<212> ADN
<213> Pichia methanolica

<400> 25
cgagatggta catacttaaa agctgccata ttgaggaact tcaaagtttt atctgttttt 60

agaattaaaa gacgattgtt gtaacaaaac gttgtgccta cataaactca aattaatgga 120

aatagcctgt tttgaaaaat acaccttctt aagtactgac aaagttttgt taaatgacta 180

tcgaacaagc catgaaatag cacatttctg ccagtcactt ttaacacttt cctgcttgct 240

ggttgactct cctcatacaa acacccaaaa gggaaacttt cagtgtgggg acacttgaca 300

tctcacatgc accccagatt aatttcccca gacgatgcgg agacaagaca aaacaaccct 360

ttgtcctgct cttttctttc tcacaccgcg tgggtgtgtg cgcaggcagg caggcaggca 420

gcgggctgcc tgccatctct aatcgctgct cctccccccct ggcttcaaat aacagcctgc 480

tgctatctgt gaccagattg ggacaccccc ctcccctccg aatgatccat cacctttttgt 540

cgtactccga caatgatcct tccctgtcat cttctggcaa tcagctcctt caataattaa 600

atcaaataag cataaatagt aaaatcgcat acaaacgtca tgaaaagttt tatctctatg 660

gccaacggat agtctatctg cttaattcca tccactttgg gaaccgttct ctctttaccc 720

cagattctca aagctaatat ctgccccttg tctattgtcc tttctccgtg tacaagcgga 780

gcttttgcct cccatcctct tgctttgttt cggttatttt tttttctttt gaaactcttg 840

gtcaaatcaa atcaaacaaa accaaacctt ctattccatc agatcaacct tgttcaacat 900

tctataaatc gatataaata taaccttatc cctcccttgt tttttaccaa ttaatcaatc 960

ttcaaatttc aaatattttc tacttgcttt attactcagt attaacattt gtttaaacca 1020

actataactt ttaactggct ttagaagttt tatttaacat cagtttcaat ttacatcttt 1080

atttattaac gaaatcttta cgaattaact caatcaaaac ttttacgaaa aaaaaatctt 1140

actattaatt tctcaaa 1157

<210> 26
<211> 1662
<212> ADN
<213> Pichia methanolica

<400> 26

```
ggatccacta cagtttacca attgattacg ccaatgtgtt tatttcacca agtaattaca      60
aaactgagat ttggttatgt cattatgtat tttcggcaat ggctgtaatt taaactggat     120
tagggttaat taacgtttag cctacgaaag cggctagctt ttatttctgc ttttgttttg     180
agcccgtttc taattccaat ctttgcaatt tcgttccatc ttttaaaatt aagtgctctt     240
ttctaatctg ataaagataa gccatcgtag agtaagtaaa acaaaataat gtactgtata     300
ttaagcggaa aaacttggaa aagtcgtatg atgttgaagg agcaaagaat gactaatatt     360
aggagattta agcaaacaat gttgagggga acaggacgat taacccctta tagaggaagc     420
gtctttgatg ttcgaagggg gaggggtcaa aagcactgag cagtgctaat tagtaaccaa     480
tttctgtaag caatgaaact tgttgctatt ggaaatacta ttaagtaata caaggtacag     540
actaatgggg gtgagccggt agttcaggct atcttataga cagactattc cggattgtct     600
aatcattggt gcacctggtt aataattatc agtcaactct tttacggtgc tgataggtct     660
ttgcgaactt gcccttgtgg aatttggttg ttaatcaaac tgttctgtat ttcatgtcat     720
actactattg atattattaa tgttacttac tcatctggcc atttaacagg tttgaagctt     780
taatgctctt aactaacagc aatccatcac cgtcaacctt aaccccccctg gtgcttgctg    840
tctttatcct tcgtatcttt ttcatgttgc accgccctgt tccttatacg gttgttcccc     900
cataggctaa cttctctgtt tccgaccatc tctgcaataa caaagaattc tatacgctta     960
cactataatc atacaatgac tctacatgcc attttcactt tacttacttg ccatcggaag    1020
atactgaatc agaaagccat agtaactaca taacttcaaa acacaccctt tttacagatt    1080
agttacaatt ttgtcaatgt ttgtttgata acccaaggtg gaacgtttcc agttagacct    1140
gtttaatcca actcacttta ccaccccaaa actttcctac cgttagacaa atactggcta    1200
aatctgacga aaacaaccaa tcaacaattg aatccactgg gaggtatctc taatccactg    1260
acaaactttg ctaaaacaag aaaaagtggg ggcctccgtt gcggagaaga cgtgcgcagg    1320
cttaaaaaca caagagaaca cttggaagta ccccagattt ttagcttcct actattctga    1380
cacccccctat tcaagcacga cggtgattga ttcattcaat tttgctgctc caatgatagg    1440
ataaaccctt ttggacttca atcagacctc tgtcctccat agcaatataa ataccttcta    1500
gttgccccac ttcctctctc ctgtactgcc ccaatgagtg acttattcaa gttactttct    1560
ctcttttcct aacaattaaa caagaagctt tattataaca ttaatatact attttataac    1620
aggattgaaa ttatatttat ctatctaaaa ctaaaattca aa                       1662
```

