



(11) **EP 2 484 766 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
03.07.2013 Patentblatt 2013/27

(51) Int Cl.:
C12N 15/81 (2006.01) **C12R 1/645** (2006.01)
C12N 11/16 (2006.01)

(21) Anmeldenummer: **10180732.9**

(22) Anmeldetag: **28.09.2010**

(54) **Verfahren zum Herstellen eines Ziel-Proteins im Verbund mit einem heterologen Ferritin-Protein unter Verwendung von Hefe-Wirtszellen**

Method for producing a target protein connected with a heterogeneous ferritin protein using yeast host cells

Procédé de fabrication d'une protéine cible en relation avec une protéine de ferritine hétérologue en utilisant des cellules-hôtes de levure

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
08.08.2012 Patentblatt 2012/32

(73) Patentinhaber: **Artes Biotechnology GmbH**
40764 Langenfeld (DE)

(72) Erfinder:
• **Suckow, Manfred, Dr.**
40593 Düsseldorf (DE)
• **Eilert, Eva**
40223 Düsseldorf (DE)
• **Piontek, Michael, Dr.**
42549 Velbert (DE)

(74) Vertreter: **Zenz**
Patent- und Rechtsanwälte
Rüttenscheider Straße 2
45128 Essen (DE)

(56) Entgegenhaltungen:
KR-A- 20020 075 068

• **FABER K N ET AL: "Foreign gene expression in Hansenula polymorpha. A system for the synthesis of small functional peptides", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 45, Nr. 1-2, 1996, Seiten 72-79, XP009160678, ISSN: 0175-7598**

• **LEE JUNG-LIM ET AL: "Functional assembly of recombinant human ferritin subunits in Pichia pastoris", JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 17, Nr. 10, Oktober 2007 (2007-10), Seiten 1695-1699 URL, XP002678808, -& WO 02/40695 A1 (RNA INC [KR]; KIM HAE YEONG [KR]; LEE JUNG LIM [KR]; CHUNG DAE KYUN [K] 23. Mai 2002 (2002-05-23)**

• **SEO H -Y ET AL: "Enhanced expression and functional characterization of the human ferritin H- and L-chain genes in Saccharomyces cerevisiae.", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 63, Nr. 1, November 2003 (2003-11), Seiten 57-63, XP002678809, ISSN: 0175-7598**

• **VAD R ET AL: "Engineering of a Pichia pastoris expression system for secretion of high amounts of intact human parathyroid hormone", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 116, Nr. 3, 30. März 2005 (2005-03-30) , Seiten 251-260, XP027663548, ISSN: 0168-1656 [gefunden am 2005-03-30]**

• **EILERT EVA ET AL: "The use of highly expressed FTH1 as carrier protein for cytosolic targeting in Hansenula polymorpha", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 159, Nr. 3, Juni 2012 (2012-06), Seiten 172-176 URL, XP002678810,**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

EP 2 484 766 B1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Herstellen eines Ziel-Proteins, bei dem eine Zellkultur mit Wirtszellen einer Hefeart bereitgestellt werden, wobei die Wirtszellen eine DNA-Sequenz enthalten, die für das Ziel-Protein codiert, wobei die Wirtszellen mit Hilfe der für das Ziel-Protein codierenden DNA-Sequenz veranlasst werden, dass Ziel-Protein zu exprimieren, und wobei das Ziel-Protein aus der Zellkultur abgetrennt wird. Ferner bezieht sich die Erfindung auf die genannten Wirtszellen.

[0002] Verfahren der eingangs genannten Art, bei denen Hefearten der Gattungen *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Arxula*, *Schwanniomyces*, *Candida*, *Pichia* oder *Yarrowia* verwendet werden, sind zum Herstellen einer Vielzahl von rekombinanten Ziel-Proteinen bekannt. Beispielsweise werden die Hefen *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris* oder *Hansenula polymorpha* verwendet. Hefen werden für die heterologe Proteinexpression insbesondere deshalb verwendet, weil sie die Vorteile kurzer Generationszeiten und geringer Nährmedienansprüche mit denen einer posttranslationalen Modifikation eines eukaryotischen Faltungs- und Sekretionsapparates vereinen. Bei einer Vielzahl von Ziel-Proteinen werden hohe Expressionsraten erreicht, wobei für die Expression des gewünschten Ziel-Proteins ein starker Promoter eingesetzt wird, der zugleich ein Promoter für die Expression eines Enzymproteins ist, dass an einer Hauptstoffwechselfunktion der Hefe beteiligt ist. Beispielsweise wird bei der Hefe *Pichia pastoris* der Promoter von Alkoholoxidase (AOX1), die für die Oxidation von Methanol verantwortlich ist, bei der rekombinanten Proteinexpression verwendet. Bei Hefen wird sowohl eine intrazelluläre als auch eine sekretorische Expression heterologer Proteine genutzt.

[0003] Während bei einer Reihe von Ziel-Proteinen ausreichend hohe Expressionsraten erzielt werden, wird bei anderen Ziel-Proteinen nur eine unzureichend geringe Expressionsrate erreicht. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass einige sekretorisch exprimierte Proteine im sekretorischen Pfad eine unerwünschte posttranslationale Modifikation erfahren. Ferner wurde festgestellt, dass einige Ziel-Proteine eine unerwünschte Degradation erfahren.

[0004] Aufgabe der Erfindung ist es daher, eine höhere Ausbeute und einen korrekten Aufbau bei solchen Ziel-Proteinen zu erreichen, die bislang bei den oben genannten Hefe-Arten schwierig oder in unzureichender Menge oder Qualität zu exprimieren sind.

[0005] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Ferner wird diese Aufgabe durch Wirtszellen mit den Merkmalen des Anspruchs 13 gelöst.

[0006] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Herstellen eines Ziel-Proteins wird zunächst eine Zellkultur mit Wirtszellen einer Hefeart der Gattungen *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Arxula*, *Schwanniomyces*, *Candida*, *Pichia* oder *Yarrowia* bereitgestellt. Diese Wirtszellen enthalten wenigstens eine erste DNA-Sequenz, die für ein heterologes Ferritin-Protein codiert, und wenigstens eine zweite DNA-Sequenz, die für das Ziel-Protein codiert. Die wenigstens eine zweite DNA-Sequenz ist derart mit der wenigstens einen ersten DNA-Sequenz gekoppelt, dass bei der Expression der ersten und der zweiten DNA-Sequenz bzw. DNA-Sequenzen das Ziel-Protein an das zuvor synthetisierte Ferritin-Protein gekoppelt wird, so dass ein Verbund-Protein gebildet wird. Wenn hier davon gesprochen wird, dass die erste und die zweite DNA-Sequenz miteinander "gekoppelt" sind, so meint dies eine funktionelle Kopplung, welche zu dem Ergebnis der genannten Bildung eines Verbund-Proteins führt; die Kopplung ist aber nicht auf eine unmittelbare Aufeinanderfolge der beiden Sequenzen innerhalb einer einzigen DNA beschränkt. Der Schritt des Bereitstellens der Wirtszellen umfasst beispielsweise das Erzeugen eines entsprechenden Stammes, dem beispielsweise eine Erzeugung eines geeigneten Plasmid-Vektors vorausgeht, und die Vermehrung der Wirtszellen. Die Wirtszellen werden dann mit Hilfe der für das heterologe Ferritin-Protein codierenden ersten DNA-Sequenz und der für das Ziel-Protein codierenden zweiten DNA-Sequenz (beispielsweise durch Aktivierung eines Promoters durch Zugabe eines Induktors) veranlasst, das das Ferritin-Protein und das Ziel-Protein enthaltende Verbund-Protein zu exprimieren, wobei das Verbund-Protein in den Wirtszellen gehalten wird. Dann wird das Verbund-Protein aus der Zellkultur abgetrennt und schließlich das Ziel-Protein von dem Verbund-Protein abgetrennt.

[0007] Dementsprechend ist die erfindungsgemäße Wirtszelle eine Wirtszelle einer Hefeart der Gattungen *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Arxula*, *Schwanniomyces*, *Candida*, *Pichia* oder *Yarrowia*, wobei die Wirtszelle wenigstens eine erste DNA-Sequenz enthält, die für ein heterologes Ferritin-Protein codiert, und wenigstens eine zweite DNA-Sequenz enthält, die für das Ziel-Protein codiert, wobei die zweite DNA-Sequenz derart mit der ersten DNA-Sequenz gekoppelt ist, dass bei der Expression der ersten und der zweiten DNA-Sequenz das Ziel-Protein an das zuvor synthetisierte Ferritin-Protein gekoppelt wird, so dass ein Verbund-Protein gebildet wird, und das Verbund-Protein in den Wirtszellen gehalten wird.

[0008] Ferritin ist ein in den meisten Zellarten höherer Wirbeltiere, einschließlich des Menschen, sowie der meisten anderen Organismen zu findendes Protein, welches den Haupt-Eisenspeicher bildet. Ferritine von Wirbeltieren umfassen zwei Arten von Untereinheiten, welche leichte Kette (L) und schwere Kette (H) genannt werden. Beim Menschen sind die leichte und die schwere Kette zu 55% homolog; sie unterscheiden sich in ihrer Größe und Oberflächenladung und ihren Eisenbeladungseigenschaften. Natürliches Ferritin bildet kugelförmige Makromolekülpartikel, welche aus 24 strukturell gleichen Untereinheiten bestehen und welche in ihrem Inneren bis zu 4500 Eisenatome als ein Eisenoxyhydroxid-

Polymer speichern können.

[0009] Rekombinante Ferritin-Proteine wurden in verschiedenen Systemen erzeugt, so beispielsweise in *Escherichia coli* (siehe: P. Santambrogio, S. Levi, A. Cozzi, E. Rovidaj, A. Albertini und P. Aros, "Production and Characterization of Recombinant Heteropolymers of Human Ferritin H and L Chains", in *J. Biol. Chem.*, 268, 1993, S. 12744-12783), in *Saccharomyces cerevisiae* (siehe: Y. M. Shin, T. H. Kwon, K. S. Kim, K. S. Chae, D. H. Kim und M.S. Yang, "Enhanced Iron Uptake of *Saccharomyces cerevisiae* by Heterologous Expression of a Tadpole Ferritin Gene", in *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2001, S. 1280-1283), und in *Pichia pastoris* (siehe: J. L. Lee, H. S. Song, H. J. Kim, J. H. Park, D. K. Chung, C. S. Park, D. Jeung und H. Y. Kim, "Functional expression and production of human H-ferritin in *Pichia pastoris*", in *Biotechnol. Lett.* 25, 2003, S. 1019-1023). Es wurde gezeigt, dass durch heterologe Expression eines Kaulquappen-H-Ferritins die eisenspeichernden Eigenschaften von *Saccharomyces cerevisiae* um einen Faktor von 2,5 erhöht wurden. Bei einer humanes H-Ferritin exprimierenden *Pichia pastoris* wurde sogar eine 9,6-fache Erhöhung der Eisenspeichereigenschaft berichtet (siehe Lee et al., ebenda).

[0010] Der Erfindung liegt der Gedanke zugrunde, ein Verbund-Protein aus dem Ferritin-Protein und dem Ziel-Protein zu exprimieren und sich dabei die bei dem Ferritin beobachtete hohe Expressionsrate und außerdem den Umstand zu Nutze zu machen, dass das Verbund-Protein, wie auch das Ferritin-Protein allein, in das Zytosol exprimiert wird und nicht in den sekretorischen Pfad gelangt. Auf diese Weise ist es möglich, Ziel-Proteine zu exprimieren, die anderenfalls nicht oder nicht in der gewünschten Rate exprimiert werden könnten. Hierbei hat sich gezeigt, dass man rekombinante Ferritin-Proteine, insbesondere humanes H-Ferritin (FTH1), auch bei einer methyloptrophen Hefe, wie *Hansenula polymorpha*, mit einer außergewöhnlich hohen Expressionsrate herstellen konnte, welches sogar die des Schlüsselproteins des Methanolpfades übersteigt.

[0011] Die Ankopplung des Ziel-Proteins an das Ferritin-Protein erlaubt zudem eine relativ einfache Abtrennung des Verbund-Proteins aus der Kultur. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass das Ferritin-Verbund-Protein in großen Mengen im Zytosol der Zellen stabil verbleibt, wobei die Zelle wächst und weiter produziert. Da das Verbund-Protein nicht in den sekretorischen Pfad gelangt, erhält man ein unglykosyliertes Ziel-Protein, wodurch eine unerwünschte hefe-typische Glykosylierung vermieden wird.

[0012] Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die zweite DNA-Sequenz derart mit der ersten DNA-Sequenz gekoppelt, dass bei der Expression der ersten und der zweiten DNA-Sequenz das Ferritin-Protein N-terminal positioniert ist. Dies dient dazu, dass Verbund-Protein in das Zytosol der Hefezelle zu exprimieren.

[0013] Eine bevorzugte Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die zweite DNA-Sequenz über eine dritte DNA-Sequenz mit der ersten DNA-Sequenz gekoppelt ist, wobei die dritte DNA-Sequenz für ein Kopplungspeptid codiert, wobei bei der Expression der ersten, der zweiten und der dritten DNA-Sequenz das Kopplungspeptid an das zuvor synthetisierte Ferritin-Protein und das Ziel-Protein an das zuvor synthetisierte Kopplungspeptid gekoppelt wird. Vorzugsweise umfasst das Kopplungspeptid ein Spacer-Peptid, wobei das Spacer-Peptid bei der Expression der ersten, der zweiten und der dritten DNA-Sequenz an das zuvor synthetisierte Ferritin-Protein gebunden wird. Insbesondere ist vorzugsweise vorgesehen, dass das Spacer-Peptid eine Glycin-Kette umfasst, die aus einer bis 10, vorzugsweise aus drei Glycin-Gruppen besteht. Durch das Spacer-Peptid wird eine gewisse räumliche Trennung zwischen dem Ferritin-Protein und dem Ziel-Protein erreicht, was zum einen die gegenseitige strukturelle Beeinflussung der beiden Bestandteile des Verbund-Proteins verringert und zum anderen dazu beiträgt, die Abtrennung des Ziel-Proteins von dem Verbund-Protein zu erleichtern.

[0014] Bei einer bevorzugten Weiterbildung dieses Verfahrens umfasst das Kopplungspeptid ein Trennstellen-Peptid, das eine von einem Enzym auflösbare Trennstelle bildet, wobei das Ziel-Protein an das Trennstellen-Peptid gebunden wird, wobei im Schritt d) die Trennstelle derart aufgelöst wird, dass das Ziel-Protein freigesetzt wird. Beispielsweise ist das Enzym eine Enteropeptidase und das Trennstellen-Peptid eine Enteropeptidase-Trennstelle. Das Trennstellen-Peptid umfasst zum Beispiel eine DDDDK-Aminosäuresequenz. Diese bevorzugte Ausführungsform erleichtert die Abtrennung des Ziel-Proteins. In Kombination mit der Trennstelle erhöht das Spacer-Peptid die Wahrscheinlichkeit, dass die Enteropeptidase-Trennstelle so eingebaut wird, dass sie nicht deaktiviert wird.

[0015] Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens codiert die erste DNA-Sequenz für eine schwere Ferritin-Kette. Vorzugsweise codiert die erste DNA-Sequenz für ein humanes FTH1-Protein.

[0016] Bei einer anderen bevorzugten Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden im Schritt a) Wirtszellen einer methyloptrophen Hefeart der Gattungen *Hansenula* oder *Pichia* bereitgestellt. Vorzugsweise werden Wirtszellen der Gattung *Hansenula*, insbesondere Wirtszellen der *Hansenula polymorpha* bereitgestellt. Es hat sich gezeigt, dass bei diesen Hefearten besonders hohe Ausbeuten der Ferritin-Verbundproteine erreicht werden können.

[0017] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass das Ziel-Protein ein heterologes funktionelles Protein ist, wobei das Ziel-Protein homolog nicht in einer Kopplung mit dem Ferritin-Protein auftritt. Dies bedeutet, dass das Ziel-Protein ein funktionelles Protein ist, welches üblicherweise nicht in Kombination mit dem Ferritin-Protein exprimiert wird.

[0018] Das Ziel-Protein ist vorzugsweise ein humanes Protein. Eine bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass das Ziel-Protein eine Serinprotease, insbesondere matures humanes α 1-Antichymotrypsin, umfasst.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass das Ziel-Protein ein Peptidhormon, insbesondere matures humanes Interleukin oder humanes Parathyroid-Hormon oder ein Teilfragment davon, umfasst. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass das Ziel-Protein ein Interferon, insbesondere matures humanes Interferon- α , umfasst.

5 **[0019]** Vorteilhaft und/oder bevorzugte Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen gekennzeichnet.
[0020] Im Folgenden wird die Erfindung anhand bevorzugter Ausführungsformen näher erläutert. In den Zeichnungen zeigen:

10 Fig. 1: eine Plasmidkarte eines bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Wirtszellen verwendeten *H. polymorpha* FTH1-H6-Expressionsplasmids pFPMT-FTH1-H6;
 Fig. 2A und 2B: SDS-PAGE und Western Blot des Kulturüberstands und der intrazellulären löslichen und unlöslichen Fraktionen eines FTH1-H6 produzierenden Stamms und eines Negativkontrollstamms, wobei Fig. 2A die mit Ponceau Red angefärbte Nitrocellulose-Membran zeigt, wobei alle transferierten Proteinbanden angezeigt werden, und wobei Fig. 2B dieselbe Membran nach der immunologischen Detektion von Proteinen mit His Tag zeigt;
 15 Fig. 3: SDS-PAGE und Western Blot von Gesamtzellextrakten rekombinanter *Hansenula polymorpha*-Stämme, die Ferritin-mhACT - oder Ferritin-mhIL6-Verbund-Proteine synthetisieren;
 Fig. 4: SDS-PAGE und Western Blot der intrazellulären löslichen und unlöslichen Fraktionen rekombinanter *Hansenula polymorpha*-Stämme, die Ferritin-mhIFN α -2a-Verbund-Proteine synthetisieren;
 Fig. 5: SDS-PAGE der intrazellulären löslichen und unlöslichen Fraktionen von Stammgemischen oder Stämmen,
 20 die FTH1-G3-Ek-PTH-Verbund-Proteine oder FTH1-H6-Protein synthetisieren;
 Fig. 6: eine Abschätzung der Ausbeuten von intrazellulären löslichen FTH1-H6 und FTH1-G3-Ek-PTH mittels SDS-PAGE anhand eines Vergleichs mit einem Standardprotein; und
 Fig. 7A und 7B: eine Analyse von Partikelcharakter und Eisenbindung von intrazellulärem löslichem FTH1-H6 aus *H. polymorpha*, wobei Fig. 7A eine Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G250 zur Anzeige von Proteinbanden
 25 und Fig. 7B eine Anfärbung durch Preußisch-Blau-Reaktion zur Anzeige von Fe(III) zeigt.

Experimentelle Vorgehensweise und Ergebnisse

1. Erzeugung eines FTH1-Expressionsplasmids

30 **[0021]** Eine Aminosäuresequenz der schweren Kette des humanen Ferritin wurde aus der NCBI-Proteindatenbank gewonnen (NP_002023). Es wurde ein synthetischer offener Leserahmen (ORF - Open Reading Frame) entwickelt und für die Expression in *Hansenula polymorpha* optimiert (GeneArt). An das 3'-Ende der Sequenz wurden die Codons eines Sechs-Histidin-His-Tags (H6) hinzugefügt, um eine Analyse und Reinigung durch kommerziell verfügbare Kits und Antikörper zu ermöglichen. Dieser FTH1-H6-ORF wird flankiert von Erkennungssequenzen EcoRI (5'-Ende) und BamHI (3'-Ende), die mit dem kurzen Polylinker des *H. polymorpha*-Expressionsvektors pFPMT121 kompatibel sind. Um das Expressionsplasmid pFPMT-FTH1-H6 zu erzeugen, wurden das 6,968 kb EcoRI/BamHI-Fragment von pFPMT-ch-LysSS-6H-RVG und das 0,579 kb EcoRI/BamHI-Fragment des GeneArt-Plasmids 0830183_FTH1-H6_pMA miteinander verknüpft, und *E. coli* DH10 β wurden mit dieser Probe transformiert. Zehn Ampicillin-resistente *E. coli*-Klone wurden
 35 hinsichtlich des Vorhandenseins von restriktionspositiven Plasmid-Klonen analysiert. Die Plasmid-DNA von neun dieser Klone zeigten das erwartete Restriktionsmuster. Das Insert eines dieser Klone, pEE.5-1, wurde mit den Sequenzierprimern FMD-Pf und MOX-Tr (Qiagen, 27.11.2008) sequenziert. Es wurde gefunden, dass die Sequenz des Inserts vollständig korrekt ist. Die Abbildung von pFPMT-FTH1-H6 (pEE.5-1) ist in Figur 1 gezeigt.

40 **[0022]** Fig. 1 zeigt eine Plasmidkarte des *Hansenula polymorpha* FTH1-H6-Expressionsplasmids pFPMT-FTH1-H6 (pEE.5-1), wobei für die Elemente folgende Abkürzungen verwendet werden:

45 FMD-P: Promoter des *H. polymorpha* Formiatdehydrogenasegens (FMD);
 MOX-T: Terminator des *H. polymorpha* Methanoloxidasegens (MOX);
 ampR: Ampicillin-Resistenzgen;
 50 ori: Replikationsursprung aus pBR322;
 ScURA3: URA3-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* für die Selektion in *H. polymorpha* ura3-Stämmen;
 HARS1: Autonom replizierende Sequenz aus *H. polymorpha*;
 FTH1-H6: Fusions-ORF kodierend für humanes Ferritin (H-Kette) mit C-terminalem His-Tag (vgl. Sequenzprotokoll, SEQ ID NO. 1).
 55

[0023] Das auf die oben genannte Weise gewonnene FTH1-Expressionsplasmid bildete die Basis für die nachfolgend beschriebene Erzeugung eines rekombinanten *Hansenula polymorpha*-Stamms, welcher FTH1-H6 exprimiert.

[0024] Darüber hinaus bildete dieses Plasmid einen Ausgangspunkt für die unten im Abschnitt 3. beschriebene Er-

zeugung von Expressionsplasmiden, welche Verbund-Proteine kodieren, bei denen das Ferritin-Protein FTH1 mit bestimmten Ziel-Proteinen über ein Kopplungspeptid verbunden ist.