REIVINDICACIONES

1. Célula de Pichia pastoris que comprende un promotor ortólogo, inducible por desrepresión, de una célula de levadura metilótrofa o una variante inducible por desrepresión de la misma, caracterizada por que el promotor ortólogo es un promotor ortólogo formiato deshidrogenasa (FMD) de una célula de levadura metilótrofa y la variante es al menos 90% ident con el promotor, en donde el promotor ortólogo presenta una secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID Nº 1 y está unido operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo u homólogo.

2. Célula de Pichia pastoris según la reivindicación 1, caracterizada por que el promotor ortólogo es inducible con metanol.

3. Célula de Pichia pastoris según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que el polipéptido heterólogo u homólogo comprende un péptido señal, en particular un péptido señal de la secreción.

4. Célula de Pichia pastoris según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el promotor ortólogo procede de una célula de levadura metilótrofa, que se elige del grupo consistente en los géneros Hansenula, Candida, Komagataella y Pichia.

5. Célula de Pichia pastoris según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que la célula de levadura metilótrofa se elige del grupo consistente en Hansenula polymorpha, Candida boidinii, Pichia methanolica, Komagataella pastoris, Komagataella phaffii, Komagataella populi, Komagataella pseudopastoris, Komagataella ulmi y Komagataella sp. 11-1192.

6. Célula de Pichia pastoris según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que el promotor ortólogo y, eventualmente, la molécula de ácido nucleico unida operativamente al mismo que codifica el polipéptido heterólogo u homólogo está presente en el genoma y en forma de construcción de ácido nucleico extracromosómica.

7. Procedimiento para la preparación de un polipéptido heterólogo, que comprende la etapa del cultivo de una célula de Pichia pastoris según una de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizada por que durante el cultivo se induce la expresión del polipéptido heterólogo bajo condiciones desrepresoras o se aumenta su tasa de expresión.

9. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizada por que durante el cultivo se añade, bajo condiciones desrepresoras, metanol o un inductor alternativo.

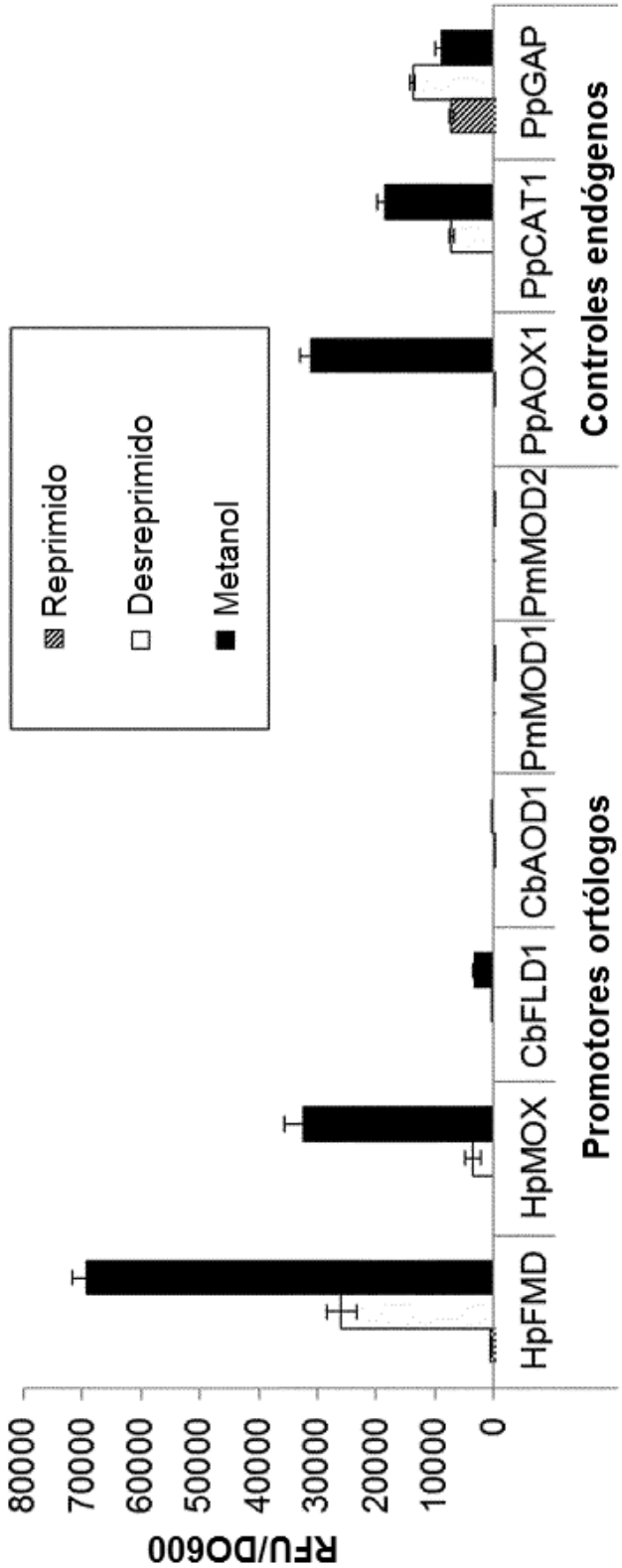
RFU/DO600
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Reprimido
Desreprimido
Metanol
HpFMD
HpMOX
CbFLD1
CbAOD1
PmMOD1
PmMOD2
PpAOX1
PpCAT1
PpGAP
Promotores ortólogos
Controles endógenos

Fig. 1

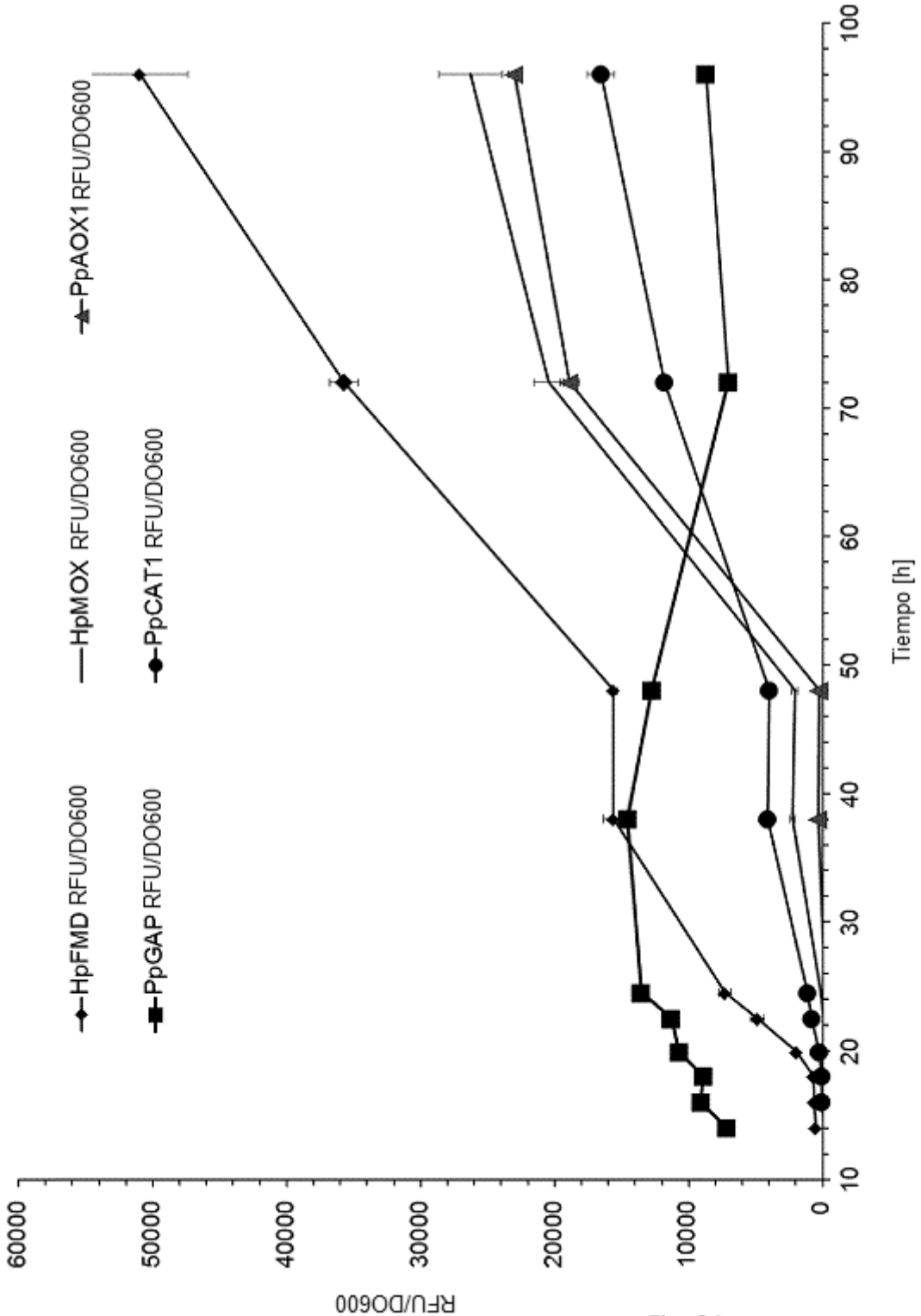
HpFMD RFU/DO600
HpMOX RFU/DO600
PpAOX1 RFU/DO600
PpGAP RFU/DO600
PpCAT1 RFU/DO600
RFU/DO600
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Tiempo [h]