2. Erzeugung eines rekombinanten FTH1-H6 exprimierenden Hansenula polymorpha-Stamms

5
 [0025] Der Hansenula-polymorpha-Wirtsstamm RB11 (relevanter Genotyp *ura3*) wurde mit pFPMT-FTH1-H6 (pEE.5-1) transformiert, und 36 Uracil-prototrophische einzelne Kolonien wurden für Stammerzeugungen isoliert. Zu diesem Zweck lies man die Klone für 48 h bei 37 °C als 3ml-YNB/Glukose-Kulturen bei 180rpm wachsen (erster Durchlaufschritt).
 10 Nachfolgend wurden 20 µl Aliquots dieser Kulturen auf frische YNB/Glukose (3 ml) übertragen, welche erneut für 48 h bei 37 °C wuchsen (zweiter Durchlaufschritt). Nach dem vierten Durchlaufschritt wurden 20 µl Aliquots der verschiedenen Kulturen verwendet, um 3 ml Vollmediums (YPD) zu beimpfen. Die Kulturen wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert (180rpm; erster Stabilisierungsschritt). Ein zweiter Stabilisierungsschritt wurde durchgeführt; danach wurden Aliquots der verschiedenen Kulturen verwendet, um 3 ml YNB/Glukose zu beimpfen. Diese Kulturen wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert.
 15 Nach diesem abschließenden Auswahlsschritt wurden 3 µl jeder Kultur auf eine YNB/Glukose-Platte gebracht (dotted). Die sich ergebenden Dots wurden Pools genannt; sie stellen Mischungen von Stämmen dar, welche typischerweise ähnliche Eigenschaften haben, aber eine gewisse Mikroheterogenität in ihren individuellen Expressionsraten aufweisen. Wenn das Screening zu einer Identifikation produktiver Pools führt, müssen diese Pools in einzelne Stämme separiert werden, und ein Set von Stämmen pro Pool muss erneut analysiert werden. Der theoretische Hintergrund für die angewendete Art der Stammerzeugung ist folgender. Während der Durchlaufschritte wird das Plasmid in das Genom der verschiedenen Zellen integriert. Die Stabilisierungsschritte dienen als Werkzeug, um einen Plasmidverlust in Zellen mit episomalem Plasmid zu erzwingen. So können nach dem Aufbringen auf den Platten, die selektive Medien enthalten, nur solche Zellen, welche in das Genom integrierte Plasmidkopien enthalten, wachsen, um Kolonien zu bilden.

20 [0026] 15 Pools der Serien pEE.5-1/RB11 wurden einer Derepression/MeOH-Induktion im 3 ml-Teströhrchenmaßstab unterzogen. Die intrazellulären löslichen und unlöslichen Fraktionen wurden präpariert und durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Der Best-Producer-Pool wurde identifiziert und auf einer YNB/Glukose-Platte separiert. Einzelne Kolonien dieser Platte wurden isoliert und als Stämme definiert. Ein Stamm wurde weitergehenden Analysen unterzogen. Figur 2 zeigt einen Western-Blot des intrazellulären Materials dieses Stamms pEE.5-1/RB11 #2-1 nach Derepression/MeOH-Induktion.

30 [0027] Fig. 2 zeigt SDS-PAGE und Western Blot des Kulturüberstands und der intrazellulären löslichen und unlöslichen Fraktionen eines FTH1-H6-produzierenden Stamms und eines Negativkontrollstamms. Die angegebenen Stämme wurden einer Methanolinduktion im 3ml-Maßstab unterzogen. Zu diesem Zweck wurden 3ml YPD-Medium jeweils mit einer einzelnen Kolonie beimpft. Diese Vorkulturen wurden für 16 Stunden bei 37°C geschüttelt (180rpm). Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in 3ml sterilem Wasser resuspendiert. 20µl dieser Suspensionen wurden in 3ml YNB/2% Glycerin überführt. Diese Kulturen wurden für 48 Stunden geschüttelt (37°C, 180rpm). Während dieser Phase wird der FMD-Promotor dereprimiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in je 3ml YNB/1% Methanol resuspendiert. Diese Kulturen wurden wie oben beschrieben für weitere 24 Stunden inkubiert (Methanolinduktion). Anschließend wurden die Kulturüberstände und die intrazellulären löslichen und unlöslichen Fraktionen präpariert und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert. Zur Detektion wurde ein His Tag-spezifischer Antikörper (Kaninchen) in Kombination mit einem AP-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper und NBT/BCIP als Chromogen eingesetzt. Fig. 2A zeigt die mit Ponceau Red angefärbte Nitrocellulose-Membran, wobei alle transferierten Proteinbanden angezeigt werden. Fig. 2B zeigt dieselbe Membran nach der immunologischen Detektion von Proteinen mit His Tag. Der in diesem Experiment eingesetzte Negativkontrollstamm enthält den Vektor pFPMT121 ohne Insert.

35
 40
 45 [0028] Das Beladungsschema bei den in Figuren 2A und 2B gezeigten Spuren ist in der nachfolgenden Tabelle 1 dargestellt ("FTH1-H6" bezeichnet die für humanes Ferritin (H-Kette) codierende Fusions-ORF mit C-terminalem His-Tag; vgl. Sequenzprotokoll, SEQ ID NO. 1)).

Tabelle 1

1	Precision Plus Protein Standards			10µl
2	pEE.5-1/RB11 #2-1	FTH1-H6	intrazelluläre lösliche Fraktion	14µl
3	pEE.5-1/RB11 #2-1	FTH1-H6	intrazelluläre unlösliche Fraktion	14µl
4	pEE.5-1/RB11 #2-1	FTH1-H6	Kulturüberstand	14µl
5	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	intrazelluläre lösliche Fraktion	14µl
6	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	intrazelluläre unlösliche Fraktion	14µl
7	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	Kulturüberstand	14µl

EP 2 484 766 B1

[0029] Das FTH1-H6-Fusionsprotein hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von 22,05 kDa. Figur 2A zeigt die NC-Membran nach einem Semi-Dry-Transfer in dem Färbemittel Ponceau Red. Dieses Verfahren visualisiert sämtliche Proteinbanden. In den Spuren 2 und 3 sind die intrazelluläre lösliche bzw. unlösliche Fraktion des Ferritinstamms gezeigt. In beiden Spuren wurde ein Band sehr hoher Intensität, das einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 23 kDa entspricht, beobachtet, welches auf den Anti-His-Tag-Antikörper anspricht (Figur 2B, Spuren 2 und 3) und somit dem rekombinanten Ferritin entspricht. Das scheinbare und das berechnete Molekulargewicht stimmen überein, und die Tatsache, dass das Material durch den verwendeten Antikörper erkannt wird, zeigt, dass zumindest der C-terminale Teil des Proteins intakt sein muss. Der Überstand der Kultur pEE.5-1/RB11 # 2-1 zeigt kein Ferritin, was konsistent ist mit dem intrazellulären Verweilen des Fusions- oder Verbund-Proteins (vgl. Spuren 4 in Figuren 2A und 2B). Der Negativkontrollstamm pFPMT121/RB11 zeigt kein Ferritin (Spuren 5 bis 7) in den Figuren 2A und 2B).

[0030] Zusammenfassend ist festzustellen, dass

1. die Expression des zytosolischen FTH1-H6 enorm hohe Mengenanteile des heterologen Proteins zur Verfügung stellt. Das Ferritin-Band ist selbst nach MeOH-Induktion bei Weitem das dominante Band in der SDS-PAGE, welches sogar die Bänder übertrifft, die den Proteinen des Methanol-Pfades entsprechen, wie beispielsweise Moxp und Fmdp.
2. etwa 30 % des Proteins in der intrazellulären löslichen Fraktion und die übrigen 70 % in der intrazellulären unlöslichen Fraktion gefunden wurden.
3. Erzeugung von Expressionsplasmiden, die mit verschiedenen Zielproteinen verbundenes FTH1 codieren

[0031] Wie einleitend ausgeführt, liegt der Erfindung der Gedanke zugrunde, dass die hohen Expressionsraten des rekombinanten FTH1-H6-ORF genutzt werden können, um sogenannte Problemproteine als FTH1-Fusionsproteine zu exprimieren. Problemproteine sind solche, bei denen die Expressionsrate zu gering ist oder welche unerwünschte posttranslationale Modifikationen erfahren oder bei denen eine unerwünschte Degradation festzustellen ist.

[0032] Bei der Schaffung der Fusionsproteine ist folgendes zu beachten:

Erstens sollte der FTH1-H6-Teil des Fusionsproteins N-terminal positioniert sein, um ein Verbleiben im Zytosol zu erzielen.

[0033] Zweitens sollten, um einen flexiblen Übergang zwischen FTH1 und dem Zielprotein zu erreichen, beispielsweise drei Glycinreste (G3) zwischen den Fusionspartnern hinzugefügt werden.

[0034] Drittens sollte, um die Option des Freigebens des Zielproteins zu erleichtern, eine Enterokinase-Schnittstelle (Ek; DDDDK) oder eine andere Spaltstelle zwischen dem G3-Spacer und der Zielproteinsequenz positioniert sein.

[0035] Die Struktur des Fusionsproteins wäre dann: FTH1-G3-Ek-Ziel-protein (+/- Tag). Um das Konzept zu testen, wurden vier verschiedene Proteine als Fusionspartner gewählt:

1. ein maturaer humaner α 1-Antichymotrypsin-Precursor (hACT), wobei die Sequenz aus der Zugriffsnummer P01011 gewonnen wurde;
2. matures humanes Interleukin 6 (hIL6), wobei die Sequenz aus der Zugriffsnummer NP_000591 gewonnen wurde;
3. matures humanes Interferon α -2a (IFN α -2a); und
4. Teilfragment des humane Parathyroid-Hormons (PTH) (Zugriffsnummer NP_000306.1).

[0036] Die Plasmidkonstruktionen sind in der nachfolgenden Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2:

Fusionsprotein	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Charakterisierter Plasmid-Klon
FTH1-G3-Ek-hACT-H6	pEE.1-1 BsrGI/EcoRI 8,083 kb	pEE.5-1 EcoRI/ BstEII 0,453 kb	GeneArt plasmid 0908426_256_pMA BstEII/BsrGI 0,234 kb	pFPMT-FTH1-G3-Ek- mhACT-H6 (pEE. 11-1)
FTH1-G3-Ek-hIL6-H6	pEE.4-1 ClaI/EcoRI 7,471 kb	pEE.5-1 EcoRI/ BstEII 0,453 kb	GeneArt plasmid 0908655_348_pMA-RQ BstEII/ClaI 0,202 kb	pFPMT-FTH1-G3-Ek- mhIL6-H6 (pEE.12-2)

EP 2 484 766 B1

(fortgesetzt)

	Fusionsprotein	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Charakterisierter Plasmid-Klon
5	FTH1-G3-Ek-IFN α -2a	pFW.2-5 BgIII/EcoRI 7,406 kb	pEE.5-1 EcoRI/BstEII 0,453 kb	GeneArt plasmid 0908655_348_pMA-RQ BstEII/BgIII 0,193 kb	pFPMT-FTH1-G3-Ek-IFN α 2a (pEE.13-7)
10	FTH1-G3-Ek-PTH	pEE.5-1 EcoRI/BamHI 6.968kb	pEE.5-1 EcoRI/BstEII 0,453 kb	GeneArt plasmid 0939988_EE14-15 BstEII/BamHI 0.234kb	pFPMT-FTH1-G3-EK-PTH (per.14-2)

[0037] Die Spalte "Fusionsprotein" kennzeichnet die Zusammensetzung der verschiedenen Fusionsproteine. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet:

- 15
- FTH1: humanes Ferritin, schwere Kette;
 - G3: 3-Glycin-Spacer;
 - Ek: Enterokinase- bzw. Enteropeptidase-Schnittstelle (DDDDK);
 - H6: 6-Histidin-His-Tag;
 - 20 hACT: humanes α 1-Antichymotrypsin;
 - hIL6: humanes Interleukin 6
 - IFN α -2a: Interferon- α -2a;
 - PTH: Parathyroid-Hormon;
 - m: matur (reif);
 - 25 h: human;
 - EcoRI, BstEII, BamHI, BgIII, ClaI, BsrGI: für die Fragmentgenerierungen eingesetzte Restriktionsenzyme.

[0038] Die Spalten "Fragment 1" bis "Fragment 3" listen die Plasmid-Fragmente auf, die bei den jeweiligen Verknüpfungen beteiligt sind. In sämtlichen Fällen wurde eine 3-Fragment-Ligation ausgeführt. Die DNA-Fragmente wurden über 1 %-Agarosegele isoliert. Proben jeder Ligationsreaktion wurden in E.coli DH10 β eingeführt. Ein bis zwei restriktionspositive Plasmid-Klone pro Serie wurden zum Sequenzieren des Inserts ausgewählt. Die letzte Spalte zeigt den jeweiligen Zielplasmidklon mit korrekter Insertsequenz, der für nachfolgende Hefestammgenerierungen eingesetzt wurde.

4. Erzeugung von H. polymorpha-Stämmen, die verschiedene FTH1-Verbund-Proteine exprimieren

4.1 mhACT und mhIL6

[0039] Die Expressionsplasmide pFPMT-FTH1-G3-Ek-mhACT-H6 (pEE.11-1) und pFPMT-FTH1-G3-Ek-mhIL6-H6 (pEE.12-2) (vgl. Tabelle 2) wurden in den H. polymorpha Stamm RB11 eingebracht, und je 24 sich ergebende Uracil-prototrophe Kolonien wurden für Stammerzeugungen verwendet, wie sie in dem obigen Abschnitt 2. beschrieben worden ist (mit der Ausnahme, dass die Anzahl der Durchlaufschritte auf drei reduziert wurde). Die Identifikation des Best-Producer-Stamms wurde wie oben für FTH1-H6 beschrieben, ausgeführt. Wiederum wurde ein His-Tag-spezifischer primärer Antikörper zur Erfassung der Fusionsproteinbänder verwendet. Ein starker Erzeugerstamm jeder Serie und der FTH1-H6-Expressionsstamm pEE.5-1/RB11 #2-1 (siehe oben, Abschnitt 2.) wurden parallel einer Derepression/MeOH-Induktion in dem 3 ml-Teströhrchenmaßstab ausgesetzt, und die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE/Western-Blot analysiert. Das Ergebnis ist in Figur 3 dargestellt.

[0040] Fig. 3 zeigt eine SDS-PAGE und einen Western Blot von Gesamtzellextrakten von rekombinanten H. polymorpha-Stämmen, die FTH1-G3-EK-mhACT-H6 oder -mhIL6-H6 exprimieren. Die angegebenen Stämme wurden einer Methanolinduktion unterzogen. Anschließend wurden die Gesamtzellextrakte präpariert und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert. Die experimentellen Prozeduren wurden oben in Verbindung mit Fig. 2 beschrieben.

[0041] Das Beladungsschema bei den in Figur 3 gezeigten Spuren ist in der nachfolgenden Tabelle 3 angegeben (Abkürzungen: mhACT: matures humanes α 1-Antichymotrypsin; mhIL6: matures humanes Interleukin 6; G3: Spacer-Peptid bestehend aus drei Glycinresten; Ek: Enterokinase-Erkennungsstelle; H6: Sechs-Histidin-His Tag);

EP 2 484 766 B1

Tabelle 3:

1	Precision Plus Protein Standards			10 μ l
2	pEE.5-1/RB11 #2-1	FTH1-H6	Gesamtzellextrakt	30 μ l
3	pEE.11-1/RB11 #1-3	FTH1-G3-Ek-mhACT-H6	Gesamtzellextrakt	30 μ l
4	pEE.12-2/RB11 #1-1	FTH1- G3-Ek-mhIL6-H6	Gesamtzellextrakt	30 μ l
5	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	Gesamtzellextrakt	30 μ l

[0042] Bei sowohl FTH1-G3-Ek-mhACT-H6 als auch FTH1-G3-Ek-mhIL6-H6 konnten spezifische Produktbänder der erwarteten Molekulargewichte erzielt werden (vgl. Figur 3, Spuren 3 und 4). Jedoch erreichten bei diesem Experiment die Ausbeuten nicht diejenigen, die bei FTH1-H6 allein beobachtet wurden (vgl. Spur 2). Es ist ein gut bekanntes Phänomen bei der rekombinanten Genexpression im *Hansenula polymorpha*, dass infolge der ungerichteten Mehrkopien-Integration des Expressionsvektors die beobachteten Produktivitäten signifikant zwischen einzelnen Experimenten variieren können.

[0043] Nachfolgende Analysen erbrachten, dass in beiden Fällen etwa 90 % der Fusionsproteine in der intrazellulären unlöslichen Fraktion gefunden worden. Eine Kulturoptimierung kann hilfreich sein, um die Produktivität dieser Stämme zu verbessern. Die Optimierung von Zellauflösungsbedingungen könnte zu einer Erhöhung des löslichen Produktes führen.

[0044] Für sowohl IL6 als auch ACT kann die Expression als Ferritin-Fusionsprotein Vorteile bieten:

1. Die bekannte Expression von sekretorischen mhIL6 ergab, dass eine Subpopulation der Moleküle N-glykosyliert ist. Die Daten bei dem FTH1-G3-Ek-mhIL6-H6-Fusionsprotein markieren einen erfolgreichen Beweis, dass das Prinzip der Verwendung des Ferritins als Fusionspartners zum Erzeugen unglykosylierten mhIL6 funktioniert.
2. Im Falle des mhACT führte die zuvor durchgeführte sekretorische Expression zu schlecht verarbeitetem Material. Die intrazelluläre Expression des FTH1-G3-Ek-mhACT-H6-Fusionsproteins schafft die Möglichkeit, reifes ACT korrekter Größe durch Trennen mit Enterokinase freizusetzen.

4.2 mhIFN α -2a

[0045] Die Stammerzeugung für die pFPMT-FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a-Serien (pEE.13-7/RB11) wurde wie oben beschrieben ausgeführt (drei Durchlaufschritte). Jedoch wurden in diesem Falle nur Pools, aber keine einzelnen Stämme analysiert. Figur 4 zeigt die Analyse der intrazellulären löslichen und unlöslichen Fraktionen von sieben resultierenden Pools bei Derepression/MeOH-Induktion in dem 3 ml-Teströhrchenmaßstab, wie es oben beschrieben ist. Für die Detektion wurde ein IFN α -spezifischer Antikörper verwendet.

[0046] Fig. 4 zeigt SDS-PAGE und Western Blot der intrazellulären löslichen und unlöslichen Fraktionen von rekombinanten *H. polymorpha*-Stammgemischen, die FTH1-IFN α -2a-Fusionsgene exprimieren. Die genannten Stammgemische wurden einer Methanolinduktion unterzogen. Anschließend wurden die löslichen und unlöslichen intrazellulären Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht, wie es oben zu Fig. 2 beschrieben ist.

[0047] Das Beladungsschema ist in der nachfolgenden Tabelle 4 angegeben (Abkürzungen: mhIFN α -2a: matures humanes Interferon α -2a; G3: Spacer-Peptid bestehend aus drei Glycinresten; Ek: Enterokinase-Erkennungsstelle; H6: Sechs-Histidin-His Tag).

Tabelle 4:

1	Precision Plus Protein Standards			10 μ l
2	pEE.13-7/RB11 #1	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre lösliche Fraktion	30 μ l
3	pEE.13-7/RB11 #2	FTH1-G3-Ek- mhIFN α -2a	intrazelluläre lösliche Fraktion	30 μ l
4	pEE.13-7/RB11 #3	FTH1-G3-Ek- mhIFN α -2a	intrazelluläre lösliche Fraktion	30 μ l
5	pEE.13-7/RB11 #4	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre lösliche Fraktion	30 μ l
6	pEE.13-7/RB11 #5	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre lösliche Fraktion	30 μ l
7	pEE.13-7/RB11 #6	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre lösliche Fraktion	30 μ l
8	PEE.13-7/RB11 #7	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre lösliche Fraktion	10 μ l
9	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	intrazelluläre lösliche Fraktion	30 μ l

EP 2 484 766 B1

(fortgesetzt)

10	pEE.13-7/RB11 #1	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre unlösliche Fraktion	10 μ l
11	pEE.13-7/RB11 #2	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre unlösliche Fraktion	10 μ l
12	pEE.13-7/RB11 #3	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre unlösliche Fraktion	10 μ l
13	pEE.13-7/RB11 #4	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre unlösliche Fraktion	10 μ l
14	pEE.13-7/RB11 #5	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre unlösliche Fraktion	10 μ l
15	pEE.13-7/RB11 #6	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre unlösliche Fraktion	10 μ l
16	pEE.13-7/RB11 #7	FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a	intrazelluläre unlösliche Fraktion	10 μ l
17	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	intrazelluläre unlösliche Fraktion	10 μ l
18	Interferon α -2a Standard			20 μ l

[0048] Ein indirekter Vergleich erbrachte, dass die für die stärksten Pools, die FTH1-G3-Ek-mhIFN α -2a exprimieren, beobachteten Ausbeuten (siehe beispielsweise Figur 4, Spur 12) in der Größenordnung waren, die für den Stamm pEE. 5-1/RB11 #2-1 (der FTH1-H6 exprimiert, siehe Figur 2) beobachtet wurde. Jedoch wurde, wie in den Fällen der FTH1-G3-Ek-mhACT-H6- und FTH1-G3-Ek-mhIL6-H6-exprimierenden Stämme, die Mehrheit des Produkts in der intrazellulären unlöslichen Fraktion beobachtet (Figur 4, vgl. Spuren 2 bis 8 und 10 bis 16). Wiederum kann eine Optimierung der Zellaufhebungsbedingungen hilfreich sein, um den Anteil des löslichen Produkts zu erhöhen.

[0049] Es ist bekannt, IFN α -2a effizient in sekretorischer Form in *H. polymorpha* zu erzeugen, was einen beträchtlichen Prozentsatz inkorrekt verarbeiteter Vorformen (Precursor) zeigt, was es sehr schwierig macht, korrektes IFN α -2a zu reinigen. Eine intrazelluläre Produktion und eine In-Vitro-Reifung überwindet dieses Problem, da die korrekte Form aus dem FTH1-G3-Ek-IFN α -2a-Fusionsprotein durch Enterokinase-Digestion freigesetzt werden kann.

4.3 PTH

[0050] In den voranstehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass Fusionsproteine, die aus FTH1-G3-Ek-mhACT-H6, -mhIL6-H6 und -mhIFN α -2a bestehen, in *H. polymorpha* in beträchtlichen Mengen erzeugt werden könnten. Während diese Zielproteine auch als sekretorische MF α -Prepro-Fusionsproteine exprimiert werden könnten, sind das humane Parathyroid-Hormon sowie Teilfragmente davon (PTH) als Problemproteine bekannt. Ein Teilfragment des Parathyroid-Hormons wird zwar exprimiert und sekretiert, aber rapide in dem Kulturrückstand abgebaut.

[0051] Es wurde ein Expressionsplasmid pFPMT-FTH1-G3-Ek-PTH (pEE.14-2; vgl. Tabelle 1) in *H. polymorpha* RB11 eingeführt, und eine Reihe von 36 Pools wurde erzeugt. Figur 5 zeigte eine SDS-PAGE-Analyse von vier dieser Pools in direktem Vergleich mit dem FTH1-H6-Stamm pEE.5-1/RB11 #2-1 und einem Negativkontrollstamm bei Derepression/MeOH-Induktion in YNB-Medium.

[0052] Fig. 5 zeigt SDS-PAGE der intrazellulären löslichen und unlöslichen Fraktionen von Stammgemischen oder Stämmen, die FTH1-G3-Ek-PTH oder FTH1-H6 exprimieren. Methanolinduktion und Präparation der intrazellulären löslichen und unlöslichen Fraktionen der angegebenen Stämme und Stammgemische erfolgte so wie es zu Fig. 2 beschrieben wurde. Nach SDS-PAGE wurde das Proteingel mit Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt.

[0053] Das Beladungsschema ist in der nachfolgenden Tabelle 5 angegeben (Abkürzungen: PTH: Teilfragment des humanen Parathyroid-Hormons; alle weiteren: siehe oben zu Fig. 3).