Fig. 2A

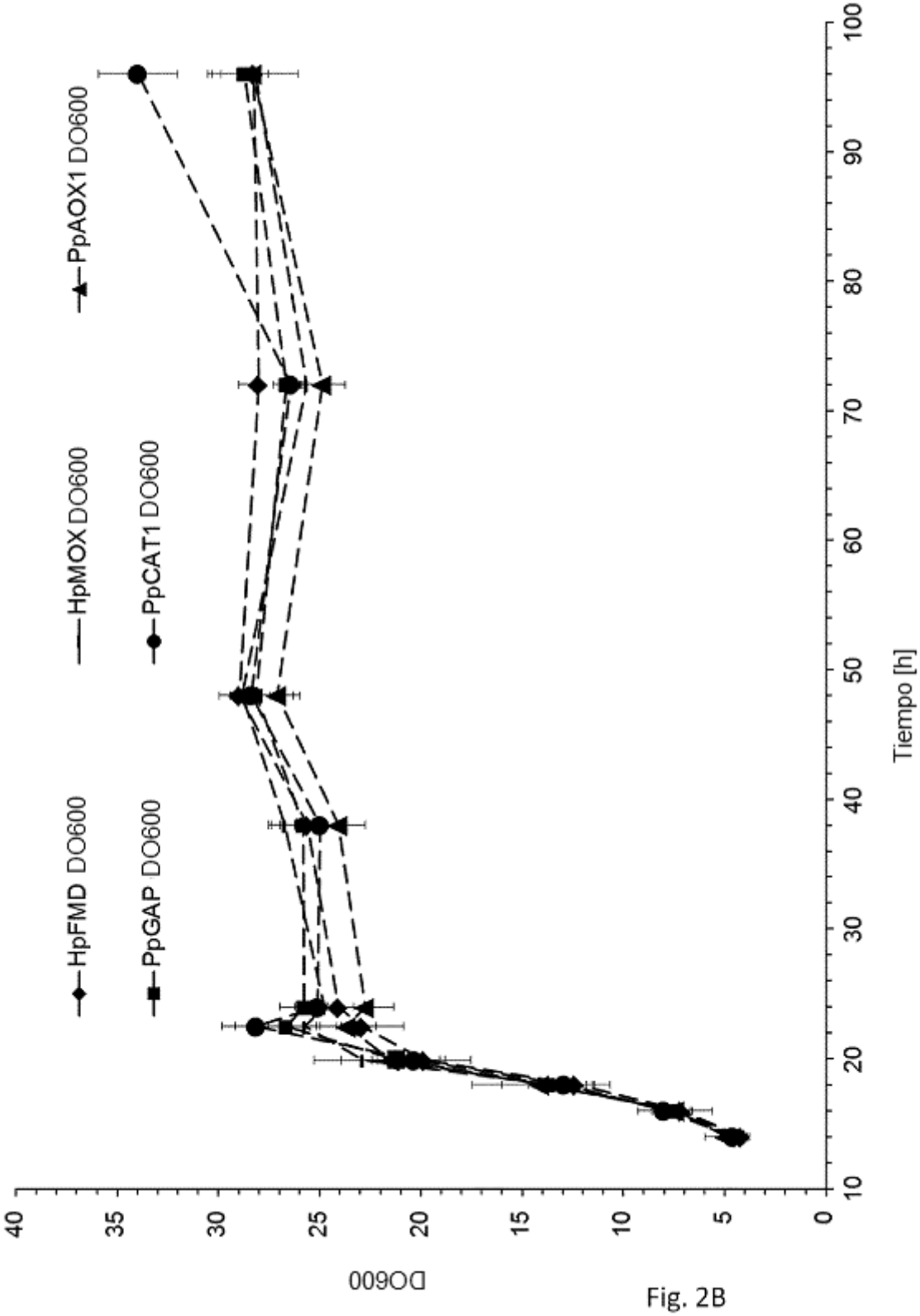
HpFMD DO600
PpGAP DO600
HpMOX DO600
PpCAT1 DO600
PpAOX1 DO600
DO600
Tiempo [h]
0
5
10
15
20
25
30
35
40
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

Fig. 2B

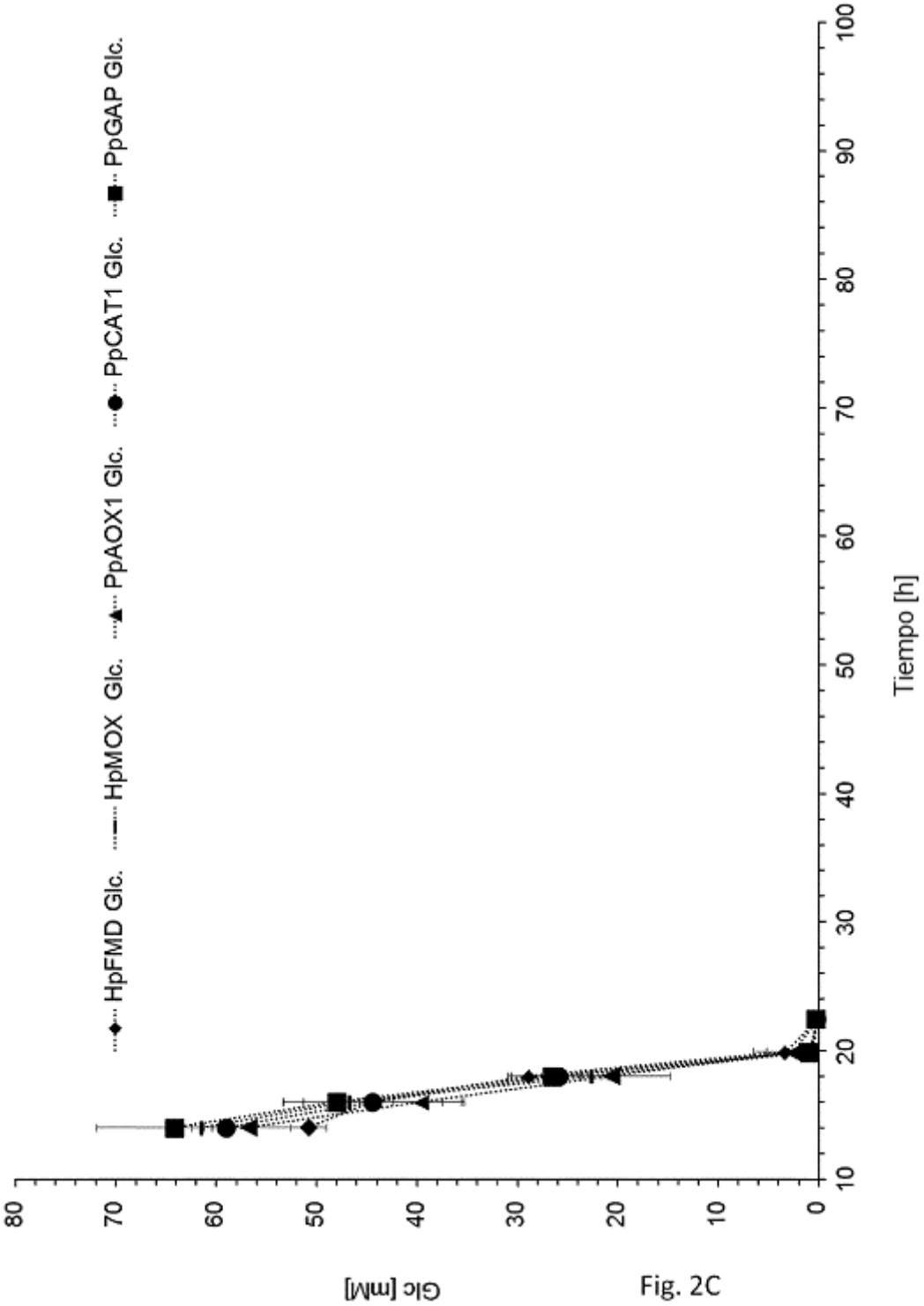
HpFMD Glc.
HpMOX Glc.
PpAOX1 Glc.
PpCAT1 Glc.
PpGAP Glc.
Glc [mM]
Tiempo [h]
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