Tabelle 5:

1	Precision Plus Protein Standards			10 μ l
2	pEE.14-2/RB11 #9	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	17,5 μ l
3	pEE.14-2/RB11 #9	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre unlösliche Fraktion	17,5 μ l
4	pEE.14-2/RB11 #15	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	17,5 μ l
5	pEE.14-2/RB11 #15	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre unlösliche Fraktion	17,5 μ l
6	pEE.14-2/RB11 #20	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	17,5 μ l
7	pEE.14-2/RB11 #20	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre unlösliche Fraktion	17,5 μ l
8	pEE.14-2/RB11 #23	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	17,5 μ l

EP 2 484 766 B1

(fortgesetzt)

9	pEE.14-2/RB11 #23	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre unlösliche Fraktion	17,5µl
10	pEE.5-1/RB11 #2-1	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	17,5µl
11	pEE.5-1/RB11 #2-1	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre unlösliche Fraktion	17,5µl
12	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	intrazelluläre lösliche Fraktion	17,5µl
13	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	intrazelluläre unlösliche Fraktion	17,5µl

[0054] Figur 5 sind zwei hervorstechende Ergebnisse zu entnehmen. Erstens kann das FTH1-G3-Ek-PTH-Fusionsprotein bei sehr hohen Pegeln exprimiert werden (siehe Spuren 2 bis 9), welche zumindest in der Größenordnung liegen, die bei FTH1-H6 beobachtet wurde (Spuren 10 und 11). Somit stellt diese erfindungsgemäße Herstellung das erste Beispiel einer effizienten PTH-Expression in *H. polymorpha* dar.

[0055] Zweitens: während die Mehrheit (etwa 70 %) des FTH1-H6-Genprodukts in der intrazellulären unlöslichen Fraktion gefunden wird (vgl. Spuren 10 und 11; siehe auch Spuren 2 und 3 der Figur 2), verhält sich das FTH1-G3-Ek-PTH-Genprodukt anders: Die Mehrheit (etwa 90 %) wird in der intrazellulären löslichen Fraktion gefunden (vgl. Spuren 2/3, 4/5, 6/7 und 8/9).

[0056] Diese bei dem FTH1-G3-Ek-PTH-Fusionsprotein gewonnenen Daten markieren den erfolgreichen Praxisbeleg für das Funktionieren des Prinzips, Ferritine als Funktionspartner für schwer zu exprimierende Proteine zu verwenden.

5. Bestimmung der Ausbeute von intracellulär löslichem FTH1-H6 und FTH1-G3-Ek-PTH-Protein in *H. polymorpha*

[0057] Es wurden die Ausbeuten des Ferritin und seiner Fusionsproteine bei Derepression/MeOH-Induktion in *H. polymorpha* untersucht. Zu diesem Zweck wurden Pools pEE.14-2/RB11 #20 und pEE.14-2/RB11 #23 (beide exprimieren FTH1-G3-Ek-PTH; vgl. Figur 5) auf YNB/Glukoseplatten separiert, und einzelne Kolonien wurden isoliert und als Stämme definiert. Jeweils ein Stamm jedes Pools wurde ausgewählt und einer neuen Derepression/MeOH-Induktion in der beschriebenen Weise unterzogen (3 ml Maßstab; 37 °C; 180rpm). Der Stamm pEE.5-1/RB11 #2-1 (der FTH1-H6 ohne Fusionspartner exprimiert) wurde parallel auf die gleiche Weise kultiviert. Die Stämme erreichten bei diesem Experiment die folgenden OD600-Werte: pEE.5-1/RB11 #2-1: 3,58; pEE.14-2/RB11 #20-1: 7,54 und pEE.14-2/RB11 #23-3: 7,80. Die intrazellulären löslichen Fraktionen wurden aufbereitet, und es wurde für jeden Stamm eine Reihe von Verdünnungsschritten ausgeführt. Zusammen mit einer Verdünnungsserie eines Standardproteins (in diesem Falle Interferon α -2a) wurden die Proben separiert auf einem 4-12 % Bis-Tris-Proteingel (denaturierend/reduzierend). Dieses Gel ist in Figur 6 gezeigt.

[0058] Fig. 6 zeigt eine Abschätzung der Ausbeuten von intrazellulärem löslichem FTH1-H6 und FTH1-G3-Ek-PTH mittels SDS-PAGE anhand eines Vergleichs mit einem Standardprotein. Nach Methanolinduktion der angegebenen Stämme wie oben zu Fig. 2 beschrieben wurden die intrazellulären löslichen Fraktionen präpariert. Von diesem Material wurden Verdünnungsserien angelegt und mittels SDS-PAGE analysiert. Als Standardprotein wurde gereinigtes Interferon α -2a mit bekannter Konzentration eingesetzt. Das Proteingel wurde nach Beendigung der Auftrennung mit Coomassie Brilliant Blue G250 anfärbt.

[0059] Das Beladungsschema ist in der nachfolgenden Tabelle 6 angegeben (Abkürzungen: KV: Kulturvolumen; alle weiteren siehe oben zu Fig. 2).

Tabelle 6:

1	Precision Plus Protein Standards			10µl
2	Interferon α -2a			250ng
3	Interferon α -2a			500ng
4	Interferon α -2a			750ng
5	keine Beladung			
6	pEE.5-1/RB11 Stamm #2-1	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	22,0µl KV
7	pEE.5-1/RB11 Stamm #2-1	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	11,0µl KV
8	pEE.5-1/RB11 Stamm #2-1	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	7,3µl KV
9	pEE.5-1/RB11 Stamm #2-1	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	5,5µl KV

EP 2 484 766 B1

(fortgesetzt)

10	pEE.14-2/RB11 Stamm #20-1	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	11,6µl KV
11	pEE.14-2/RB11 Stamm #20-1	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	7,7µl KV
12	pEE.14-2/RB11 Stamm #20-1	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	5,8µl KV
13	pEE.14-2/RB11 Stamm #20-1	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	4,6µl KV
14	pEE.14-2/RB11 Stamm #23-3	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	11,2µl KV
15	pEE.14-2/RB11 Stamm #23-3	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	7,5µl KV
16	pEE.14-2/RB11 Stamm #23-3	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	5,6µl KV
17	pEE.14-2/RB11 Stamm #23-3	FTH1-G3-Ek-PTH	intrazelluläre lösliche Fraktion	4,5µl KV

[0060] Für eine Abschätzung der Ausbeuten des aus *H. polymorpha* gewonnenen Materials haben wir die Proben mit den jeweiligen Kulturvolumina korreliert, die dem in den verschiedenen Spuren zu sehenden Material entsprechen. Unsere Abschätzung war folgende:

1. 750ng Interferon α -2a (Spur 4) könnte FTH1-H6 von 7,3µl Kulturvolumen (Spur 8) entsprechen. Gemäß dieser Abschätzung hat der Stamm pEE.5-1/RB11 #2-1 100mg FTH1-H6 L⁻¹ erzeugt.
2. Gemäß dieser Berechnung könnte Spur 6 $3 \times 750\text{ng} = 2,25\mu\text{g}$ Protein entsprechen.
3. Verglichen mit Spur 6 (2,25µg FTH1-H6) könnten die Spuren 13 (pEE.14-2/RB11 Stamm 20-1; Material entspricht 4,6µl Kulturvolumen) und 17 (pEE.14-2/RB11 Stamm 23-3; Material entspricht 4,5µl Kulturvolumen) 2,25µg bis 4,5µg FTH1-G3-Ek-PTH enthalten.
4. Gemäß dieser Abschätzung hat der Stamm pEE.14-2/RB11 #20-1 und -23-3 0,5g bis 1g FTH1-G3-Ek-PTH Protein pro Liter in dem 3ml-Teströhrchenmaßstab erzeugt (wobei finale OD600-Werte von 7,54 bzw. 7,80 erreicht wurden).
5. Es sei angenommen, dass *H. polymorpha* eine finale OD600 von 250 bei einer Fermentation mit hoher Zelldichte erreichen könnte. Dann würden wir eine Erhöhung der erlangten Ausbeute im Vergleich zu dem Teströhrchenmaßstab erwarten. Wir können uns vorstellen, dass die Werte für intrazelluläres FTH1-G3-Ek-PTH in die Größenordnung der gegenwärtigen Höchstwerte kommen können (sekretorische Phytase, 13,4g L⁻¹; siehe Meyer A. F., et al., "An expression system matures: a highly efficient and costeffective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*", *Biotechnol. Bioeng.* 63, 1999, Seiten 373-381). Die Abschätzung der Ausbeuten sind in Tabelle 7 zusammengefasst:

Tabelle 7:

Stamm	Protein	OD600	Ausbeute in der intrazellulären löslichen Fraktion (g L ⁻¹)
pEE.51/RB # 5-1	FTH1-H&	3,85	0,1
pEE.14-2/RB11 # 20-1	FTH1-G3-Ek-PTH	7,54	0,5 - 1,0
PEE.14-2/RB11 # 23-3	FTH1-G3-Ek-PTH	7,80	0,5 - 1,0

[0061] Tabelle 7 zeigt die Ausbeuten von FTH1-H6 oder FTH1-G3-Ek-PTH in der intrazellulären löslichen Fraktion, wie es ausgehend von dem in Figur 6 gezeigten Proteingel abgeschätzt wurde.

6. Analyse des Partikelcharakters und der Eisenbindekapazität von in *H. polymorpha* erzeugtem intracellulärem löslichem Ferritin

[0062] Um zu analysieren, ob das aus *H. polymorpha* abgeleitete FTH1-H6-Material Partikel bildet, wurden der Stamm pEE.5-1/RB11 # 2-1 und ein Negativkontrollstamm kultiviert (Derepression/- MeOH-Induktion in YNB; 37 °C; 180rpm; 3 ml-Maß), und die intrazellulären löslichen Fraktionen wurden aufbereitet. Vor dem Einstellen auf 1 x native und nicht-reduzierende Probenpufferbedingungen wurden die Proben auf dreierlei verschiedene Weise behandelt. 1. Ohne weitere Behandlung; 2. durch Einstellung auf 1 mM Ammonium-Fe(II)-Sulfat, gefolgt von 15' Inkubation bei Raumtemperatur; und 3. wie bei 2., aber mit einer zusätzlichen Inkubation für 15' bei 75 °C (Denaturierung). Aliquots dieser Proben wurden auf 5 %-Tris-HCl-Acrylamidgelen unter nativen und nichtreduzierenden Bedingungen separiert. Ein Gel wurde mit

EP 2 484 766 B1

Coomassie Blue gefärbt, um Proteinbanden sichtbar zu machen. Dies ist in Figur 7A gezeigt. Ein anderes Gel wurde einer Preussisch-BlauFärbung ausgesetzt, wie sie von Kim et al. "Expression of Heteropolymeric Ferritin Improves Iron Storage in *Saccharomyces cerevisiae*", Appl. Environ. Microbiol. 69, 2003, S. 1999 bis 2005, beschrieben ist, welche Fe(III) anzeigt. Dies ist in Figur 7B gezeigt. Die Spuren 1 und 5 zeigen die Proben ohne weitere Behandlung. Die Spuren 2 und 6 zeigen die Proben, die mit Ammonium-Fe(II)-Sulfat auf eine Endkonzentration von 1mM eingestellt und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Spuren 3 und 7 zeigen die Proben, die für 15 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 15 Minuten bei 75°C inkubiert wurden. Die dominanten Banden in Figur 7A und B, Spuren 6, zeigten exakt die gleiche Mobilität. Das Beladungsschema ist in der nachfolgenden Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8:

1	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	keine weitere Behandlung	15µl
2	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	1mM Ammonium-Fe(II)-Sulfat / 15' Raumtemperatur	15µl
3	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	1mM Ammonium-Fe(II)-Sulfat / 15' Raumtemperatur /15' 75°C	15µl
4	keine Beladung			
3	pEE.5-1/RB11 Stamm #2-1	FTH1-H6	keine weitere Behandlung	15µl
4	pEE.5-1/RB11 Stamm #2-1	FTH1-H6	1mM Ammonium-Fe(II)-Sulfat / 15' Raumtemperatur	15µl
5	pEE.5-1/RB11 Stamm #2-1	FTH1-H6	1mM Ammonium-Fe(II)-Sulfat / 15' Raumtemperatur /15' 75°C	15µl

[0063] Wie es in Figur 7A gezeigt ist, erzeugt das Material des Ferritin-Stamms, das gemäß den Verfahren 1 oder 2 behandelt worden ist, Banden (Spuren 5 und 6), während das entsprechende Material des Negativkontrollstamms keine Banden an diesen Positionen erzeugt (Spuren 1 und 2). Das Erscheinen der Banden unter diesen Gelbedingungen ist als Hinweis darauf zu verstehen, dass durch das FTH1-H6-Protein Partikel gebildet wurden.

[0064] Figur 7B ist zu entnehmen, dass das Material des Ferritin-Stamms unter Bedingung 2 (1mM Ammonium-Fe(II)-Sulfat/15' Inkubation bei Raumtemperatur) ein Eisensignal zur Verfügung stellt (Figur 7B, Spur 6), welches exakt mit den mutmaßlichen Ferritin-Partikel-Banden, die in Figur 7A gezeigt sind (Spur 6) komigriert. Die ohne weitere Behandlung mit Ammonium-Fe(II)-Sulfat (Figur 7A, Spur 5) auftretenden Partikel-Banden zeigen kein Eisensignal (Figur 7B, Spur 5). Der Negativkontrollstamm zeigt keine entsprechenden Banden oder Signale (Figuren 7A und B, Spuren 1 bzw. 2).

[0065] Wir interpretieren diese Ergebnisse wie folgt: 1. Die Expression von FTH1-H6 in *H. polymorpha* führt zu Ferritin-Partikeln. 2. Diese Partikel fügen sich mit oder ohne hohe Eisenkonzentrationen zusammen. 3. Die Partikel können Eisen binden und speichern, sofern es verfügbar ist.

[0066] Anliegend sind im Anhang A die Sequenzen für folgende oben genannte Plasmide und Proteine beigefügt:

- | | | |
|-----|------------------------------------------|---------------|
| 1. | pFPMT-CL pre-mhACT-H6 (pEE.1-1) : | SEQ ID NO: 1 |
| 2. | pFPMT-CL pre-mhCGb-H6 (pEE.2-2) : | SEQ ID NO: 2 |
| 3. | pFPMT-CL pre-mhIL6-H6 (pEE.4-1) : | SEQ ID NO: 3 |
| 4. | pFPMT-FTH1-H6 (pEE.5-1) : | SEQ ID NO: 4 |
| 5. | pFPMT-FTH1-G3-Ek-mhACT-H6 (pEE.11-1) : | SEQ ID NO: 5 |
| 6. | pFPMT-FTH1-G3-Ek-mhIL6-H6 (per.12-2) : | SEQ ID NO: 6 |
| 7. | pFPMT-FTH1-G3-Ek-IFNalpha-2a (pEE.13-7): | SEQ ID NO: 7 |
| 8. | pFPMT-FTH1-G3-EK-PTH (per.14-2) : | SEQ ID NO: 8 |
| 9. | GeneArt plasmid 0908426_256_pMA : | SEQ ID NO: 9 |
| 10. | GeneArt plasmid 0908655_348_pMA-RQ : | SEQ ID NO: 10 |
| 11. | GeneArt plasmid 0939988_EE14-15 : | SEQ ID NO: 11 |
| 12. | FTH1-H6 : | SEQ ID NO: 12 |
| 13. | FTH1-G3-Ek-mhACT-H6 : | SEQ ID NO: 13 |
| 14. | FHT1-G3-Ek-mhIL6-H6 : | SEQ ID NO: 14 |

EP 2 484 766 B1

(fortgesetzt)

5	15.	FTH1-G3-Ek-IFN α -2a :	SEQ ID NO: 15
	16.	FTH1-G3-Ek-PTH :	SEQ ID NO: 16
	17.	pFPMT121 :	SEQ ID NO: 17

[0067] Anhang A enthält die Sequenz-Auflistungen, dargestellt als Textdatei.

SEQUENCE LISTING

10

[0068]

<110> Artes Biotechnology GmbH

15 <120> Verfahren zum Herstellen eines Ziel-Proteins im Verbund mit einem heterologen Ferritin-Protein unter Verwendung von Hefe-Wirtszellen

<130> A613EP

20 <160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

25 <211> 8252

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

30 <221> ampR

<222> (212)..(1072)

<223> á-lactamase

<220>

35 <221> ori

<222> (1217)..(1889)

<220>

40 <221> ScURA3

<222> (2969) .. (4126)

<223> URA3 gene from *S. cerevisiae*

<220>

45 <221> HARS1

<222> (4926)..(5921)

<223> HARS1 H.polymorpha

<220>

50 <221> FMD-P

<222> (5556)..(6621)

<223> FMD-Promoter H.polymorpha

<220>

55 <221> preCL

<222> (6629)..(6682)

<223> chicken lysozyme presequence

EP 2 484 766 B1

<220>
<221> mhACT
<222> (6683)..(7882)
<223> maturer humaner alpha-Antichymotrypsin-Precursor

5

<220>
<221> H6
<222> (7883)..(7900)
<223> 6-Histidin-His-Tag

10

<220>
<221> MOX-T
<222> (7900)..(8240)
<223> MOX-Terminator H.polymorpha

15

<400> 1

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 2 484 766 B1

caattcttga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt ttataggtta atgtcatgat 60
aataatgggt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat 120
5 ttgtttattt ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aaccctgata 180
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcct 240
10 tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa 300
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa 360
15 cagcggtaag atccttgaga gttttcggcc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt 420
taaagtctctg ctatgtggcg cggattatc ccggttgac gccgggcaag agcaactcgg 480
20 tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 540
tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa 600
25 cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt 660
gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc 720
30 cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca atggcaaca cgttgcgcaa 780
actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 840
35 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt ccggctggct ggtttattgc 900
tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 960
40 tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 1020
acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 1080
ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaggat 1140
45 ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gacaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt 1200

50

55

EP 2 484 766 B1

ccaactgagcg tcagaccccc tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 1260
 gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtgg tttgtttgcc 1320
 5 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgagataacc 1380
 aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 1440
 10 gcctacatac ctgctcttgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 1500
 gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 1560
 15 aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 1620
 cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaaagg cggacaggta 1680
 tccggtaagc ggcagggctc gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 1740
 20 ctggtatctt tatagtctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttctg 1800
 atgctcgtca ggggggaggc gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 1860
 25 cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 1920
 ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 1980
 30 gcgcagcagc tcagtgagcg aggaagcggc agagcgcctg atgcggtatt ttctccttac 2040
 gcattctgtc ggtattttac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc 2100
 35 cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat ggctgcgccc 2160
 cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc ggcattccgct 2220
 tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc agaggttttc accgtcatca 2280
 40 ccgaaacgcg cgaggcagct gcggtaaagc tcatcagcgt ggtcgtgaag cgattcacag 2340
 atgtctgcct gttcatccgc gtccagctcg ttgagtttct ccagaagcgt taatgtctgg 2400
 45 cttctgataa agcggggccat gttaagggcg gttttttcct gtttggtcac tgatgcctcc 2460
 gtgtaagggg gatttctggt catgggggta atgataccga tgaaacgaga gaggatgctc 2520
 50 acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga gggtaaacia 2580
 ctggcgggtat ggatgcggcg ggaccagaga aaaatcactc agggatcaatg ccagcgcctc 2640
 gtttaatacag atgtaggtgt tccacagggt agccagcagc atcctgcgat gcagatccgg 2700
 55 aacataatgg tgcagggcgc tgacttccgc gtttccagac tttacgaaac acggaaaccg 2760

EP 2 484 766 B1

aagaccattc atgttggtgc tcaggtcgca gacgttttgc agcagcagtc gcttcacgtt 2820
cgctcgcgta tcggtgattc attctgctaa ccagtaaggc aaccccccca gcctagccgg 2880
5 gtcctcaacg acaggagcac gatcatgcgc acccgtggcc aggaccaac gctgcggggg 2940
gggggggggg gggggggggg gggggggggg tttctttcca atttttttt ttcgtcatta 3000
10 taaaaatcat tacgaccgag attcccgggt aataactgat ataattaaat tgaagctcta 3060
atgtgtgagt ttagtataca tgcatttact tataatacag ttttttagtt ttgctggccg 3120
15 catcttctca aatatgcttc ccagcctgct tttctgtaac gttcaccctc taccttagca 3180
tcccttcocct ttgcaaatag tcctcttcca acaataataa tgtcagatcc tgtagagacc 3240
acatcatcca cggttctata ctggtgacct aatgctctc ccttgctatc taaaccaca 3300
20 ccgggtgtca taatcaacca atcgtaacct tcatctctc cacccatgct tctttgagca 3360
ataaagccga taacaaaatc tttgtcgtc ttcgcaatgt caacagtacc cttagtatat 3420
25 tctccagtag atagggagcc cttgcatgac aattctgcta acatcaaaag gcctctaggt 3480
tcctttgtta cttcttctgc cgcctgctc aaaccgctaa caatacctgg gccaccaca 3540
30 ccgtgtgcat tcgtaatgtc tgcccattct gctattctgt atacaccgc agagtactgc 3600
aatttgactg tattaccaat gtcagcaaat tttctgtctt cgaagagtaa aaaattgtac 3660
35 ttggcggata atgcctttag cggcttaact gtgccctcca tggaaaaatc agtcaagata 3720
tccacatgtg tttttagtaa acaaattttg ggacctaatg cttcaactaa ctccagtaat 3780
tccttggtgg tacgaacatc caatgaagca cacaagtttg tttgcttttc gtgcatgata 3840
40 ttaaatagct tggcagcaac aggactagga tgagtagcag cacgttcctt atatgtagct 3900
ttcgacatga tttatcttcg tttcctgcag gttttgttc tgtgcagttg ggtaagaat 3960
45 actgggcaat ttcatgtttc ttcaacacta catatgogta tatataccaa tctaagtctg 4020
tgctccttcc ttcgttcttc cttctgttcg gagattaccg aatcaaaaaa atttcaagga 4080
50 aaccgaaatc aaaaaaaga ataaaaaaa aatgatgaat tgaaaccccc ccccccccc 4140
ccccccccg atgcgccgcg tgcggctgct ggagatggcg gacgcgatgg atatgttctg 4200
ccaagggttg gtttgcgcat tcacagttct ccgcaagaat tgattggctc caattcttgg 4260
55 agtggatgaat ccgtagcga ggtgccgccg gcttccattc aggtcgaggt ggccccgctc 4320

EP 2 484 766 B1

catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggtata gggcggcgcc tacaatccat 4380
 gccaacccgt tccatgtgct cgccgaggcg gcataaatcg ccgtgacgat cagcgggtcca 4440
 5 atgatcgaag ttaggctggt aagagccgcy agcgatcctt gaagctgtcc ctgatggtcg 4500
 tcatctacct gcctggacag catggcctgc aacgcgggca tcccgatgcc gccggaagcy 4560
 10 agaagaatca taatggggaa ggccatccag cctcgcgtcg cgaacgccag caagacgtag 4620
 cccagcgcgt cggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcggcgaa acgtttggtg 4680
 15 gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac cgcaagcgc 4740
 aggccgatca tcgtcgcgct ccagcgaaag cggtcctcgc cgaaaatgac ccagagcgc 4800
 gccggcacct gtcctacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata 4860
 20 gtcatgcccc gcgcccaccg gaaggagctg actgggttga aggctctcaa gggcatcgg 4920
 cgactcccgc gactcggcgt tcactttcga gctattatca acgccggaat acgtcagaaa 4980
 25 cagccgtgcc ccagggacca gaaagcctac tggtagtat gttctttcgt gtgatttttc 5040
 cgaggatgag aacgacgata acgagcaca ctcggagtcg gaggacacgc ttattgcggt 5100
 30 gaacgcagcc aacatcagca ggctgtcaag actgagtatg gccacagagc tggatttttc 5160
 ggctcatac tcaaagacgt ttagtaaact ccgtctgcca gaaattgctg acgaggatgt 5220
 35 ataataatag atgaattacg aacaattgta gttcaaaaaa atttagtaac aatattgtct 5280
 agatgacaga tttgctgaaa ccagtgaact ccaataaacc actcaccgct acccaagaga 5340
 aacagatcag agtgctaggg cttgtttcag agtactacaa cgtttaccag aagcttgagc 5400
 40 aagttctcaa acgcgggttt gtcgacgctc tcccttatgc gactcctgca ttaggaagca 5460
 gccagtagt aggttgaggc cgttgagcac cgccgccga aggaatggtg tcgacgcgga 5520
 45 gaacgatctc ctcgacgcgg agaacgatct cctcgagatc caggaagcgc aacgacgcgg 5580
 ggaatttcgt aatcttcccc gaggaaaacc gttcccaaaa gatttcaccg gcaataacgc 5640
 50 cttcattgac cgcacagagt accacttgaa caacattctg aaacggcagg aggcggttcc 5700
 gccgtggata gagaaacagg gcagtggtga ggctcagatc cgccagtttc ggcgccagct 5760
 cgactccgat tggacactgc agccgtgca catcgtttgc gagaaacact cgaagaaaag 5820
 55 cgacacggac aagatccaga tcatgagcca gtacgccgag gcagagcgca acaataactc 5880

EP 2 484 766 B1

gagttatacg aagctgcgca gcagccaatg ggaacagaaa tacagcaact atctggaggt 5940
 caaattaataa gcgctgaatg acagcatccg aggttataat ctgcaggctc ctttggcatc 6000
 5 gcagaaactg tatctaaacg caaactccga gctggaaaaa tgttaccggc gatgcgcgga 6060
 caatttagag gcggcgatca agaaacacct gctgggagag cagtctggag cacagtcttc 6120
 10 gatgggcccg agatcccacc gcgttcctgg gtaccgggac gtgaggcagc gcgacatcca 6180
 tcaaatatac caggcgccaa ccgagtctct cggaaaacag cttctggata tcttccgctg 6240
 15 gcggcgcaac gacgaataat agtccttga ggtgacggaa tatatatgtg tggagggtaa 6300
 atctgacagg gtgtagcaaa ggtaatattt tctaaaaca tgcaatcggc tgccccgcaa 6360
 cgggaaaaag aatgactttg gactcttca ccagagtggg gtgtcccgtc cgtgtgtgca 6420
 20 aataggctcc cactggtcac cccggatttt gcagaaaaac agcaagttcc ggggtgtctc 6480
 actggtgtcc gccaaataaga ggagccggca ggcacggagt ctacatcaag ctgtctccga 6540
 25 tacactcgac taccatccgg gtctctcaga gagggaatg gactataaa taccgcctcc 6600
 ttgcgctctc tgccttcac ggaattcat gagatccctg ctgatactag tgctgtgttt 6660
 30 cttgccgcta gctgccttg gccaccctaa ctgcctttg gatgaggaaa acctgactca 6720
 ggaaaaccag gatagaggaa ctcacgtaga tctgggattg gcttctgcta acgtggactt 6780
 35 cgctttctcg ctgtacaagc agctggtttt gaaggctcct gacaagaacg tgatcttctc 6840
 tctctgtctc atttctaccg ctctggcttt cttgtctctg ggtgctcaca aactaccct 6900
 gaccgagatt ctgaaggac tgaagttcaa cctgaccgag acttccgagg ctgagattca 6960
 40 ccagtctttc cagcacctgc tgagaacttt gaaccagtcc tctgacgagt tgcagctgtc 7020
 tatgggaaac gctatgttcg ttaaggaaca gctgtctctg ttggacagat tcaccgagga 7080
 45 cgctaagaga ttgtacggat ctgaggcttt cgctactgac tttcaggatt ctgctgctgc 7140
 caagaagctg attaacgact acgtcaagaa cggaaccaga ggaaagatta ccgacctgat 7200
 50 caaggacttg gactctcaga ccatgatggt cctggtcaac tacattttct tcaaggccaa 7260
 gtgggagatg cttttgacc ctcaggatac ccaccagtct agattctacc tgtccaagaa 7320
 gaagtgggtc atggtccta tgatgtctct gcaccacctg accattcctt acttcagaga 7380
 55 tgaggaactg tcttgactg ttgtcgagct gaagtacacc ggaaacgcct ctgctctggt 7440

EP 2 484 766 B1

cttttgcct gaccaggaca agatggaaga ggttgaggct atgttgctgc ctgagacttt 7500
 gaagagatgg cgcgactcct tggagttcag agagatcgga gagctgtacc tgcctaagtt 7560
 5 ctctatttcc cgcgactaca acctgaacga cattctgctg cagttgggaa ttgaggaagc 7620
 attcacctct aaggctgacc tgtctggaat taccgggtgct agaaacctgg ctgtctctca 7680
 10 ggttgtccac aaggctgttc tggacgtttt tgaggaagga actgaggctt ctgctgctac 7740
 cgctgtcaag attaccctgc tgtctgctct ggttgagact agaaccattg tcagattcaa 7800
 15 ccgccctttc ctgatgatta ttgtccctac cgacacccag aacatctttt tcatgtccaa 7860
 ggtcaccaac cctaagcagg ctcaccatca tcaccaccac taataaggat cccctctcgcg 7920
 20 gacttgccag attctaagga gacgtggaag gacataccgc ttttgagaag cgtgtttgaa 7980
 aatagttcct tttctggttt atatcgttta tgaagtgatg agatgaaaag ctgaaatagc 8040
 25 gagtatagga aaatttaatg aaaattaat taaatatttt cttaggctat tagtcacctt 8100
 caaaatgccg gccgcttcta agaacgttgt catgatcgac aactacgact cgtttacctg 8160
 30 gaacctgtac gagtacctgt gtcaggaggg agccaatgtc gaggttttca ggaacgatca 8220
 gatcaccatt ccggagattg agcaggggta cc 8252

35 <210> 2
 <211> 7734
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

40 <220>
 <221> MOX-T
 <222> (13) .. (390)
 <223> MOX-Terminator H. polymorpha

45 <220>
 <221> IFNalpha-2a
 <222> (350)..(847)
 <223> matures humanes Interferon alpha 2a

50 <220>
 <221> MFa
 <222> (848)..(1102)
 <223> Prepro-Sequenz des Mating Faktor alpha aus S. cerevisiae mit D83E-Austausch

55 <220>
 <221> FMD-P
 <222> (1110)..(2175)
 <223> FMD-Promotor H. polymorpha

EP 2 484 766 B1

<220>
 <221> HARS1
 <222> (2310)..(2809)
 <223> HARS1 H. polymorpha
 5

<220>
 <221> ScURA3
 <222> (3609)..(4766)
 <223> URA3 gene from S. cerevisiae
 10

<220>
 <221> ori
 <222> (5851)..(6518)
 15

<220>
 <221> ampR
 <222> (6663)..(7523)
 <223> á-lactamase
 20

<400> 2

ggtaccctg ctcaatctcc ggaatggtga tctgatcgtt cctgaaaacc tcgacattgg 60
 25 ctccctcctg acacaggtac tcgtacaggt tccaggtaaa cgagtcgtag ttgtcgatca 120
 tgacaacggt cttagaagcg gccggcattt tgaaggtgac taatagccta agaaaatatt 180
 30 taatttaatt ttcattaat tttcctatac tcgctatttc agcttttcat ctcatacactt 240
 cataaacgat ataaaccaga aaaagaacta ttttcaaaca cgcttctcaa aagcgggatg 300
 35 tccttccacg tctccttaga atctggcaag tccgcgaggg ggatccttat tactccttcg 360
 atctcaaaga ctctgcagg tttgtggaca gcgaaaagga tctcatgatc tctgctctga 420
 cgacctccca ggcgcatggc gagtactttt tctccttcag gtacaatgta atgcgctgga 480
 40 agtactttct aactgccagg atggaatcct ccttcatcaa aggggtttct gtaacgccga 540
 caccttggat cacgcatgcc tccaggtcgt tcagttgctg atacaactca gtgtaaaatt 600
 45 tatccagcaa agtctcatcc caagctgccg aggagtcctt cgtagagaac aggttaaaaa 660
 tctgctgaat catctcgtgc agcacagga ttgtttctgc tttctgaaac tggtttccaa 720
 50 attcctcctg cggaagcca aagtcgtgtc tgtccttcaa acacgaaaac agagagatct 780
 ttctcatctg agccaacagc atcagggttc tgcgcgagcc cagggagtgt gtctgtggca 840
 55

EP 2 484 766 B1

aatcacatct cttttccaag cttaccctt cttcttagc agcaatgctg gcaatagtag 900
tatttataaa caataaccg ttatttgtgc tgttgaaaa tggcaaaaaca gcaacatoga 960
5 aatccccttc taaatctgag taaccgatga cagcttcagc cggaatttgt gccgtttcat 1020
cttctgttgt agtggtgact ggagcagcta atgcggagga tgctgcgaat aaaactgcag 1080
10 taaaaattga aggaaatctc atgaattccc gatgaaggca gagagcgcaa ggaggcggtta 1140
tttatagtgc cattcccctc tctgagagac ccggatggta gtcgagtgtta tccgagacag 1200
15 cttgatgtag actccgtgcc tgccggctcc tcttattggc ggacaccagt gagacacccc 1260
ggaacttgct gtttttctgc aaaatccggg gtgaccagtg ggagcctatt tgcacacacg 1320
agcgggacac cccactctgg tgaagagtgc caaagtcatt ctttttcccg ttgcggggca 1380
20 gccgattgca tgttttagga aatattacc tttgctacac cctgtcagat ttaccctcca 1440
cacatatata ttccgtcacc tccagggact attattcgtc gttgcgccgc cagcgggaaga 1500
25 tatccagaag ctgttttccg agagactcgg ttggcgctg gtatatttga tggatgtcgc 1560
gctgcctcac gtcccgtac ccaggaacgc ggtgggatct cgggccatc gaagactgtg 1620
30 ctccagactg ctgccccagc aggtgtttct tgatcgccgc ctctaaattg tccgcgcac 1680
gccgtaaca tttttccagc tccgagtttgc cgtttagata cagtttctgc gatgccaaag 1740
35 gagcctgcag attataacct cggatgctgt cattcagcgc ttttaatttg acctccagat 1800
agttgctgta tttctgttcc cattggctgc tgcgcagctt cgtataactc gagttattgt 1860
tgcgctctgc ctccggctac tggctcatga tctggatctt gtccgtgtcg cttttcttcg 1920
40 agtgtttctc gcaaacgatg tgcacggcct gcagtgtcca atcggagtcg agctggcgcc 1980
gaaactggcg gatctgagcc tccacactgc cctgtttctc tatccacggc ggaaccgcct 2040
45 cctgccgttt cagaatgttg ttcaagtggc actctgtgcg gtcaatgaag gcgttattgc 2100
cggtgaaatc tttgggaagc ggttttctc ggggaagatt acgaaattcc ccgcgtcgtt 2160
50 gcgcttctcg gatctcgagg agatcgttct ccgcgtcag gagatcgttc tccgcgtcga 2220
caccattcct tgcggcgggc gtgctcaacg gcctcaacct actactgggc tgcttcttaa 2280
tgcaggagtc gcataaggga gagcgtcagc aaacccgcgt ttgagaactt gctcaagcta 2340
55 gcttctggta aacgtttag tactctgaaa caagccctag cactctgac tgtttctctt 2400

EP 2 484 766 B1

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

gggtagcggg gagtggttta ttggagttca ctggtttcag caaatctgtc atctagacaa 2460
 tattgttact aaatTTTTTT gaactacaat tgttcgtaat tcatctatta ttatacatcc 2520
 tcgtcagcaa tttctggcag acggagttta ctaaactgtc ttgagtatga ggccgagaaa 2580
 tccagctctg tggccatact cagtcttgac agcctgctga tgttggctgc gttcaacgca 2640
 ataagcgtgt cctccgactc cgagttgtgc tcgttatcgt cgttctcatc ctccgaaaaa 2700
 tcacacgaaa gaacatactc accagtaggc tttctgggcc ctggggcacg gctgtttctg 2760
 acgtattccg gcggtgataa tagctcgaag gtgaacgccg agtcgcggga gtcgaccgat 2820
 gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc cttccgggtg gcgcggggca tgactatcgt 2880
 cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta ggacaggtgc cggcagcgct 2940
 ctgggtcatt ttcggcgagg accgctttcg ctggagcgcg acgatgatcg gcctgtcgtc 3000
 tgcggtattc ggaatcttgc acgccctcgc tcaagcctc gtcactggtc ccgccaccaa 3060
 acgtttcggc gagaagcagg ccattatcgc cggcatggcg gccgacgcgc tgggctacgt 3120
 cttgctggcg ttcgcgacgc gaggctggat ggccttccc attatgattc ttctcgcttc 3180
 cggcggcatc gggatgcccg cgttgcaggc catgctgtcc aggcaggtag atgacgacca 3240
 tcagggacag cttcaaggat cgctcgggc tcttaccagc ctaacttcga tcattggacc 3300
 gctgatcgtc acggcgattt atgccgcctc ggcgagcaca tggaacgggt tggcatggat 3360
 tgtaggcgcc gccctatacc ttgtctgcct ccccgcttg cgtcgcgggtg catggagccg 3420
 ggccacctcg acctgaatgg aagccggcgg cacctcgcta acggattcac cactccaaga 3480
 attggagcca atcaattctt gcggagaact gtgaatgcgc aaaccaaccc ttggcagaac 3540
 atatccatcg cgtccgccat ctccagcagc cgcacgcggc gcatcggggg gggggggggg 3600
 gggggggggg ttcaattcat cattTTTTTT ttattctttt ttttgatttc ggtttccttg 3660
 aaatTTTTTT gattcggtaa tctccgaaca gaaggaagaa cgaaggaagg agcacagact 3720
 tagattggta tatatacgca tatgtagtgt tgaagaaca tgaaattgcc cagtattctt 3780
 aaccaactg cacagaacaa aaacctgcag gaaacgaaga taaatcatgt cgaaagctac 3840
 atataaggaa cgtgctgcta ctcatcctag tctgttgct gccaaagctat ttaatatcat 3900
 gcacgaaaag caaacaact tgtgtgcttc attggatggt cgtaccacca aggaattact 3960

EP 2 484 766 B1

ggagttagtt gaagcattag gtcccaaat ttgttacta aaaacacatg tggatatctt 4020
 gactgatttt tccatggagg gcacagttaa gccgctaaag gcattatccg ccaagtacaa 4080
 5 ttttttactc ttcgaagaca gaaaatttgc tgacattgggt aatacagtca aattgcagta 4140
 ctctgcggggt gtatacagaa tagcagaatg ggcagacatt acgaatgcac acggtgtgggt 4200
 10 gggcccaggt attgttagcg gtttgaagca ggcggcagaa gaagtaacaa aggaacctag 4260
 aggccctttg atgttagcag aattgtcatg caagggctcc ctatctactg gagaatatac 4320
 15 taaggggtact gttgacattg cgaagagcga caaagatttt gttatcggct ttattgctca 4380
 aagagacatg ggtggaagag atgaaggtta cgattgggtg attatgacac ccggtgtggg 4440
 tttagatgac aaggagagac cattgggtca acagtataga accgtggatg atgtggctc 4500
 20 tacaggatct gacattatta ttgttgaag aggactattt gcaaaggaa gggatgctaa 4560
 ggtagaggggt gaacgttaca gaaaagcagg ctgggaagca tatttgagaa gatgcgcca 4620
 25 gcaaaaactaa aaaactgtat tataagtaaa tgcatgtata ctaaactcac aaattagagc 4680
 ttcaatttaa ttatatcagt tattaccggg gaatctcgggt cgtaatgatt tttataatga 4740
 30 cgaaaaaaaa aaattggaaa gaaaaccccc ccccccccc ccccccccc ccccccccg 4800
 cagcgttggg tcttgccac gggtgccat gatcgtgctc ctgtcgttga ggaccggct 4860
 35 aggctggcgg ggttgcctta ctggtagca gaatgaatca ccgatacgcg agcgaacgtg 4920
 aagcgactgc tgctgcaaaa cgtctgcgac ctgagcaaca acatgaatgg tcttcggttt 4980
 ccgtgtttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcggc tgcaccatta tgttccggat 5040
 40 ctgcatcgca ggatgctgct ggctaccctg tggaacacct acatctgtat taacgaagcg 5100
 ctggcattga ccctgagtga tttttctctg gtcccggcg atccataccg ccagttgttt 5160
 45 accctcacia cgttccagta accgggcatg ttcatcatca gtaaccgta tcgtgagcat 5220
 cctctctcgt ttcatcggta tcattacccc catgaacaga aatccccctt acacggaggc 5280
 50 atcagtgacc aaacaggaaa aaaccgccct taacatggcc cgctttatca gaagccagac 5340
 attaacgctt ctggagaaac tcaacgagct ggacgcggat gaacaggcag acatctgtga 5400
 atcgcttcac gaccacgctg atgagcttta ccgcagctgc ctgcgcggtt tcggtgatga 5460
 55 cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc tgtaagcgga 5520

EP 2 484 766 B1

tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcgc 5580
 agccatgacc cagtcacgta gcgatagcgg agtgtatact ggcttaacta tgcggcatca 5640
 5 gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 5700
 agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tctcgcctca ctgactcgct gcgctcggtc 5760
 10 gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa 5820
 tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaaccgt 5880
 15 aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa 5940
 aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 6000
 ccccctggaa gtcacctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggataacctg 6060
 20 tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gtcacgctg taggtatctc 6120
 agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 6180
 25 gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgactta 6240
 tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct 6300
 30 acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc 6360
 tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 6420
 35 caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 6480
 aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 6540
 aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 6600
 40 ttaaattaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac 6660
 agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc 6720
 45 atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 6780
 cccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 6840
 50 aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc 6900
 cagtctatta attggtgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg 6960
 aacgttgttg ccattgctgc aggcacgctg gtgtcacgct cgctcgtttg tatggcttca 7020
 55 ttcagctccg gttccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggtt gtgcaaaaaa 7080

EP 2 484 766 B1

gcgggttagct ccttcggtcc tccgatcggt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca 7140
 ctcatgggta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt 7200
 5 tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt 7260
 tgctcttgcc cggcgtcaac acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 7320
 10 ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctggtgaga 7380
 tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 7440
 15 agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg 7500
 acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 7560
 20 ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 7620
 gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg 7680
 25 acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtcttcaaga attg 7734

30 <210> 3
 <211> 7607
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

35 <220>
 <221> ampR
 <222> (212)..(1072)
 <223> á-lactamase

40 <220>
 <221> ori
 <222> (1217)..(1884)

45 <220>
 <221> ScURA3
 <222> (2969) .. (4126)
 <223> URA3 gene from *S. cerevisiae*

50 <220>
 <221> HARS1
 <222> (4926)..(5421)
 <223> HARS1 H.polymorpha

55 <220>
 <221> FMD-P
 <222> (5556)..(6621)
 <223> FMD-Promoter H.polymorpha

<220>
 <221> preCL
 <222> (6629)..(6682)

EP 2 484 766 B1

<223> chicken lysozyme presequence

<220>

<221> mhIL6

5 <222> (6683)..(7237)

<223> matures humanes Interleukin 6

<220>

<221> H6

10 <222> (7238)..(7255)

<223> 6-Histidin-His-Tag

<220>

<221> MOX-T

15 <222> (7268)..(7595)

<223> MOX-Terminator H.polymorpha

<400> 3

20 caattcttga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt ttataggtta atgtcatgat 60
aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat 120
25 ttgtttatth ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aaccctgata 180
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcct 240
30 tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa 300
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa 360
35 cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt 420
taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtggtgac gccgggcaag agcaactcgg 480
tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 540
40 tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa 600
cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt 660
45 gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc 720
catacctaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca atggcaacaa cgttgcgcaa 780
50 actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 840
ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc 900

55

EP 2 484 766 B1

tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 960
 tgtaagccc tcccgatcgc tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 1020
 5 acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 1080
 ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat 1140
 10 ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaatec ccttaacgtg agttttcgtt 1200
 cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 1260
 15 gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc 1320
 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 1380
 aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 1440
 20 gcctacatac ctgctctgct taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 1500
 gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 1560
 25 aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 1620
 cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac gcttcccgaa gggagaaaagg cggacaggta 1680
 30 tccggtaaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 1740
 ctggtatctt tatagtctct tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttttgtg 1800
 atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 1860
 35 cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 1920
 ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 1980
 40 gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgcctg atgcggtatt ttctccttac 2040
 gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgactctc agtacaatct gctctgatgc 2100
 45 cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat ggctgcgccc 2160
 cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc ggcacccgct 2220
 50 tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc accgtcatca 2280
 ccgaaacgcg cgaggcagct gcggtaaagc tcatcagcgt ggtcgtgaag cgattcacag 2340
 atgtctgcct gttcatccgc gtccagctcg ttgagtttct ccagaagcgt taatgtctgg 2400
 55 cttctgataa agcgggcat gtaagggcg gttttttcct gtttggtcac tgatgcctcc 2460

EP 2 484 766 B1

gtgtaagggg gatttctggt catgggggta atgataccga tgaacgaga gaggatgctc 2520
 acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga gggtaaacia 2580
 5 ctggcgggat ggatgcggcg ggaccagaga aaaatcactc agggccaatg ccagcgcttc 2640
 gttaatacag atgtaggtgt tccacagggt agccagcagc atcctgcgat gcagatccgg 2700
 10 aacataatgg tgcagggcgc tgacttccgc gtttccagac tttacgaaac acggaaaccg 2760
 aagaccattc atgttgttgc tcaggtcgca gacgttttgc agcagcagtc gcttcacggt 2820
 15 cgctcgcgta tcgggtgattc attctgctaa ccagtaaggc aaccccgcca gcctagccgg 2880
 gtccctcaacg acaggagcac gatcatgcmc acccgtggcc aggacccaac gctgcggggg 2940
 20 gggggggggg gggggggggg gggggggggg tttctttcca attttttttt ttcgctatta 3000
 taaaaatcat tacgaccgag attcccgggt aataactgat ataattaaat tgaagctcta 3060
 atttgtgagt ttagtataca tgcatttact tataatacag ttttttagtt ttgctggccg 3120
 25 catcttctca aatatgcttc ccagcctgct tttctgtaac gttcaccctc taccttagca 3180
 tcccttcctt ttgcaaatag tcctcttcca acaataataa tgcagatcc tgtagagacc 3240
 30 acatcatcca cggttctata ctggtgacc aatgcgtctc ccttgctatc taaaccaca 3300
 ccgggtgtca taatcaacca atcgtaacct tcattctctc cacccatgtc tctttgagca 3360
 35 ataaagccga taacaaaatc tttgtcgtc ttcgcaatgt caacagtacc cttagtatat 3420
 tctccagtag atagggagcc cttgcatgac aattctgcta acatcaaaag gcctctaggt 3480
 tcctttgtta cttcttctgc cgctgcttc aaaccgctaa caatacctgg gccaccaca 3540
 40 ccgtgtgcat tcgtaatgtc tgcccattct gctattctgt atacaccgc agagtactgc 3600
 aatttgactg tattaccaat gtcagcaaat tttctgtctt cgaagagtaa aaaattgtac 3660
 45 ttggcgggata atgcctttag cggcttaact gtgccctcca tggaaaaatc agtcaagata 3720
 tccacatgtg tttttagtaa acaaattttg ggacctaatag cttcaactaa ctccagtaat 3780
 50 tccttggtgg tacgaacatc caatgaagca cacaagtttg tttgcttttc gtgcatgata 3840
 ttaaatagct tggcagcaac aggactagga tgagtagcag cacgttcctt atatgtagct 3900
 ttcgacatga tttatcttgc tttcctgcag gtttttgctc tgtgcagttg ggttaagaat 3960
 55 actgggcaat tcatgtttc ttcaacta catatgcgta tatataccaa tctaagtctg 4020