Fig. 2C

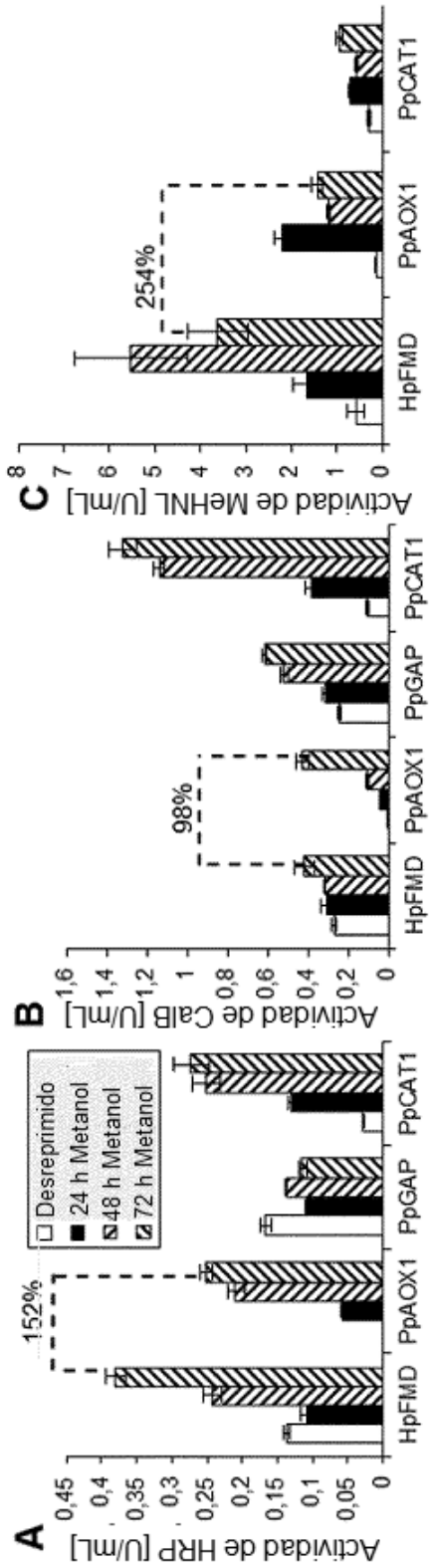
A
Actividad de HRP [U/mL]
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
152%
HpFMD
PpAOX1
PpGAP
PpCAT1
Desreprimido
24 h Metanol
48 h Metanol
72 h Metanol
B
Actividad de CalB [U/mL]
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
98%
HpFMD
PpAOX1
PpGAP
PpCAT1
C
Actividad de MeHNL [U/mL]
8
7
6
5
4
3
2
1
0
254%
HpFMD
PpAOX1
PpCAT1

Fig. 3