EP 2 484 766 B1

tgctccttcc ttogttcttc cttctgttcg gagattaccg aatcaaaaaa atttcaagga 4080
 aaccgaaatc aaaaaaaaga ataaaaaaaa aatgatgaat tgaaaccccc ccccccccc 4140
 5 ccccccccg atgcgcccgc tgcggctgct ggagatggcg gacgcgatgg atatgttctg 4200
 ccaagggttg gtttgccat tcacagttct ccgcaagaat tgattggctc caattcttgg 4260
 10 agtggatgaat ccgtagcga ggtgccgccg gcttccattc aggtcgaggt ggcccggctc 4320
 catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggtata gggcggcgcc tacaatccat 4380
 15 gccaacccgt tccatgtgct cgccgaggcg gcataaatcg ccgtgacgat cagcgggtcca 4440
 atgatcgaag ttaggctggt aagagccgcg agcgatcctt gaagctgtcc ctgatggtcg 4500
 tcactacct gcctggacag catggcctgc aacgcgggca tcccgatgcc gccggaagcg 4560
 20 agaagaatca taatgggaa ggccatccag cctcgcgtcg cgaacgccag caagacgtag 4620
 cccagcgcgt cggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcggcga acgtttggtg 4680
 25 gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac cgcaagcgcac 4740
 aggccgatca tcgtcgcgct ccagcgaag cggtcctcgc cgaaaatgac ccagagcgcct 4800
 30 gccggcacct gtctacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata 4860
 gtcatgcccc gcgccaccg gaaggagctg actgggttga aggtctctca gggcatcgggt 4920
 cgactcccgc gactcggcgt tcactttcga gctattatca acgccggaat acgtcagaaa 4980
 35 cagccgtgcc ccagggacca gaaagcctac tggtagtat gttctttcgt gtgatttttc 5040
 cgaggatgag aacgacgata acgagcaca ctcggagtgc gaggacacgc ttattgcggt 5100
 40 gaacgcagcc aacatcagca ggctgtcaag actgagtatg gccacagagc tggattttctc 5160
 ggctcatac tcaaagacgt ttagtaact ccgtctgcca gaaattgctg acgaggatgt 5220
 45 ataataatag atgaattacg aacaattgta gttcaaaaaa atttagtaac aatattgtct 5280
 agatgacaga tttgctgaaa ccagtgaact ccaataaacc actcaccgct acccaagaga 5340
 50 aacagatcag agtgctaggg cttgtttcag agtactaaa cgtttaccag aagcttgagc 5400
 aagttctcaa acgcggggtt gtcgacgctc tcccttatgc gactcctgca ttaggaagca 5460
 gccagtagt aggttgaggc cgttgagcac cgccgccgca aggaatgggtg tcgacgcgga 5520
 55 gaacgatctc ctcgacgcgg agaacgatct cctcgagatc caggaagcgc aacgacgcgg 5580

EP 2 484 766 B1

ggaatttcgt aatcttcccc gaggaaaacc gcttcccaaa gatttcaccg gcaataacgc 5640
 cttcattgac cgcacagagt accacttgaa caacattctg aaacggcagg aggcggttcc 5700
 5 gccgtggata gagaaacagg gcagtgtgga ggctcagatc cgccagtffc ggcgccagct 5760
 cgactccgat tggacactgc aggccgtgca catcgtttgc gagaaacact cgaagaaaag 5820
 10 cgacacggac aagatccaga tcatgagcca gtacgccgag gcagagcgca acaataactc 5880
 gagttatacg aagctgcgca gcagccaatg ggaacagaaa tacagcaact atctggaggt 5940
 15 caaattaataa gcgctgaatg acagcatccg aggttataat ctgcaggctc ctttggcatc 6000
 gcagaaactg tatctaaacg caaactccga gctggaaaaa tgttaccggc gatgvcgcca 6060
 caatttagag gcggcgatca agaaacacct gctgggcgag cagtctggag cacagtcttc 6120
 20 gatgggcccg agatcccacc gcgttcctgg gtaccgggac gtgaggcagc gcgacatcca 6180
 tcaaataatac caggcgccaa ccgagtctct cggaaaacag cttctggata tcttccgctg 6240
 25 gcggcgcaac gacgaataat agtccctgga ggtgacggaa tatatatgtg tggagggtaa 6300
 atctgacagg gtgtagcaaa ggtaatattt tcttaaaaca tgcaatcggc tgccccgcaa 6360
 30 cgggaaaaag aatgactttg gcactcttca ccagagtggg gtgtcccgct cgtgtgtgca 6420
 aataggctcc cactggctac cccggatttt gcagaaaaac agcaagttcc ggggtgtctc 6480
 actggtgtcc gccaaataaga ggagccggca ggcacggagt ctacatcaag ctgtctccga 6540
 35 tacactcgac taccatccgg gtctctcaga gaggggaatg gcactataaa taccgcctcc 6600
 ttgcgctctc tgccttcac ggggaattcat gagatccctg ctgatactag tgctgtgttt 6660
 40 cttgccgcta gctgccttg gcgctcctgt tctcctggt gaagattcta aggacgtcgc 6720
 tgctcctcac agacagcctt tgacctctc tgagcgcac gataagcaga ttcgctacat 6780
 45 tctggacgga atttctgccc tgagaaagga aacctgcaac aagtctaaca tgtgvcgagtc 6840
 ctctaaggaa gctctggctg agaacaacct gaacctgcct aagatggctg agaaggacgg 6900
 50 atgtttccag tctggattca acgaggaaac ctgcctggtc aagattatta ccggactggt 6960
 ggagttcgag gtctacttg agtacctgca gaacagattc gagtctctg aagaacaggc 7020
 tagagctgtc cagatgtcta ccaaggtcct gattcagttc ctgcagaaga aggctaagaa 7080
 55 cctggacgct attactactc ctgaccctac cactaacgct tctctgctga ctaagctgca 7140

EP 2 484 766 B1

ggctcagaat cagtggttgc aggacatgac cactcacctg atcctgagat cttcaagga 7200
 atttctgcag tcctctctga gagctttgag acagatgcac catcatcacc accactaata 7260
 5 aggatccccc tcgcggactt gccagattct aaggagacgt ggaaggacat accgcttttg 7320
 agaagcgtgt ttgaaaatag ttctttttct ggtttatatc gtttatgaag tgatgagatg 7380
 10 aaaagctgaa atagcgagta taggaaaatt taatgaaaat taaattaaat attttcttag 7440
 gctattagtc accttcaaaa tgccggccgc ttctaagaac gttgtcatga tcgacaacta 7500
 15 cgactcgttt acctggaacc tgtacgagta cctgtgtcag gagggagcca atgtcgaggt 7560
 tttcaggaac gatcagatca ccattccgga gattgagcag ggggtacc 7607
 20 <210> 4
 <211> 7547
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz
 25 <220>
 <221> ampR
 <222> (212)..(1072)
 <223> á-lactamase
 30 <220>
 <221> ori
 <222> (1072)..(1884)
 35 <220>
 <221> ScURA3
 <222> (2969)..(4126)
 <223> URA3 gene from *S. cerevisiae*
 40 <220>
 <221> HARS1
 <222> (9926)..(5421)
 <223> HARS1 H.polymorpha
 45 <220>
 <221> FMD-P
 <222> (5556)..(6621)
 <223> FMD-Promoter H.polymorpha
 50 <220>
 <221> FTH1
 <222> (6629)..(7177)
 55 <220>
 <221> H6
 <222> (7178)..(7195)
 <223> 6-Histidin-His-Tag
 <220>

EP 2 484 766 B1

<221> MOX-T
 <222> (7208)..(7535)
 <223> MOX-Terminator H.polymorpha

5 <400> 4

caattcttga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatTT ttataggTTa atgtcatgat 60

10 aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgCG gaaccCctat 120

ttgTTtattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata 180

15 aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcCct 240

tattcccttt ttgCGgcat tttgccttcc tgtTTTTgct caccCagaaa cgctggtgaa 300

20 agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa 360

cagcggtaag atccttgaga gTTTTcggcc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt 420

25 taaagtTctg ctatgtggcg cggTattatc ccgtgttgac gccgggcaag agcaactcgg 480

tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 540

tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa 600

30 cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctTTTTt 660

gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgG gaaccggagc tgaatgaagc 720

35 cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca atggcaacaa cgTTgcgcaa 780

actattaact ggCGaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 840

40 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgCG ctCGgccctt ccggctggct ggtttattgc 900

tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgCGgtatc attgcagcac tggggccaga 960

45 tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 1020

acgaaataga cagatcgtg agataggtgc ctCactgatt aagcattggt aactgtcaga 1080

50 ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat 1140

ctaggtgaag atcctTTTTg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agTTTTcgTT 1200

ccactgagcg tcagacCCcg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cTTTTttct 1260

55

EP 2 484 766 B1

gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggggtg tttgtttgcc 1320
 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 1380
 5 aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 1440
 gcctacatac ctgctcttgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 1500
 10 gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 1560
 aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 1620
 15 cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta 1680
 tccggtaaagc ggcagggctc gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 1740
 ctggatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttttgtg 1800
 20 atgctcgtca ggggggcgga gcctatgga aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 1860
 cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 1920
 25 ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 1980
 gcgcagcagag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgctg atgcggtatt ttctccttac 2040
 30 gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc 2100
 cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat ggctgcgccc 2160
 cgacaccgc caacaccgc tgacgcgcc tgacgggctt gtctgctccc ggcatccgct 2220
 35 tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc accgtcatca 2280
 ccgaaacgcg cgaggcagct gcggtaaagc tcatcagcgt ggtcgtgaag cgattcacag 2340
 40 atgtctgcct gttcatccgc gtccagctcg ttgagtttct ccagaagcgt taatgtctgg 2400
 cttctgataa agcgggcat gttaagggcg gtttttctc gtttggtcac tgatgcctcc 2460
 45 gtgtaagggg gatttctggt catgggggta atgataccga tgaaacgaga gaggatgctc 2520
 acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga gggtaaacia 2580
 50 ctggcgggat ggatgcggcg ggaccagaga aaaatcactc agggccaatg ccagcgcttc 2640
 gttaatacag atgtaggtgt tccacagggt agccagcagc atcctgcgat gcagatccgg 2700
 aacataatgg tgcagggcgc tgacttccgc gtttccagac ttacgaaac acggaaaccg 2760
 55 aagaccattc atgttgttgc tcaggtcgca gacgttttgc agcagcagtc gcttcacggt 2820

EP 2 484 766 B1

cgctcgcgta tcggtgattc attctgctaa ccagtaaggc aaccccgcca gcctagccgg 2880

gtcctcaacg acaggagcac gatcatgcmc acccgtggcc aggaccaac gctgcggggg 2940

5 gggggggggg gggggggggg gggggggggg tttctttcca atttttttt ttcgtcatta 3000

taaaaatcat tacgaccgag attcccggg aataactgat ataattaaat tgaagctcta 3060

10 atttgtgagt ttagtataca tgcatttact tataatacag ttttttagtt ttgctggccg 3120

catcttctca aatatgcttc ccagcctgct tttctgtaac gttcaccctc taccttagca 3180

15 tcccttcctt ttgcaaatag tcctcttcca acaataataa tgtcagatcc tgtagagacc 3240

acatcatcca cggttctata ctggtgacct aatgcmctc ccttgctatc taaaccaca 3300

20 ccgggtgtca taatcaacca atcgtaacct tcatctctc cacccatgtc tctttgagca 3360

ataaagccga taacaaaatc tttgtcgtc ttcgcaatgt caacagtacc cttagtatat 3420

tctccagtag atagggagcc cttgcatgac aattctgcta acatcaaaag gcctctaggt 3480

25 tcctttgtta cttcttctgc cgctgcttc aaaccgctaa caatacctgg gccaccaca 3540

ccgtgtgcat tcgtaatgtc tgcccattct gctattctgt atacacccgc agagtactgc 3600

30 aatttgactg tattaccaat gtcagcaaat tttctgtctt cgaagagtaa aaaattgtac 3660

ttggcggata atgcctttag cggcttaact gtgccctcca tggaaaaatc agtcaagata 3720

35 tccacatgtg tttttagtaa acaaattttg ggacctaatg cttcaactaa ctccagtaat 3780

tccttggtgg tacgaacatc caatgaagca cacaagtttg tttgcttttc gtgcatgata 3840

ttaaatagct tggcagcaac aggactagga tgagtagcag cacgttcctt atatgtagct 3900

40 ttcgacatga tttatcttcg tttcctgcag gttttgttc tgtgcagttg ggtaagaat 3960

actgggcaat tcatgtttc ttcaacta catatgcgta tatataccaa tctaagtctg 4020

45 tgctccttcc ttcgttcttc cttctgttcg gagattaccg aatcaaaaaa atttcaagga 4080

aaccgaaatc aaaaaaaga ataaaaaaa aatgatgaat tgaaaccccc ccccccccc 4140

50 ccccccccg atgcgccgcg tgcggctgct ggagatggcg gacgcgatgg atatgttctg 4200

ccaagggttg gtttgcgcat tcacagttct ccgcaagaat tgattggctc caattcttgg 4260

agtggatgaat ccgtagcga ggtgccgccg gcttccattc aggtcgaggt ggccccgctc 4320

55 catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggtata gggcgccgcc tacaatccat 4380

EP 2 484 766 B1

gccaacccgt tccatgtgct cgccgaggcg gcataaatcg ccgtgacgat cagcgggtcca 4440
 atgatcgaag ttaggctggt aagagccgcg agcgatcctt gaagctgtcc ctgatggtcg 4500
 5 tcatctacct gcctggacag catggcctgc aacgcgggca tcccgatgcc gccggaagcg 4560
 agaagaatca taatggggaa ggccatccag cctcgcgctc cgaacgccag caagacgtag 4620
 10 cccagcgcgt cggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcgccgaa acgtttggtg 4680
 gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac cgcaagcgac 4740
 15 aggccgatca tcgtcgcgct ccagcgaaag cggtcctcgc cgaaaatgac ccagagcgct 4800
 gccggcacct gtcctacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata 4860
 gtcatgcccc gcgcccaccg gaaggagctg actgggttga aggctctcaa ggcatcgggt 4920
 20 cgactcccgc gactcggcgt tcactttcga gctattatca acgccggaat acgtcagaaa 4980
 cagccgtgcc ccagggacca gaaagcctac tggtgagtat gttctttcgt gtgatttttc 5040
 25 cgaggatgag aacgacgata acgagcacia ctcggagtcg gaggacacgc ttattgcggt 5100
 gaacgcagcc aacatcagca ggctgtcaag actgagtatg gccacagagc tggattttctc 5160
 30 ggcctcatac tcaaagacgt ttagtaaact ccgtctgcca gaaattgctg acgaggatgt 5220
 ataataatag atgaattacg aacaattgta gttcaaaaaa atttagtaac aatattgtct 5280
 35 agatgacaga tttgctgaaa ccagtgaact ccaataaacc actcaccgct acccaagaga 5340
 aacagatcag agtgctaggg cttgtttcag agtactacaa cgtttaccag aagcttgagc 5400
 aagttctcaa acgcggggtt gtcgacgctc tcccttatgc gactcctgca ttaggaagca 5460
 40 gccagtagt aggttgaggc cgttgagcac cgccgccgca aggaatggtg tcgacgcgga 5520
 gaacgatctc ctcgacgcgg agaacgatct cctcgagatc caggaagcgc aacgacgcgg 5580
 45 ggaatttcgt aatcttcccc gaggaaaacc gcttcccaaa gatttcaccg gcaataacgc 5640
 cttcattgac cgcacagagt accacttgaa caacattctg aaacggcagg aggcggttcc 5700
 50 gccgtggata gagaaacagg gcagtgtgga ggctcagatc cgccagtttc ggcgccagct 5760
 cgactccgat tggacactgc aggccgtgca catcgtttgc gagaaacact cgaagaaaag 5820
 cgacacggac aagatccaga tcatgagcca gtacgccgag gcagagcgca acaataactc 5880
 55 gagttatacg aagctgcgca gcagccaatg ggaacagaaa tacagcaact atctggaggt 5940

EP 2 484 766 B1

caaattaa ggcgctgaatg acagcatccg aggttataat ctgcaggctc ctttggcatc 6000
 gcagaaactg tatctaaacg caaactccga gctggaaaaa tgttaccggc gatgcgcgga 6060
 5 caatttagag gcggcgatca agaaacacct gctggggcag cagtctggag cacagtcttc 6120
 gatgggcccg agatcccacc gcgttcctgg gtaccgggac gtgaggcagc gcgacatcca 6180
 10 tcaaataac caggcgccaa ccgagtctct cggaaaacag cttctggata tcttccgctg 6240
 gcggcgcaac gacgaataat agtccctgga ggtgacggaa tatatatgtg tggagggtaa 6300
 atctgacagg gtgtagcaaa ggtaatattt tcctaaaaca tgcaatcggc tgccccgcaa 6360
 15 cgggaaaaag aatgactttg gcactcttca ccagagtggg gtgtcccgct cgtgtgtgca 6420
 aataggctcc cactggtcac cccggatttt gcagaaaaac agcaagttcc ggggtgtctc 6480
 20 actggtgtcc gccaaataaga ggagccggca ggcacggagt ctacatcaag ctgtctccga 6540
 tacactcgac taccatccgg gtctctcaga gagggaatg gcactataaa taccgcctcc 6600
 25 ttgcgctctc tgccttcate ggaattcat gaccaccgct tctacctctc aggtcagaca 6660
 gaactaccac caggattctg aggctgctat taaccgccag atcaacttgg agctgtacgc 6720
 30 ttcttacgtc tacctgtcca tgtcttacta cttcgaccgt gacgacgttg ctttgaagaa 6780
 cttcgccaag tacttcttgc accagtctca cgaggaaaga gagcacgctg agaagctgat 6840
 gaagctgcag aatcagagag gtggaagaat cttcttgacg gacatcaaga agcctgattg 6900
 35 cgacgattgg gagtctggac tgaacgctat ggaatgcgct ttgcacttgg agaagaacgt 6960
 caaccagtct ctgttgagg tgcacaagct ggctactgac aagaacgacc ctcaacctgtg 7020
 40 cgactttatc gagactcact acctgaacga gcaggtaacg gctattaagg aactgggtga 7080
 ccacgttacc aacctgagaa agatgggtgc tcctgagtct ggattggctg agtacctgtt 7140
 45 cgacaagcac actttgggag actctgataa cgaatctcac catcatcacc accactaata 7200
 aggatcccc tcgcggaact gccagattct aaggagacgt ggaaggacat accgcttttg 7260
 50 agaagcgtgt ttgaaaatag ttcttttct ggtttatac gtttatgaag tgatgagatg 7320
 aaaagctgaa atagcgagta taggaaaatt taatgaaaat taaattaaat attttcttag 7380
 gctattagtc acctcaaaa tgccggccgc ttctaagaac gttgtcatga tcgacaacta 7440
 55 cgactcgttt acctggaacc tgtacgagta cctgtgtcag gagggagcca atgtcgaggt 7500

tttcaggaac gatcagatca ccattccgga gattgagcag gggtagc

7547

5 <210> 5
 <211> 8771
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

10 <220>
 <221> ampR
 <222> (212)..(1072)
 <223> á-lactamase

15 <220>
 <221> ori
 <222> (1217)..(1884)

20 <220>
 <221> ScURA3
 <222> (2969)..(4126)
 <223> URA3 gene from *S. cerevisiae*

25 <220>
 <221> HARS1
 <222> (4926)..(5421)
 <223> HARS1 H.polymorpha

30 <220>
 <221> FMD-P
 <222> (5556)..(6621)
 <223> FMD-Promoter H.polymorpha

35 <220>
 <221> FTH1
 <222> (6629)..(7176)
 <223> humanes Ferritin (H-Kette)

40 <220>
 <221> G3
 <222> (7178) .. (7186)
 <223> G3-Linker

45 <220>
 <221> Ek
 <222> (7187)..(7201)
 <223> Enteropeptidase-Spaltstelle

50 <220>
 <221> mhACT
 <222> (7202)..(8401)
 <223> maturer humaner alphas1-Antichymotrypsin-Precursor

55 <220>
 <221> H6
 <222> (8402)..(8419)
 <223> 6-Histidin-His-Tag

<220>

EP 2 484 766 B1

<221> MOX-T
 <222> (8432)..(8759)
 <223> MOX-Terminator H.polymorpha

5 <400> 5

caattccttga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatatt ttataggta atgtcatgat 60

10 aataatgggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat 120

ttgtttatatt ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aaccctgata 180

15 aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcct 240

tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa 300

agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa 360

20 cagcggtaag atccttgaga gttttcggcc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt 420

taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtggtgac gccgggcaag agcaactcgg 480

25 tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 540

tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa 600

30 cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt 660

gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc 720

35 cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca atggcaaaa cgttgcgcaa 780

actattaact ggcgaaactac ttactctagc ttccgggcaa caattaatag actggatgga 840

40 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc 900

tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 960

45 tggttaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 1020

acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 1080

ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat 1140

50 ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gacaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt 1200

55

EP 2 484 766 B1

cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 1260
 gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc 1320
 5 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgagataacc 1380
 aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 1440
 10 gcctacatac ctgctctgct taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 1500
 gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 1560
 aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 1620
 15 cctacagcgt gagctatgag aaagcggccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta 1680
 tccggtaagc ggcagggctc gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 1740
 20 ctggtatctt tatagtctctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttctg 1800
 atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 1860
 25 cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 1920
 ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga 1980
 30 gcgcagcagc tcagtgagcg aggaagcggg agagcgcctg atgcggtatt ttctccttac 2040
 gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc 2100
 cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat ggctgcgccc 2160
 35 cgacaccgc caacaccgc tgacgcgcc tgacgggctt gtctgctccc ggcattccgct 2220
 tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc accgtcatca 2280
 40 ccgaaacgcg cgaggcagct gcggtaaagc tcatcagcgt ggtcgtgaag cgattcacag 2340
 atgtctgcct gttcatccgc gtccagctcg ttgagtttct ccagaagcgt taatgtctgg 2400
 45 cttctgataa agcgggcat gtttaagggc gttttttcct gtttggtcac tgatgcctcc 2460
 gtgtaagggg gatttctggt catgggggta atgataccga tgaaacgaga gaggatgctc 2520
 50 acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga gggtaaacia 2580
 ctggcgggtat ggatgcggcg ggaccagaga aaaatcactc aggtcaatg ccagcgcctc 2640
 gttaatacag atgtaggtgt tccacagggt agccagcagc atcctgcat gcagatccgg 2700
 55 aacataatgg tgcagggcg tgacttccgc gttccagac tttacgaaac acggaacccg 2760

EP 2 484 766 B1

aagaccattc atgttggtgc tcaggtcgca gacgttttgc agcagcagtc gcttcacggt 2820
 cgctcgcgta tcggtgattc attctgctaa ccagtaaggc aaccccgccca gcctagccgg 2880
 5 gtcctcaacg acaggagcac gatcatgcmc acccgtggcc aggaccaac gctgcggggg 2940
 gggggggggg gggggggggg gggggggggg tttctttcca attttttttt ttcgtcatta 3000
 10 taaaaatcat tacgaccgag attcccgggt aataactgat ataattaaat tgaagctcta 3060
 atttgtgagt ttagtataca tgcatttact tataatacag ttttttagtt ttgctggccg 3120
 15 catcttctca aatatgcttc ccagcctgct tttctgtaac gttcacctc taccttagca 3180
 tcccttccct ttgcaaatag tcctcttcca acaataataa tgtcagatcc tgtagagacc 3240
 acatcatcca cggttctata ctggtgacct aatgcmctc ccttgctatc taaaccaca 3300
 20 ccgggtgtca taatcaacca atcgtaacct tcatctctc cacccatgct tctttgagca 3360
 ataaagccga taacaaaatc tttgtcgtc ttcgcaatgt caacagtacc cttagtatat 3420
 25 tctccagtag atagggagcc cttgcatgac aattctgcta acatcaaaag gcctctaggt 3480
 tcctttgta cttcttctgc cgctgcttc aaaccgctaa caatacctgg gccaccaca 3540
 30 ccgtgtgcat tcgtaatgct tgcccattct gctattctgt atacaccgc agagtactgc 3600
 aatttgactg tattaccaat gtcagcaaat tttctgtctt cgaagagtaa aaaattgtac 3660
 35 ttggcggata atgccttttag cggcttaact gtgccctcca tggaaaaatc agtcaagata 3720
 tccacatgct tttttagtaa acaaattttg ggacctaatg cttcaactaa ctccagtaat 3780
 tccttggtgg tacgaacatc caatgaagca cacaagtttg tttgcttttc gtgcatgata 3840
 40 ttaaatagct tggcagcaac aggactagga tgagtagcag cacgttctt atatgtagct 3900
 ttcgacatga tttatcttcg tttctgcmg gtttttgctc tgtgcmgtt ggtaagaat 3960
 45 actgggcaat ttcatgtttc ttcaacacta catatgcmg tatataccea tctaagtctg 4020
 tgctccttcc ttcgttcttc cttctgttcg gagattaccg aatcaaaaaa atttcaagga 4080
 50 aaccgaaatc aaaaaaaga ataaaaaaa aatgatgaat tgaaccccc ccccccccc 4140
 ccccccccg atgcmccgcm tgcggctgct ggagatggcm gacgcmgtg atatgttctg 4200
 ccaagggctg gtttgcmcat tcacagttct cgcgaagaat tgattgcmct caattcttgg 4260
 55 agtgggtgaat ccgttagcmg ggtgcmccg gcttccattc aggtcmggt ggcccgcmct 4320

EP 2 484 766 B1

catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggata gggcggcgcc tacaatccat 4380
 gccaaaccgt tccatgtgct cgccgaggcg gcataaatcg ccgtgacgat cagcgggtcca 4440
 5 atgatcgaag ttaggctggt aagagccgcy agcgatcctt gaagctgtcc ctgatggtcg 4500
 tcatctacct gcctggacag catggcctgc aacgcgggca tcccgatgcc gccggaagcy 4560
 10 agaagaatca taatggggaa ggccatccag cctcgcgtcg cgaacgccag caagacgtag 4620
 cccagcgcgt cggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcgccgaa acgtttggtg 4680
 15 gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac cgcaagcgac 4740
 aggccgatca tcgtcgcgct ccagcgaaag cggtcctcgc cgaaaatgac ccagagcgct 4800
 gccggcacct gtcctacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata 4860
 20 gtcatgcccc gcgcccaccg gaaggagctg actgggttga aggctctcaa gggcatcggc 4920
 cgactccccg gactcggcgt tcaactttcga gctattatca acgccggaat acgtcagaaa 4980
 25 cagccgtgcc ccagggacca gaaagcctac tggtgagtat gttctttcgt gtgatttttc 5040
 cgaggatgag aacgacgata acgagcaca ctcggagtcg gaggacacgc ttattgcgct 5100
 30 gaacgcagcc aacatcagca ggctgtcaag actgagtatg gccacagagc tggattttctc 5160
 ggctcatalc tcaaagacgt ttagtaaaact ccgtctgccca gaaattgctg acgaggatgt 5220
 35 ataataatag atgaattacg aacaattgta gttcaaaaaa atttagtaac aatattgtct 5280
 agatgacaga tttgctgaaa ccagtgaact ccaataaacc actcaccgct acccaagaga 5340
 aacagatcag agtgctaggg cttgtttcag agtactacaa cgtttaccag aagcttgagc 5400
 40 aagttctcaa acgcggggtt gtcgacgctc tcccttatgc gactcctgca ttaggaagca 5460
 gccagtagt aggttgaggc cgttgagcac cgccgccga aggaatggtg tcgacgcgga 5520
 45 gaacgatctc ctcgacgcgg agaacgatct cctcgagatc caggaagcgc aacgacgcgg 5580
 ggaatttcgt aatcttcccc gaggaaaacc gttcccaaa gatttcaccg gcaataacgc 5640
 50 cttcattgac cgacagagat accacttgaa caacattctg aaacggcagg aggcgggtcc 5700
 gccgtggata gagaaacagg gcagtgtgga ggctcagatc cgccagtttc ggcgccagct 5760
 cgactccgat tggacactgc agccgtgca catcgtttgc gagaaacact cgaagaaaag 5820
 55 cgacacggac aagatccaga tcatgagcca gtacgccgag gcagagcgca acaataactc 5880

EP 2 484 766 B1

gagttatacg aagctgcgca gcagccaatg ggaacagaaa tacagcaact atctggaggt 5940
 caaattaataa gcgctgaatg acagcatccg aggttataat ctgcaggctc ctttggcatc 6000
 5 gcagaaaactg tatctaaacg caaactccga gctggaaaaa tgttaccggc gatgcgcgga 6060
 caatttagag gcggcgatca agaaacacct gctggggcag cagtctggag cacagtcttc 6120
 10 gatgggcccg agatcccacc gcgttcctgg gtaccgggac gtgaggcagc gcgacatcca 6180
 tcaaatatac caggcgccaa ccgagtctct cggaaaacag cttctggata tcttccgctg 6240
 15 gcggcgcaac gacgaataat agtccttga ggtgacggaa tatatatgtg tggagggtaa 6300
 atctgacagg gtgtagcaaa ggtaatattt tctaaaaca tgcaatcggc tgccccgcaa 6360
 cgggaaaaag aatgactttg gcactcttca ccagagtggg gtgtcccgtc cgtgtgtgca 6420
 20 aataggctcc cactggtcac cccggatttt gcagaaaaac agcaagttcc ggggtgtctc 6480
 actggtgtcc gccaaataaga ggagccggca ggcacggagt ctacatcaag ctgtctccga 6540
 25 tacactogac taccatccgg gtctctcaga gaggggaatg gcactataaa taccgcctcc 6600
 ttgcgctctc tgccttcac ggggaattcat gaccaccgtc tctacctctc aggtcagaca 6660
 30 gaactaccac caggattctg aggctgctat taaccgccag atcaacttgg agctgtacgc 6720
 ttcttacgtc tacctgtcca tgtcttacta cttcgaccgt gacgacgttg ctttgaagaa 6780
 cttcgccaag tacttcttgc accagtctca cgaggaaaga gagcacgctg agaagctgat 6840
 35 gaagctgcag aatcagagag gtggaagaat cttcttgag gacatcaaga agcctgattg 6900
 cgacgattgg gagtctggac tgaacgctat ggaatgcgct ttgcacttgg agaagaacgt 6960
 40 caaccagtct ctggttgagt tgcacaagct ggctactgac aagaacgacc ctcacctgtg 7020
 cgactttatc gagactcact acctgaacga gcaggtaag gctattaagg aactgggtga 7080
 45 ccacgttacc aacctgagaa agatgggtgc tcctgagtct ggattggctg agtacctggt 7140
 cgacaagcac actttgggag actctgataa cgaatctgga ggtggagacg atgatgacaa 7200
 50 gcaccctaac tcgcctttgg atgaggaaaa cctgactcag gaaaaccagg atagaggaaac 7260
 tcacgtagat ctgggattgg cttctgctaa cgtggacttc gctttctcgc tgtacaagca 7320
 gctggttttg aaggctcctg acaagaacgt gatcttctct cctctgtcta tttctaccgc 7380
 55 tctggctttc ttgtctctgg gtgctcacia cactaccctg accgagattc tgaagggact 7440

EP 2 484 766 B1

gaagttcaac ctgaccgaga cttccgaggc tgagattcac cagtctttcc agcacctgct 7500
 5 gagaactttg aaccagtcct ctgacgagtt gcagctgtct atgggaaacg ctatgttcgt 7560
 taaggaacag ctgtctctgt tggacagatt caccgaggac gctaagagat tgtacggatc 7620
 tgaggctttc gctactgact ttcaggattc tgctgctgcc aagaagctga ttaacgacta 7680
 10 cgtcaagaac ggaaccagag gaaagattac cgacctgatc aaggacttgg actctcagac 7740
 catgatggtc ctggccaact acattttctt caaggccaag tgggagatgc cttttgacct 7800
 15 tcaggatacc caccagtcta gattctacct gtccaagaag aagtgggtca tggtccttat 7860
 gatgtctctg caccacctga ccattcctta cttcagagat gaggaactgt cttgcactgt 7920
 20 tgtcagagctg aagtacaccg gaaacgcctc tgctctgttc attttgctg accaggacaa 7980
 gatggaagag gttgaggcta tgttgctgcc tgagactttg aagagatggc gcgactcttt 8040
 25 ggagttcaga gagatcggag agctgtacct gcctaagttc tctatttccc gcgactacaa 8100
 cctgaacgac attctgctgc agttgggaat tgaggaagca ttcacctcta aggctgacct 8160
 gtctggaatt accggtgcta gaaacctggc tgtctctcag gttgtccaca aggctgttct 8220
 30 ggacgttttt gaggaaggaa ctgaggcttc tgctgctacc gctgtcaaga ttaccctgct 8280
 gtctgctctg gttgagacta gaaccattgt cagattcaac cgccctttcc tgatgattat 8340
 35 tgtccctacc gacaccaga acatcttttt catgtccaag gtcaccaacc ctaagcaggc 8400
 tcaccatcat caccaccact aataaggatc ccctcgcgg acttgccaga ttctaaggag 8460
 40 acgtggaagg acataccgct tttgagaagc gtgtttgaaa atagttcttt ttctggttta 8520
 tatcgtttat gaagtgatga gatgaaaagc tgaaatagcg agtataggaa aatttaatga 8580
 45 aaattaaatt aaatattttc ttaggctatt agtcaccttc aaaatgccgg cgccttctaa 8640
 gaacgttgtc atgatcgaca actacgactc gtttacctgg aacctgtacg agtacctgtg 8700
 50 tcaggagggg gccaatgtcg aggttttcag gaacgatcag atcaccattc cggagattga 8760
 gcaggggtac c 8771
 55 <210> 6
 <211> 8126
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

EP 2 484 766 B1

<220>
<221> MOX-T
<222> (149)..(7948)
<223> MOX-Terminator H.polymorpha
5

<220>
<221> ampR
<222> (273)..(1233)
<223> á-lactamase
10

<220>
<221> ori
<222> (1378)..(2045)
15

<220>
<221> ScURA3
<222> (3130)..(4287)
<223> URA3 gene from S. cerevisiae
20

<220>
<221> HARS1
<222> (5087)..(5582)
<223> HARS1 H.polymorpha
25

<220>
<221> FMD-P
<222> (5717)..(6782)
<223> FMD-Promoter H.polymorpha
30

<220>
<221> FTH1
<222> (6790)..(7337)
<223> humanes Ferritin (H-Kette)
35

<220>
<221> G3
<222> (7339)..(7347)
<223> G3-Linker
40

<220>
<221> Ek
<222> (7348)..(7362)
<223> Enteropeptifase-Spaltstelle
45

<220>
<221> mhIL6
<222> (7363)..(7917)
<223> matures humanes Interleukin 6
50

<220>
<221> H6
<222> (7918)..(7935)
<223> 6-Histidin-His-Tag
55

<400> 6

EP 2 484 766 B1

agtcaccttc aaaatgccgg ccgcttctaa gaacgttgtc atgatcgaca actacgactc 60
 gtttacctgg aacctgtacg agtacctgtg tcaggaggga gccaatgtcg aggttttcag 120
 5 gaacgatcag atcaccattc cggagattga gcaggggtac ccaattcttg aagacgaaag 180
 ggccctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga taataatggg ttcttagacg 240
 10 tcaggtggca cttttcgggg aatgtgctgc ggaacccta tttgtttatt tttctaaata 300
 cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aatgcttca ataatttga 360
 15 aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgccgca 420
 ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctgggta aagtaaaaga tgctgaagat 480
 20 cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag 540
 agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagtctt gctatgtggc 600
 25 gcggtattat cccgtgttga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgat acactattct 660
 cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca 720
 gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata aactgctggc caacttactt 780
 30 ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat 840
 gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt 900
 35 gacaccacga tgccctgcagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta 960
 cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga 1020
 40 ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggttttattg ctgataaatc tggagccggt 1080
 gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc 1140
 45 gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct 1200
 gagatagggt cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata 1260
 50 ctttagattg atttaaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt 1320
 gataatctca tgacccaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc 1380
 55 gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cttttttttc tgccgtaat ctgctgcttg 1440

EP 2 484 766 B1

caaacaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 1500
 ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg 1560
 5 tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgcctcg 1620
 ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac 1680
 10 tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca 1740
 cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga 1800
 15 gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc 1860
 ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct 1920
 gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggcgg 1980
 20 agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc ttttacggt tcctggcctt ttgctggcct 2040
 tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc 2100
 25 tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc 2160
 gaggaagcgg aagagcgcct gatgcggtat tttctcctta cgcactctgtg cggtatattca 2220
 30 caccgcatat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagtat 2280
 aactccgct atcgctacgt gactgggtca tggctgcgcc ccgacacccg ccaacacccg 2340
 35 ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg 2400
 tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgaggcagc 2460
 tgccgtaaag ctcatcagcg tggctcgtgaa gcgattcaca gatgtctgcc tgttcatccg 2520
 40 cgtccagctc gttgagtttc tccagaagcg ttaatgtctg gcttctgata aagcggggcca 2580
 tgtaagggc ggttttttcc tgtttggtca ctgatgcctc cgtgtaaggg ggatttctgt 2640
 45 tcatgggggt aatgataccg atgaaacgag agaggatgct cacgatacgg gttactgatg 2700
 atgaacatgc ccggttactg gaacgttgtg agggtaaaca actggcggta tggatgcggc 2760
 50 gggaccagag aaaaatcact cagggtcaat gccagcgtt cgtaataca gatgtaggtg 2820
 ttccacaggg tagccagcag catcctgcga tgcagatccg gaacataatg gtgcagggcg 2880
 ctgacttccg cgtttccaga ctttacgaaa cacggaaacc gaagaccatt catgttggtg 2940
 55 ctcaggtcgc agacgttttg cagcagcagt cgcttcacgt tcgctcgcgt atccggtgatt 3000

EP 2 484 766 B1

cattctgcta accagtaagg caaccccgcc agcctagccg ggtcctcaac gacaggagca 3060
cgatcatgcg caccogtggc caggacccaa cgctgcgggg gggggggggg gggggggggg 3120
5 gggggggggg ttttctttcc aatTTTTTTTT tttcgtcatt ataaaaatca ttacgaccga 3180
gattccccgg taataactga tataattaaa ttgaagctct aatttgtgag tttagtatac 3240
10 atgcatttac ttataatata gTTTTTTtagt tttgctggcc gcaccttctc aaatatgctt 3300
cccagcctgc ttttctgtaa cgttcacctc ctaccttagc atcccttccc tttgcaaata 3360
15 gtcctcttcc aacaataata atgtcagatc ctgtagagac cacatcatcc acggttctat 3420
actggtgacc caatgctgtc cccttgtcat ctaaaccac accgggtgtc ataatcaacc 3480
aatcgtaacc ttcacatctt ccacccatgt ctctttgagc aataaagccg ataacaaaat 3540
20 ctttgtcgct cttcgcaatg tcaacagtac ccttagtata ttctccagta gatagggagc 3600
ccttgcagta caattctgct aacatcaaaa ggcctctagc ttcctttgtt acttcttctg 3660
25 ccgcctgctt caaacgcta acaatacctg ggcccaccac accgtgtgca ttcgtaatgt 3720
ctgcccattc tgctattctg tatacaccg cagagtactg caatttgact gtattaccaa 3780
30 tgtcagcaaa ttttctgtct tcgaagagta aaaaattgta cttggcggat aatgccttta 3840
goggettaac tgtgccctcc atggaaaaat cagtcaagat atccacatgt gTTTTtagta 3900
aacaattttt gggacctaata gcttcaacta actccagtaa ttccttgggtg gtacgaacat 3960
35 ccaatgaagc acacaagttt gtttgctttt cgtgcatgat attaaatagc ttggcagcaa 4020
caggactagg atgagtagca gcacgttctt tatatgtagc tttcgacatg atttatcttc 4080
40 gtttctgca ggtttttgtt ctgtgcagtt gggtaagaa tactgggcaa tttcatgttt 4140
cttcaacact acatatgctt atatatacca atctaagtct gtgctccttc cttcgttctt 4200
45 ccttctgttc ggagattacc gaatcaaaaa aatttcaagg aaaccgaaat caaaaaaaag 4260
aataaaaaaa aatgatgaa ttgaaacccc ccccccccc ccccccccc gatgcccgc 4320
50 gtgcccgtgc tggagatggc ggacgcgatg gatatgttct gccaaagggtt ggtttgcgca 4380
ttcacagttc tccgcaagaa ttgattggct ccaattcttg gagtggtgaa tccgttagcg 4440
aggtgccgcc ggcttcatt caggtcgagg tggccccgct ccatgcaccg cgacgcaacg 4500
55 cggggaggca gacaaggtat agggcggcgc ctacaatcca tgccaaccg ttcacatgtc 4560

EP 2 484 766 B1

tcgccgaggc ggcataaatc gccgtgacga tcagcgggcc aatgatcgaa gttaggctgg 4620
 taagagccgc gagcgatcct tgaagctgtc cctgatggtc gtcactctacc tgcctggaca 4680
 5 gcatggcctg caacgcgggc atccccgatgc cgccggaagc gagaagaatc ataatgggga 4740
 aggccatcca gcctcgcgtc gcgaacgcca gcaagacgta gcccagcgcg tcggccgcca 4800
 10 tgccggcgat aatggcctgc ttctcgccga aacgtttggt ggccggacca gtgacgaagg 4860
 cttgagcgcg ggcgtgcaag attccgaata ccgcaagcga caggccgatc atcgtcgcgc 4920
 15 tccagcgaaa gcggctcctc ccgaaaatga cccagagcgc tgccggcacc tgtcctacga 4980
 gttgcatgat aaagaagaca gtcataagtg cggcgacgat agtcatgccc cgcgccacc 5040
 ggaaggagct gactggggtg aaggctctca agggcatcgg tcgactcccg cgactcggcg 5100
 20 ttcactttcg agctattatc aacgccgga tacgtcagaa acagccgtgc cccagggacc 5160
 agaaagccta ctggtgagta tgttctttcg tgtgattttt ccgaggatga gaacgacgat 5220
 25 aacgagcaca actcggagtc ggaggacacg cttattgcgt tgaacgcagc caacatcagc 5280
 aggctgtcaa gactgagtat ggccacagag ctggatttct cggcctcata ctcaaagacg 5340
 30 tttagtaaac tccgtctgcc agaaattgct gacgaggatg tataataata gatgaattac 5400
 gaacaattgt agttcaaaaa aatttagtaa caatattgtc tagatgacag atttgctgaa 5460
 accagtgaac tccaataaac cactcaccgc tacccaagag aaacagatca gagtgctagg 5520
 35 gcttgtttca gactactaca acgtttacca gaagcttgag caagttctca aacgcggggt 5580
 tgtcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 5640
 40 ccgttgagca ccgccgccgc aaggaatggt gtcgacgcg agaacgatct cctcgacgcg 5700
 gagaacgatc tcctcgagat ccaggaagcg caacgacgcg ggaatttcg taatcttccc 5760
 45 cgaggaaaac cgcttcccaa agatttcacc ggcaataacg ccttcattga ccgcacagag 5820
 taccacttga acaacattct gaaacggcag gaggcggttc cgccgtggat agagaaacag 5880
 50 ggcagtgtgg aggctcagat ccgccagttt cggcgcagc tcgactccga ttggacactg 5940
 caggccgtgc acatcgtttg cgagaaacac tcgaagaaaa gcgacacgga caagatccag 6000
 atcatgagcc agtacgccga ggacagcgc aacaataact cgagttatac gaagctgcgc 6060
 55 agcagccaat ggaacagaa atacagcaac tatctggagg tcaaattaa agcgtgaat 6120

EP 2 484 766 B1

gacagcatcc gaggttataa tctgcaggct ctttggcat cgagaaact gtatctaaac 6180
gcaaactccg agctggaaaa atgttaccgg cgatgcgcgg acaatttaga ggcggcgatc 6240
5 aagaaacacc tgctgggcca gcagtctgga gcacagtctt cgatgggccc gagatcccac 6300
cgcgttcctg ggtaccggga cgtgaggcag cgcgacatcc atcaaatata ccaggcgcca 6360
10 accgagtctc tcggaaaaca gcttctggat atcttccgct ggcggcgcaa cgacgaataa 6420
tagtccctgg aggtgacgga atatatatgt gtggagggta aatctgacag ggtgtagcaa 6480
15 aggtaatatt ttctaaaac atgcaatcgg ctgccccgca acgggaaaaa gaatgacttt 6540
ggcactcttc accagagtgg ggtgtcccgc tcgtgtgtgc aaataggctc cactgggtca 6600
20 ccccgattt tgcagaaaaa cagcaagttc cggggtgtct cactgggtgc cgccaataag 6660
aggagccggc aggcacggag tctacatcaa gctgtctccg atacactcga ctaccatccg 6720
ggctctcag agaggggaat ggcactataa ataccgctc cttgcgctct ctgccttcat 6780
25 cgggaattca tgaccaccgc ttctacctct caggtcagac agaactacca ccaggattct 6840
gaggctgcta ttaaccgcca gatcaacttg gagctgtacg cttcttacgt ctacctgtcc 6900
30 atgtcttact acttcgaccg tgacgacggt gctttgaaga acttcgcaa gtacttcttg 6960
caccagtctc acgaggaaag agagcacgct gagaagctga tgaagctgca gaatcagaga 7020
35 ggtggaagaa tcttcttgca ggacatcaag aagcctgatt gcgacgattg ggagtctgga 7080
ctgaacgcta tggaatgcgc tttgcacttg gagaagaacg tcaaccagtc tctgttgagg 7140
ttgcacaagc tggctactga caagaacgac cctcacctgt gcgactttat cgagactcac 7200
40 tacctgaacg agcaggtaa ggctattaag gaactgggtg accacgttac caacctgaga 7260
aagatgggtg ctctgagtc tggattggct gactacctgt tcgacaagca cactttggga 7320
45 gactctgata acgaatctgg aggtggagac gatgatgaca aggtcctgt tcctcctggt 7380
gaagattcta aggacgtcgc tgctcctcac agacagcctt tgacctcttc tgagcgcac 7440
50 gataagcaga ttcgctacat tctggacgga atttctgcc tgagaaagga aacctgcaac 7500
aagtctaaca tgtgcgagtc ctctaaggaa gctctggctg agaacaacct gaacctgcct 7560
aagatggctg agaaggacgg atgttccag tctggattca acgaggaaac ctgcctggtc 7620
55 aagattatta ccggactggt ggagtccgag gtctacttgg agtacctgca gaacagattc 7680

EP 2 484 766 B1

	gagtcctctg aagaacaggc tagagctgtc cagatgtcta ccaaggtcct gattcagttc	7740
	ctgcagaaga aggctaagaa cctggacgct attactactc ctgaccctac cactaacgct	7800
5	tctctgctga ctaagctgca ggctcagaat cagtggttgc aggacatgac cactcacctg	7860
	atcctgagat ccttcaagga atttctgcag tcctctctga gagctttgag acagatgcac	7920
10	catcatcacc accactaata aggatcccc tcgcgactt gccagattct aaggagacgt	7980
	ggaaggacat accgcttttg agaagcgtgt ttgaaaatag ttcttttct ggtttatatc	8040
15	gtttatgaag tgatgagatg aaaagctgaa atagcgagta taggaaaatt taatgaaaat	8100
	taaattaaat attttcttag gctatt	8126
20	<210> 7 <211> 8052 <212> DNA <213> künstliche Sequenz	
25	<220> <221> ampR <222> (212)..(1072) <223> á-lactamase	
30	<220> <221> ori <222> (1217)..(1889)	
35	<220> <221> ScURA3 <222> (2969) .. (4126) <223> URA3 gene from S. cerevisiae	
40	<220> <221> HARS1 <222> (4926)..(5925) <223> HARS1 H. polymorpha	
45	<220> <221> FMD-P <222> (5560)..(6625) <223> FMD-Promotor H. polymorpha	
50	<220> <221> FTH1 <222> (6633)..(7181) <223> humanes Ferritin (schwere Kette)	
55	<220> <221> G3 <222> (7182)..(7190) <223> G3-Linker	

EP 2 484 766 B1

<220>
 <221> Ek
 <222> (7191)..(7205)
 <223> Enteropeptifase-Spaltstelle

5

<220>
 <221> mhIFNalpha-2a
 <222> (7206) .. (7703)
 <223> matures humanes Interferon alpha 2a

10

<220>
 <221> MOX-T
 <222> (7713)..(8040)
 <223> MOX-Terminator H. polymorpha

15

<400> 7

caattcttga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctat	ttataggta atgcatgat	60
aataatgggt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga	aatgtgcgcg gaaccctat	120
ttgtttat	ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat	aaccctgata 180
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt	caacatttcc gtgtcgcct	240
tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct	caccagaaa cgctggtgaa	300
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt	tacatcgaac tggatctcaa	360
cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt	ttccaatga tgagcacttt	420
taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtggtgac	gccgggcaag agcaactcgg	480
tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac	tcaccagtca cagaaaagca	540
tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct	gccataacca tgagtgataa	600
cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg	aaggagctaa ccgctttttt	660
gcacaacatg ggggatcatg taactcgctc tgatcgttgg	gaaccggagc tgaatgaagc	720
cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca	atggcaacaa cgttgcgcaa	780
actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa	caattaatag actggatgga	840
ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt	ccggctggct ggtttattgc	900

55

EP 2 484 766 B1

tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 960
 tgtaagccc tcccgatatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 1020
 5 acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 1080
 ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat 1140
 10 ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaatac ccttaacgtg agttttcgtt 1200
 ccaactgagcg tcagaccccc tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 1260
 15 gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc 1320
 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 1380
 aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 1440
 20 gcctacatac ctgctctgctc taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 1500
 gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 1560
 25 aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 1620
 cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta 1680
 30 tccggtaaagc ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 1740
 ctggtatctt tatagtctctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg 1800
 atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 1860
 35 cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 1920
 ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 1980
 40 gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgcctg atgcggtatt ttctccttac 2040
 gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgactctc agtacaatct gctctgatgc 2100
 45 cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat ggctgcgccc 2160
 cgacaccgca caacaccgca tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc ggcacccgct 2220
 50 tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc accgtcatca 2280
 ccgaaacgca cgaggcagct gcggtaaagc tcatcagcgt ggtcgtgaag cgattcacag 2340
 atgtctgcct gttcatccgc gtccagctcg ttgagtttct ccagaagcgt taatgtctgg 2400
 55 cttctgataa agcgggcat gtaagggcg gttttttcct gtttggtcac tgatgcctcc 2460

EP 2 484 766 B1

gtgtaagggg gatttctggt catgggggta atgataccga tgaacgaga gaggatgctc 2520
 acgatacggg ttaactgatga tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga gggtaaacia 2580
 5 ctggcgggat ggatgcggcg ggaccagaga aaaatcactc agggccaatg ccagcgcttc 2640
 gtttaatacag atgtaggtgt tccacagggg agccagcagc atcctgcgat gcagatccgg 2700
 10 aacataatgg tgcagggcgc tgacttccgc gtttccagac tttacgaaac acggaaaccg 2760
 aagaccattc atgttgttgc tcaggtcgca gacgttttgc agcagcagtc gcttcacggt 2820
 15 cgctcgcgta tcgggtgattc attctgctaa ccagtaaggc aaccccgcca gcctagccgg 2880
 gtccctcaacg acaggagcac gatcatgcmc acccgtggcc aggacccaac gctgcggggg 2940
 gggggggggg gggggggggg gggggggggg tttctttcca attttttttt ttcgctatta 3000
 20 taaaaatcat tacgaccgag attcccggg aataactgat ataattaaat tgaagctcta 3060
 atttgtgagt ttagtataca tgcatttact tataatacag ttttttagtt ttgctggccg 3120
 25 catcttctca aatatgcttc ccagcctgct tttctgtaac gttcaccctc taccttagca 3180
 tcccttcctt ttgcaaatag tcctcttcca acaataataa tgcagatcc tgtagagacc 3240
 30 acatcatcca cggttctata ctggtgacc aatgcgtctc ctttgcctc taaaccaca 3300
 ccgggtgtca taatcaacca atcgtaacct tcattcttcc caccatgct tctttgagca 3360
 35 ataaagccga taacaaaatc tttgtcgtc ttcgcaatgt caacagtacc cttagtatat 3420
 tctccagtag atagggagcc cttgcatgac aattctgcta acatcaaaag gcctctaggt 3480
 tcctttgtta cttcttctgc cgctgcttc aaaccgctaa caatacctgg gccaccaca 3540
 40 ccgtgtgcat tcgtaatgtc tgcccattct gctattctgt atacaccgc agagtactgc 3600
 aatttgactg tattaccaat gtcagcaaat tttctgtctt cgaagagtaa aaaattgtac 3660
 45 ttggcgggata atgcctttag cggcttaact gtgccctcca tggaaaaatc agtcaagata 3720
 tccacatgtg tttttagtaa acaaattttg ggacctaattg cttcaactaa ctccagtaat 3780
 50 tccttggtgg tacgaacatc caatgaagca cacaagtttg tttgcttttc gtgcatgata 3840
 ttaaatagct tggcagcaac aggactagga tgagtagcag cacgttcctt atatgtagct 3900
 ttcgacatga tttatcttgc tttcctgcag gttttgttcc tgtgcagttg ggtaagaat 3960
 55 actgggcaat tcatgtttc ttcaacacta catatgcgta tatataccaa tctaagtctg 4020

EP 2 484 766 B1

tgctccttcc ttcgttcttc cttctgttcg gagattaccg aatcaaaaaa atttcaagga 4080
 aaccgaaatc aaaaaaaaga ataaaaaaaa aatgatgaat tgaaaccccc ccccccccc 4140
 5 ccccccccg atgcgccgcg tgcggctgct ggagatggcg gacgcgatgg atatgttctg 4200
 ccaagggttg gtttgcgcat tcacagttct ccgcaagaat tgattggctc caattcttgg 4260
 10 agtggatgaat ccgttagcga ggtgccgccc gcttccattc aggtcgaggt ggcccggctc 4320
 catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggtata gggcggcgcc tacaatccat 4380
 15 gccaacccgt tccatgtgct cgccgaggcg gcataaatcg ccgtgacgat cagcgggtcca 4440
 atgatcgaag ttaggctggt aagagccgcg agcgatcctt gaagctgtcc ctgatggtcg 4500
 tcatctacct gcctggacag catggcctgc aacgcgggca tcccgatgcc gccggaagcg 4560
 20 agaagaatca taatggggaa ggccatccag cctcgcgtcg cgaacgccag caagacgtag 4620
 cccagcgcgt cggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcgcgaa acgtttggtg 4680
 25 gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac cgcaagcgac 4740
 aggccgatca tcgtcgcgct ccagcgaaag cggtcctcgc cgaaaatgac ccagagcgct 4800
 30 gccggcacct gtcctacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata 4860
 gtcatgcccc gcgcccaccg gaaggagctg actgggttga aggctctcaa gggcatcggg 4920
 cgactcccgc gactcggcgt tcactttcga gctattatca acgccggaat acgtcagaaa 4980
 35 cagccgtgcc ccagggacca gaaagcctac tggtagtat gttctttcgt gtgatttttc 5040
 cgaggatgag aacgacgata acgagcacia ctcggagtgc gaggacacgc ttattgcggt 5100
 40 gaacgcagcc aacatcagca ggctgtcaag actgagtatg gccacagagc tggatttttc 5160
 ggctcatac tcaaagacgt ttagtaact ccgtctgcca gaaattgctg acgaggatgt 5220
 45 ataataatag atgaattacg aacaattgta gttcaaaaaa atttagtaac aatattgtct 5280
 agatgacaga tttgctgaaa ccagtgaact ccaataaacc actcaccgct acccaagaga 5340
 50 aacagatcag agtgctaggg cttgtttcag agtactaaa cgtttaccag aagctagctt 5400
 gagcaagttc tcaaacgcgg gtttgcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga 5460
 agcagcccag tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgtcgacg 5520
 55 cggagaacga tctcctcgac gcggagaacg atctcctcga gatccaggaa gcgcaacgac 5580

EP 2 484 766 B1

gcggggaatt tcgtaatctt ccccgaggaa aaccgcttcc caagatttc accggcaata 5640
 acgccttcat tgaccgcaca gagtaccact tgaacaacat tctgaaacgg caggaggcgg 5700
 5 ttccgccgtg gatagagaaa cagggcagtg tggaggctca gatccgccag tttcggcgcc 5760
 agctcgactc cgattggaca ctgcaggccg tgcacatcgt ttgcgagaaa cactcgaaga 5820
 10 aaagcgacac ggacaagatc cagatcatga gccagtacgc cgaggcagag cgcaacaata 5880
 actcgagtta tacgaagctg cgcagcagcc aatgggaaca gaaatacagc aactatctgg 5940
 15 aggtcaaatt aaaagcgctg aatgacagca tccgaggta taatctgcag gctcctttgg 6000
 catcgcagaa actgtatcta aacgcaaact ccgagctgga aaaatgttac cggcgatgcg 6060
 cggacaattt agaggcggcg atcaagaaac acctgctggg cgagcagtct ggagcacagt 6120
 20 cttcgatggg cccgagatcc caccgcgttc ctgggtaccg ggacgtgagg cagcgcgaca 6180
 tccatcaaat ataccaggcg ccaaccgagt ctctcgaaa acagcttctg gatattctcc 6240
 25 gctggcggcg caacgacgaa taatagtccc tggaggtgac ggaatatata tgtgtggagg 6300
 gtaaactctga caggggtgtag caaaggtaat attttctaa aacatgcaat cggctgcccc 6360
 30 gcaacgggaa aaagaatgac tttggcactc ttcaccagag tggggtgtcc cgctcgtgtg 6420
 tgcaaatagg ctcccactgg tcaccccgga ttttgagaa aaacagcaag ttccggggtg 6480
 tctcactggt gtccgccaat aagaggagcc ggaggcagc gagtctacat caagctgtct 6540
 35 ccgatacact cgactacat ccgggtctct cagagagggg aatggcacta taaataccgc 6600
 ctcttgcgc tctctgcctt catcgggaat tcatgaccac cgcttctacc tctcaggctca 6660
 40 gacagaacta ccaccaggat tctgaggctg ctattaaccg ccagatcaac ttggagctgt 6720
 acgcttctta cgtctacctg tccatgtctt actacttca cgtgacgac gttgctttga 6780
 45 agaacttcgc caagtacttc ttgcaccagt ctcacgagga aagagagcac gctgagaagc 6840
 tgatgaagct gcagaatcag agagggtgaa gaatcttctt gcaggacatc aagaagcctg 6900
 attgcgacga ttgggagtct ggactgaacg ctatggaatg cgctttgcac ttggagaaga 6960
 acgtcaacca gtctctgttg gagttgcaca agctggctac tgacaagaac gaccctcacc 7020
 55 tgtgcgactt tatcgagact cactacctga acgagcaggt caaggctatt aaggaactgg 7080
 gtgaccacgt taccaacctg agaaagatgg gtgctcctga gtctggattg gctgagttacc 7140

EP 2 484 766 B1

	tgttcgacaa gcacactttg ggagactctg ataacgaatc tggaggtgga gacgatgatg	7200
	acaagtgtga tttgccacag acacactccc tgggctcgcg cagaaccctg atgctgttgg	7260
5	ctcagatgag aaagatctct ctgttttctg gtttgaagga cagacacgac tttggcttcc	7320
	cgcaggagga atttggaac cagtttcaga aagcagaaac aatccctgtg ctgcacgaga	7380
10	tgattcagca gatttttaac ctgttctcta cgaaggactc ctcggcagct tgggatgaga	7440
	ctttgctgga taaattttac actgagttgt atcagcaact gaacgacctg gaggcacgag	7500
15	tgatccaagg tgtcggcgtt acagaaacce ctttgatgaa ggaggattcc atcctggcag	7560
	ttagaaagta cttccagcgc attacattgt acctgaagga gaaaaagtac tcgccatgag	7620
20	cctgggaggt cgtcagagca gagatcatga gatccttttc gctgtccaca aacctgcagg	7680
	agtctttgag atcgaaggag taataaggat cccctcgcg gacttgccag attctaagga	7740
25	gacgtggaag gacataccgc ttttgagaag cgtgtttgaa aatagttctt tttctggttt	7800
	atatcgttta tgaagtgat agatgaaaag ctgaaatagc gagtatagga aaatttaatg	7860
30	aaaattaaat taaatatttt cttaggctat tagtcacctt caaaatgccg gccgcttcta	7920
	agaacgttgt catgatcgac aactacgact cgtttacctg gaacctgtac gagtacctgt	7980
35	gtcaggaggg agccaatgtc gaggttttca ggaacgatca gatcaccatt ccggagattg	8040
	agcaggggta cc	8052
40	<210> 8 <211> 7655 <212> DNA <213> künstliche Sequenz	
45	<220> <221> ampR <222> (212)..(1072) <223> á-lactamase	
50	<220> <221> ori <222> (1217)..(1889)	
55	<220> <221> ScURA3 <222> (2969)..(4126) <223> URA3-Gen aus S. cerevisiae	
	<220> <221> HARS1	

EP 2 484 766 B1

<222> (4926)..(5921)
 <223> HARS1 H.polymorpha

5 <220>
 <221> FMD-P
 <222> (5556)..(6621)
 <223> FMD-Promoter H.polymorpha

10 <220>
 <221> FTH1
 <222> (6629)..(7177)
 <223> FTH1

15 <220>
 <221> G3
 <222> (7178)..(7186)
 <223> G3 -Spacer

20 <220>
 <221> Ek
 <222> (7187)..(7201)
 <223> Enteropeptidase-Trennstelle

25 <220>
 <221> PTH
 <222> (7202)..(7303)
 <223> Parathyroid-Hormon

30 <220>
 <221> MOX-T
 <222> (7316)..(7693)
 <223> MOX-Terminator H.polymorpha

35 <400> 8

caattcttga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctat	ttatagg	tta atgtcatgat	60						
aataatgggt tcttagacgt caggtggcac ttttcg	gggga	aatgtg	cgcg gaacc	120					
40 ttgtttat	ttctaa	atac att	caaata	gtatcc	gctc at	gagaca	aat aac	cctgata	180
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgc	ccct	240				
45 tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc	tgttttt	tgct cacc	cagaaa	cgctg	gtgaa	300			
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaac	tggatct	caa	360				
50 cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcacttt	420					
taaagttctg ctatgtggcg cggattatc	ccgtg	tgtgac	gccggg	caag	agcaact	cg	480		

55

EP 2 484 766 B1

tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 540
 tcttacggat ggcacgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtataa 600
 5 cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt 660
 gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc 720
 10 cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca atggcaacaa cgttgcgcaa 780
 actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 840
 15 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccggcctt ccggctggct ggtttattgc 900
 tgataaatct ggagccgggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 960
 tggtaaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 1020
 20 acgaaataga cagatcgcctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 1080
 ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat 1140
 25 ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaactc ccttaacgtg agttttcggt 1200
 ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 1260
 30 ggcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc 1320
 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgagataacc 1380
 aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 1440
 35 gcctacatac ctgcctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 1500
 gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 1560
 40 aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 1620
 cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta 1680
 45 tccggtaagc ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 1740
 ctggtatctt tatagtctctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttttgtg 1800
 50 atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 1860
 cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 1920
 ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagacc gaacgaccga 1980
 55 gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgctg atgcgggtatt ttctccttac 2040

EP 2 484 766 B1

gcatctgtgc ggtathtcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc 2100
 cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat ggctgcgccc 2160
 5 cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc ggcacccgct 2220
 tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggthttc accgtcatca 2280
 10 ccgaaacgcy cgaggcagct gcyggtaaagc tcatcagcgt ggtcgtgaag cgattcacag 2340
 atgtctgcct gttcatccgc gtccagctcy ttgagthttc ccagaagcgt taatgtctgg 2400
 15 cttctgataa agcggggccat gtttaagggcy gththththct gthtggtcac tgatgcctcc 2460
 gtgtaagggg gaththctgth catgggggta atgataccga tgaaacgaga gaggatgctc 2520
 acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga gggtaaaaca 2580
 20 ctggcgggat ggatgcggcy ggaccagaga aaaatcactc aggttcaatg ccagcgcctc 2640
 gtttaatacag atgtaggtgt tccacagggc agccagcagc atcctgcgat gcagatccgg 2700
 25 aacataatgg tgcagggcy tgacttccgc gthtccagac thtacgaaac acggaaaccg 2760
 aagaccattc atgttgthtgc tcaggtcga gacgththtgc agcagcagtc gthtccagth 2820
 30 cgctcgcgta tcgggtgattc atthctgctaa ccagtaaggc aaccccgcca gcctagccgg 2880
 gtcttcaacg acaggagcac gatcatgcgc acccgtggcc aggacccaac gctgcggggg 2940
 35 gggggggggg gggggggggg gggggggggt thtctthcca atththththt thcgtcatta 3000
 taaaaatcat tacgaccgag atthccgggt aataactgat ataathaat tgaagctcta 3060
 atthgtgagt thagtataca tgcaththtact tataatacag ththththtagth thgctggccg 3120
 40 catctthtca aatathcttc ccagcctgct thtctgtaac gthtccactc taccttagca 3180
 thcctthcct thgcaaatag thctthtcca acaataataa thtcagatcc thtagagacc 3240
 45 acatcatcca cggthtctata ctgthgacc aatgcgtctc cthtgctatc thaaaccaca 3300
 ccgggtgtca thatcaacca atcgtaacct tcatctctc caccatgth tctthgagca 3360
 50 ataaagccga thaaaaatc thtgctcgtc thcgaatgt caacagthc cthtagtht 3420
 thtccagth atagggagcc cthgcatgac aathctgcta acatcaaaag gcctctagth 3480
 thctthgth cthctthtgc cgcctgctc aaaccgctaa caatacctgg gccaccaca 3540
 55 ccgtgtgcat thgthaatgth thccattct gctaththtgt athacccgc agagthtgc 3600

EP 2 484 766 B1

aatttgactg tattaccaat gtcagcaaat tttctgtcctt cgaagagtaa aaaattgtac 3660

ttggcggata atgccttttag cggcttaact gtgccctcca tggaaaaatc agtcaagata 3720

5 tccacatgtg tttttagtaa acaaattttg ggacctaatg cttcaactaa ctccagtaat 3780

tccttggtgg tacgaacatc caatgaagca cacaagtttg tttgcttttc gtgcatgata 3840

10 ttaaatagct tggcagcaac aggactagga tgagtagcag cacgttcctt atatgtagct 3900

ttcgacatga tttatcttcg tttcctgcag gtttttgttc tgtgcagttg ggtaagaat 3960

15 actgggcaat ttcattgttc ttcaacta catatgcgta tatataccea tctaagtctg 4020

tgctccttcc ttctgttctc cttctgttcg gagattaccg aatcaaaaaa atttcaagga 4080

aaccgaaatc aaaaaaaga ataaaaaaa aatgatgaat tgaaccccc ccccccccc 4140

20 ccccccccg atgcgccgcg tgcggctgct ggagatggcg gacgcgatgg atatgttctg 4200

ccaagggttg gtttgcgcat tcacagttct ccgcaagaat tgattggctc caattcttgg 4260

25 agtgggtgaat ccgtagcga ggtgccgccg gcttcattc aggtcgaggt ggcccggctc 4320

catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggtata gggcggcgcc tacaatccat 4380

30 gccaacccgt tccatgtgct cgccgaggcg gcataaatcg ccgtgacgat cagcggcca 4440

atgatcgaag ttaggctggt aagagccgcg agcgatcctt gaagctgtcc ctgatggtcg 4500

35 tcactacct gcctggacag catggcctgc aacgcgggca tcccgatgcc gccggaagcg 4560

agaagaatca taatgggaa ggccatccag cctcgcgtcg cgaacgccag caagacgtag 4620

cccagcgcgt cggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcgcgaa acgtttggtg 4680

40 gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac cgcaagcgac 4740

aggccgatca tcgtcgcgct ccagcgaag cggcctcgc cgaaaatgac ccagagcgct 4800

45 gccggcacct gtcctacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata 4860

gtcatgcccc gcgcccaccg gaaggagctg actgggttga aggctctcaa gggcatcggt 4920

50 cgactcccgc gactcggcgt tcaacttcga gctattatca acgccggaat acgtcagaaa 4980

cagccgtgcc ccaggacca gaaagcctac tggtagtat gttctttcgt gtgatttttc 5040

cgaggatgag aacgacgata acgagcaca ctcggagtcg gaggacacgc ttattgcggt 5100

55 gaacgcagcc aacatcagca ggctgtcaag actgagtatg gccacagagc tggatttctc 5160

EP 2 484 766 B1

ggcctcatac tcaaagacgt ttagtaaact ccgtctgcca gaaattgctg acgaggatgt 5220
 ataataatag atgaattacg aacaattgta gttcaaaaaa atttagtaac aatattgtct 5280
 5 agatgacaga tttgctgaaa ccagtgaact ccaataaacc actcaccgct acccaagaga 5340
 aacagatcag agtgctaggg cttgtttcag agtactacaa cgtttaccag aagcttgagc 5400
 10 aagttctcaa acgoggggtt gtcgacgctc tcccttatgc gactcctgca ttaggaagca 5460
 gccagtagt aggttgaggc cgttgagcac cgccgccgca aggaatggtg tcgacgcgga 5520
 15 gaacgatctc ctgacgcgg agaacgatct cctcgagatc caggaagcgc aacgacgcgg 5580
 ggaatttctg aatcttcccc gaggaaaacc gcttcccaa gatttcaccg gcaataacgc 5640
 cttcattgac cgcacagagt accacttgaa caacattctg aaacggcagg aggcggttcc 5700
 20 gccgtggata gagaaacagg gcagtgtgga ggctcagatc cgccagtttc ggcgccagct 5760
 cgactccgat tggacactgc aggccgtgca catcgtttgc gagaaacact cgaagaaaag 5820
 25 cgacacggac aagatccaga tcatgagcca gtacgccgag gcagagcgca acaataactc 5880
 gagttatacg aagctgcgca gcagccaatg ggaacagaaa tacagcaact atctggaggt 5940
 30 caaattaaaa gcgctgaatg acagcatccg aggttataat ctgcaggctc ctttggcatc 6000
 gcagaaaactg tatctaaacg caaactccga gctggaaaaa tgttaccggc gatgcgcgga 6060
 caatttagag gcggcgatca agaaacacct gctgggcgag cagtctggag cacagtcttc 6120
 35 gatgggcccg agatcccacc gcgttctggt gtaccgggac gtgaggcagc gcgacatcca 6180
 tcaaatacag caggcgccaa ccgagtctct cggaaaacag cttctggata tcttccgctg 6240
 40 gcggcgcaac gacgaataat agtccctgga ggtgacggaa tatatatgtg tggagggtaa 6300
 atctgacagg gtgtagcaaa ggtaatattt tcctaaaaca tgcaatcggc tgccccgcaa 6360
 45 cgggaaaaag aatgactttg gcaacttca ccagagtggg gtgtcccgtc cgtgtgtgca 6420
 aataggctcc cactggtcac cccggatttt gcagaaaaac agcaagttcc ggggtgtctc 6480
 50 actggtgtcc gccaataaga ggagccggca ggcacggagt ctacatcaag ctgtctccga 6540
 tacactcgac taccatccgg gtctctcaga gaggggaatg gcactataaa taccgcctcc 6600
 ttgcgctctc tgccttcatc ggaattcat gaccaccgct tctacctctc aggtcagaca 6660
 55 gaactaccac caggattctg aggctgctat taaccgccag atcaacttgg agctgtacgc 6720

EP 2 484 766 B1

	ttcttacgtc tacctgtcca tgtcttacta cttcgaccgt gacgacgctg ctttgaagaa	6780
	cttcgccaag tacttcttgc accagtctca cgaggaaaga gagcacgctg agaagctgat	6840
5	gaagctgcag aatcagagag gtggaagaat cttcttgcag gacatcaaga agcctgattg	6900
	cgacgattgg gagtctggac tgaacgctat ggaatgcgct ttgcacttgg agaagaacgt	6960
10	caaccagtct ctgttggagt tgcacaagct ggctactgac aagaacgacc ctcacctgtg	7020
	cgactttatc gagactcact acctgaacga gcaggtaag gctattaagg aactgggtga	7080
15	ccacgttacc aacctgagaa agatgggtgc tcttgagtct ggattggctg agtacctggt	7140
	cgacaagcac actttgggag actctgataa cgaatctgga ggtggagacg atgatgacaa	7200
20	gtcgggtgtct gagattcagc tgatgcacaa cctgggtaag cacctgaact ctatggagag	7260
	agtggagtgg ctgagaaaga agttgcagga tgtccacaac ttctagtagg gatccccctc	7320
25	gcggaacttgc cagattctaa ggagacgtgg aaggacatac cgcttttgag aagcgtgttt	7380
	gaaaatagtt ctttttctgg tttatatcgt ttatgaagtg atgagatgaa aagctgaaat	7440
30	agcgagtata ggaaaattta atgaaaatta aattaaatat tttcttaggc tattagtcac	7500
	cttcaaaatg ccggccgctt ctaagaacgt tgtcatgacg gacaactacg actcgtttac	7560
35	ctggaacctg tacgagtacc tgtgtcagga gggagccaat gtcgaggttt tcaggaacga	7620
	tcagatcacc attccggaga ttgagcaggg gtacc	7655
	<210> 9	
	<211> 2782	
40	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	
	<400> 9	
45	ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgcgcta aatttttggtt aaatcagctc	60
	attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga	120
50	gataggggtg agtggccgct acagggcgct cccattcgcc attcaggctg cgcaactggt	180
	gggaagggcg tttcgggtgcg ggctctctcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt	240
55	gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg	300
	acggccagtg agcgcgacgt aatacgactc actatagggc gaattggcgg aaggccgtca	360

EP 2 484 766 B1

aggcctaggc ggcgccaatt cggtgaccac gttaccaacc tgagaaagat ggggtgctct 420

gagtctggat tggctgagta cctgttcgac aagcacactt tgggagactc tgataacgaa 480

5 tctggagggtg gagacgatga tgacaagcac cctaactcgc ctttgatga ggaaaacctg 540

actcaggaaa accaggatag aggaactcac gtagatctgg gattggcttc tgctaactgtg 600

10 gacttcgctt tctcgtctgta caaagcttgg agaaaagagc tcctacttct tcgtctacca 660

agaagactca gctgcagttg gagcacttgt tgctagatct aagcttgga aagagagctc 720

15 ctgttcctcc tgggtgaagat tctaaggacg tcgctgetcc tcacagacag ctttgacct 780

cttctgagcg catcgatgga tccttaatta actggcctca tgggccttcc gctcactgcc 840

cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa catggtcata gctgtttcct 900

20 tgcgtattgg gcgctctccg cttcctcgtc cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcgggt 960

aaagcctggg gtgcctaatt agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 1020

25 gcggtgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc 1080

tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 1140

30 agtccctcgt tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt 1200

ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg 1260

35 taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 1320

gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg 1380

gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc 1440

40 ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg 1500

ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt gtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 1560

45 gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 1620

caagaagatc ctttgatctt ttctacggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 1680

50 taagggattt tggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa 1740

aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttacca 1800

tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcctc catagttgcc 1860

55 tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct 1920

EP 2 484 766 B1

gcaatgatac cgcgagaacc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca 1980
 gccggaaggc ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat cgcctccat ccagtctatt 2040
 5 aattggtgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt 2100
 gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc 2160
 10 ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc 2220
 tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt 2280
 15 atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 2340
 ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 2400
 20 ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 2460
 ggaaaaagtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctggtgag atccagttcg 2520
 25 atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 2580
 gggtgagcaa aacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 2640
 30 tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 2700
 ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 2760
 acatttcccc gaaaagtgcc ac 2782
 35
 <210> 10
 <211> 2906
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz
 40
 <400> 10
 45
 50
 55

EP 2 484 766 B1

ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgcgta aatttttggtt aaatcagctc 60
5 attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
gataggggttg agtggccgct acagggcgct cccattcgcc attcaggctg cgcaactggt 180
gggaagggcg tttcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa aggggatgt 240
10 gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg 300
acggccagtg agcgcgacgt aatcagactc actatagggc gaattggcgg aaggccgtca 360
15 aggccgcatg gcgcgccgaa ttcaagcttg gagaaaagac accctaactc gcctttggat 420
gaggaaaacc tgactcagga aaaccaggat agaggaactc acgtagatct gggattggct 480
20
25
30
35
40
45
50
55

EP 2 484 766 B1

tctgctaacg tggacttcgc tttctcgtg tacaggtgac cacgttacca acctgagaaa 540
gatgggtgct cctgagtctg gattggctga gtacctgttc gacaagcaca ctttgggaga 600
5 ctctgataac gaatctggag gtggagacga tgatgacaag gctcctgttc ctctcgtgta 660
agattctaag gacgtcgtg ctctcacag acagccttg acctcttctg agcgcacga 720
10 tggtgaccac gttaccaacc tgagaaagat gggtgctcct gagtctggat tggctgagta 780
cctgttcgac aagcacactt tgggagactc tgataacgaa tctggaggtg gagacgatga 840
15 tgacaagtgt gatttgccac agacacactc cctgggctcg cgcagaacc tgatgctggt 900
ggctcagatg agaaagatct ggatccttaa ttaactgggc ctcatgggcc ttccgctcac 960
20 tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaacatggt catagctggt 1020
tccttgcgta ttgggcgctc tccgcttct cgctcactga ctcgctgcg ctcgctgctc 1080
gggtaaagcc tggggtgctt aatgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 1140
25 ggccgcgctt ctggcgcttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaaatcg 1200
acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 1260
30 tggaaagtcc ctcgctcgt ctctgttcc gaccctgcc cttaccggat acctgtcgc 1320
ctttctcct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc 1380
35 ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc agcccgaccg 1440
ctgcgctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc 1500
actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 1560
40 gttcttgaag tggtgcccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgctc 1620
tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttgtagc tcttgatccg gcaaacaaac 1680
45 caccgctggt agcggtggtt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 1740
atctcaagaa gatccttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 1800
50 acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaa 1860
ttaaaaatga agttttaa atcaatctaaag tatatatgag taaacttgggt ctgacagtta 1920
ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt 1980
55 tgctgactc cccgtcgtg agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 2040

EP 2 484 766 B1

	tgctgcaatg ataccgag aaccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca	2100
	gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc	2160
5	tattaattgt tgccggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt	2220
	tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag	2280
10	ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggc	2340
	tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt taccactcat	2400
15	ggttatggca gcaactgcata attctcttac tgatcatgcca tccgtaagat gcttttctgt	2460
	gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagttg atgcggcgac cgagttgctc	2520
20	ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgctcat	2580
	cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag	2640
25	ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt	2700
	ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg	2760
30	gaaatggtga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta	2820
	ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc	2880
35	gcgcacattt ccccgaaaag tgccac	2906
	<210> 11	
	<211> 2701	
	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	
40	<400> 11	
	ctaaattgta agcgtaata ttttgttaaa attcgcgcta aatttttggt aatcagctc	60
45	attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aatcaaaag aatagaccga	120
	gataggggtg agtggccgct acagggcgct cccattcgcc attcaggctg cgcaactggt	180
50	gggaagggcg tttcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa aggggatgt	240
	gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg	300
55	acggccagtg agcgcgacgt aatacgactc actatagggc gaattggcgg aaggccgtca	360
	aggcctaggc gcgcatgag ctcggtgacc acgttaccaa cctgagaaag atgggtgctc	420

EP 2 484 766 B1

ctgagtctgg attggctgag tacctgttcg acaagcacac ttgggagac tctgataacg 480

aatctggagg tggagacgat gatgacaagt cgggtgtctga gattcagctg atgcacaacc 540

5 tgggtaagca cctgaactct atggagagag tggagtggct gagaaagaag ttgcaggatg 600

tccacaactt ctagtaggga tccaagcttg gaaaagagag ttcctcctgg tgaagattct 660

10 aaggacgtcg ctgctcctca cagacagcct ttgacctctt ctgagcgcac cgatggtacc 720

tcttaattaa ctggcctcat gggccttccg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct 780

15 gtcgtgccag ctgcattaac atggtcatag ctgtttcctt gcgtattggg cgctctccgc 840

ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggc cgttcgggta aagcctgggg tgcctaatga 900

gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat 960

20 aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac 1020

ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct 1080

25 gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgccttc tcccttcggg aagcgtggcg 1140

ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg 1200

30 ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt 1260

cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg 1320

attagcagag cgaggatgt aggcggtgct acagagtctt tgaagtgggtg gcctaactac 1380

35 ggctacacta gaagaacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga 1440

aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt 1500

40 gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt 1560

tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatctt ggtcatgaga 1620

45 ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt taaatcaatc 1680

taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct 1740

atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata 1800

actacgatac gggagggcct accatctggc cccagtgcct caatgatacc gcgagaacca 1860

cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga 1920

55 agtggctctg caactttatc gcctccatc cagtctatta attggtgccg ggaagctaga 1980

EP 2 484 766 B1

gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacggtgttg ccattgctac aggcacgctg 2040
 gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttccaacg atcaaggcga 2100
 5 gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt 2160
 gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct 2220
 10 cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca 2280
 ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat 2340
 15 accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga 2400
 aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc 2460
 20 aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg 2520
 caaatgccg caaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc 2580
 25 ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt 2640
 gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc 2700
 30 c 2701

<210> 12
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 35 <220>
 <221> FTH1
 <222> (1)..(183)
 <223> humanes Ferritin (schwere Kette)
 40 <220>
 <221> H6
 <222> (184)..(189)
 <223> 6-Histidin-His-Tag
 45 <400> 12

Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp
 1 5 10 15

Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr Ala Ser
 20 25 30

EP 2 484 766 B1

Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala
 35 40 45

5

Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser His Glu Glu Arg
 50 55 60

10

Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg
 65 70 75 80

15

Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp Cys Asp Asp Trp Glu Ser
 85 90 95

20

Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu His Leu Glu Lys Asn Val Asn
 100 105 110

25

Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro
 115 120 125

30

His Leu Cys Asp Phe Ile Glu Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys
 130 135 140

35

Ala Ile Lys Glu Leu Gly Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly
 145 150 155 160

40

Ala Pro Glu Ser Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu
 165 170 175

45

Gly Asp Ser Asp Asn Glu Ser His His His His His His
 180 185

<210> 13
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

50

<220>
 <221> FTH1
 <222> (1)..(183)
 <223> humanes Ferritin (schwere Kette)

55

<220>
 <221> G3
 <222> (184)..(186)

EP 2 484 766 B1

<223> G3-Linker

<220>

<221> Ek

5 <222> (187)..(191)

<223> Enteropeptidase-Spaltstelle

<220>

<221> mhACT

10 <222> (192)..(591)

<223> maturer humaner alphas-Antichymotrypsin-Precursor

<220>

<221> H6

15 <222> (592)..(597)

<223> 6Histidin-His-Tag

<400> 13

20 Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp
1 5 10 15

25 Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr Ala Ser
20 25 30

30 Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala
35 40 45

35 Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser His Glu Glu Arg
50 55 60

40 Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg
65 70 75 80

45 Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp Cys Asp Asp Trp Glu Ser
85 90 95

50 Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu His Leu Glu Lys Asn Val Asn
100 105 110

55 Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro
115 120 125

EP 2 484 766 B1

His Leu Cys Asp Phe Ile Glu Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys
 130 135 140

5

Ala Ile Lys Glu Leu Gly Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly
 145 150 155 160

10

Ala Pro Glu Ser Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu
 165 170 175

15

Gly Asp Ser Asp Asn Glu Ser Gly Gly Gly Asp Asp Asp Lys His
 180 185 190

20

Pro Asn Ser Pro Leu Asp Glu Glu Asn Leu Thr Gln Glu Asn Gln Asp
 195 200 205

25

Arg Gly Thr His Val Asp Leu Gly Leu Ala Ser Ala Asn Val Asp Phe
 210 215 220

30

Ala Phe Ser Leu Tyr Lys Gln Leu Val Leu Lys Ala Pro Asp Lys Asn
 225 230 235 240

35

Val Ile Phe Ser Pro Leu Ser Ile Ser Thr Ala Leu Ala Phe Leu Ser
 245 250 255

40

Leu Gly Ala His Asn Thr Thr Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Leu Lys
 260 265 270

45

Phe Asn Leu Thr Glu Thr Ser Glu Ala Glu Ile His Gln Ser Phe Gln
 275 280 285

50

His Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Ser Ser Asp Glu Leu Gln Leu Ser
 290 295 300

55

Met Gly Asn Ala Met Phe Val Lys Glu Gln Leu Ser Leu Leu Asp Arg
 305 310 315 320

Phe Thr Glu Asp Ala Lys Arg Leu Tyr Gly Ser Glu Ala Phe Ala Thr
 325 330 335

EP 2 484 766 B1

Asp Phe Gln Asp Ser Ala Ala Ala Lys Lys Leu Ile Asn Asp Tyr Val
 340 345 350

5
 Lys Asn Gly Thr Arg Gly Lys Ile Thr Asp Leu Ile Lys Asp Leu Asp
 355 360 365

10
 Ser Gln Thr Met Met Val Leu Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Ala Lys
 370 375 380

15
 Trp Glu Met Pro Phe Asp Pro Gln Asp Thr His Gln Ser Arg Phe Tyr
 385 390 395 400

20
 Leu Ser Lys Lys Lys Trp Val Met Val Pro Met Met Ser Leu His His
 405 410 415

25
 Leu Thr Ile Pro Tyr Phe Arg Asp Glu Glu Leu Ser Cys Thr Val Val
 420 425 430

30
 Glu Leu Lys Tyr Thr Gly Asn Ala Ser Ala Leu Phe Ile Leu Pro Asp
 435 440 445

35
 Gln Asp Lys Met Glu Glu Val Glu Ala Met Leu Leu Pro Glu Thr Leu
 450 455 460

40
 Lys Arg Trp Arg Asp Ser Leu Glu Phe Arg Glu Ile Gly Glu Leu Tyr
 465 470 475 480

45
 Leu Pro Lys Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Asn Leu Asn Asp Ile Leu
 485 490 495

50
 Leu Gln Leu Gly Ile Glu Glu Ala Phe Thr Ser Lys Ala Asp Leu Ser
 500 505 510

55
 Gly Ile Thr Gly Ala Arg Asn Leu Ala Val Ser Gln Val Val His Lys
 515 520 525

Ala Val Leu Asp Val Phe Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr
 530 535 540

EP 2 484 766 B1

Ala Val Lys Ile Thr Leu Leu Ser Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile
 545 550 555 560

5

Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Met Ile Ile Val Pro Thr Asp Thr
 565 570 575

10

Gln Asn Ile Phe Phe Met Ser Lys Val Thr Asn Pro Lys Gln Ala His
 580 585 590

15

His His His His His
 595

20

<210> 14
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

25

<220>
 <221> FTH1
 <222> (1)..(183)
 <223> humanes Ferritin (schwere Kette)

30

<220>
 <221> G3
 <222> (184)..(186)
 <223> G3-Linker

35

<220>
 <221> Ek
 <222> (187)..(191)
 <223> Enteropeptidase-Spaltstelle

40

<220>
 <221> mhIL6
 <222> (192)..(376)
 <223> matures humanes Interleukin 6

45

<220>
 <221> H6
 <222> (377)..(382)
 <223> 6-Histidin-His-Tag

50

<400> 14

Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp

55

EP 2 484 766 B1

	210		215		220														
5	Leu	Asp	Gly	Ile	Ser	Ala	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Cys	Asn	Lys	Ser	Asn			
	225					230					235					240			
10	Met	Cys	Glu	Ser	Ser	Lys	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu			
					245					250					255				
15	Pro	Lys	Met	Ala	Glu	Lys	Asp	Gly	Cys	Phe	Gln	Ser	Gly	Phe	Asn	Glu			
				260					265					270					
20	Glu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Ile	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	Val			
			275					280					285						
25	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Ala			
	290						295					300							
30	Arg	Ala	Val	Gln	Met	Ser	Thr	Lys	Val	Leu	Ile	Gln	Phe	Leu	Gln	Lys			
	305					310						315				320			
35	Lys	Ala	Lys	Asn	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn			
				325						330					335				
40	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp	Leu	Gln	Asp			
				340					345					350					
45	Met	Thr	Thr	His	Leu	Ile	Leu	Arg	Ser	Phe	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser			
			355					360					365						
50	Ser	Leu	Arg	Ala	Leu	Arg	Gln	Met	His	His	His	His	His	His					
	370						375					380							
55	<210>	15																	
	<211>	356																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Künstliche Sequenz																	
	<220>																		
	<221>	FTH1																	
	<222>	(1)..(183)																	
	<223>	humanes Ferritin (schwere Kette)																	

EP 2 484 766 B1

340

345

350

5 Arg Ser Lys Glu
355

<210> 16
<211> 225
10 <212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> FTH1
15 <222> (1)..(183)
<223> humanes Ferritin (schwere Kette)

<220>
<221> G3
20 <222> (189)..(186)
<223> G3-Linker

<220>
<221> Ek
25 <222> (187)..(191)
<223> Enteropeptidase-Spaltstelle

<220>
<221> PTH
30 <222> (192)..(225)
<223> Teil des humanen Parathyroid-Hormons

<400> 16

35 Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp
1 5 10 15

40 Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr Ala Ser
20 25 30

45 Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala
35 40 45

50 Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser His Glu Glu Arg
50 55 60

55 Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg

EP 2 484 766 B1

<220>
 <221> FMD-P
 <222> (360)..(1425)
 <223> FMD promoter H. polymorpha
 5

<220>
 <221> HARS1
 <222> (1560)..(2055)
 <223> HARS1 H. polymorpha
 10

<220>
 <221> ScURA3
 <222> (2855)..(4012)
 <223> URA3 gene from S. cerevisiae
 15

<220>
 <221> ori
 <222> (5097)..(5764)
 <223> ori pBR322
 20

<220>
 <221> ampR
 <222> (5909)..(6769)
 25

<220>
 <221> ampR
 <222> (5909)..(6769)
 <223> á-lactamase
 30

<400> 17

ggtaccctg ctcaatctcc ggaatggtga tctgatcgtt cctgaaaacc tcgacattgg 60
 35
 ctccctcctg acacaggtac tcgtacaggt tccaggtaaa cgagtcgtag ttgtcgatca 120
 tgacaacggt cttagaagcg gccggcattt tgaaggtgac taatagccta agaaaatatt 180
 taatttaatt ttcattaat tttcctatac tcgctatttc agcttttcat ctcactcactt 240
 40
 cataaacgat ataaaccaga aaaagaacta ttttcaaaca cgcttctcaa aagcgggatg 300
 tccttccacg tctccttaga atctggcaag tccgcgaggg ggatccagat ctgaattccc 360
 45
 gatgaaggca gagagcgcga ggagggcgta tttatagtgc cattcccctc tctgagagac 420
 ccggatggta gtcgagtgta tcggagacag cttgatgtag actccgtgcc tgccggctcc 480
 50
 tcttattggc ggacaccagt gagacacccc ggaacttgct gtttttctgc aaaatccggg 540
 gtgaccagtg ggagcctatt tgcacacacg agcggggacac cccactctgg tgaagagtgc 600
 55

EP 2 484 766 B1

caaagtcatt ctttttcccg ttgCGGGGca gccgattgca tgttttagga aaatattacc 660
 tttgctacac cctgtcagat ttaccctcca cacatatata ttccgtcacc tccagggact 720
 5 attattcgtc gttgCGCCgc cagCGgaaga tatccagaag ctgttttccg agagactcgg 780
 ttggCGcctg gtatatTTga tggatgtcgc gctgcctcac gtcccgtac ccaggaacgc 840
 10 ggtgggatct cggGCCatc gaagactgtg ctccagactg ctCGcccagc aggtgTTtct 900
 tgatCGccgc ctctaaattg tccCGcGatc gccgGtaaca tttttccagc tCGgagTTtg 960
 15 cgtttagata cagTTtctgc gatGcCaag gagcctgcag attataacct cggatgctgt 1020
 cattcagcgc ttttaatttg acctccagat agttgctgta tttctgttcc cattggctgc 1080
 tgCGcagctt cgtataactc gagttattgt tgcGctctgc ctCGGcgTAc tggctcatga 1140
 20 tctggatctt gtccgtgtcg cttttcttcg agtgtttctc gcaaacgatg tgcacggcct 1200
 gcagtgTcca atCGgagTcg agctggCGcc gaaactggcg gatctgagcc tccacactgc 1260
 25 cctgTTtctc tatccacggc ggaaccgcct cctgCCgTtt cagaatgttg ttcaagtggT 1320
 actctgtcgc gtcaatgaag gcgttattgc cggTgaaatc tttgggaagc ggTTttcctc 1380
 30 ggggaagatt acgaaattcc cCGcGtcgtt gcGcttctg gatctcgagg agatcgttct 1440
 cCGcGtcgag gagatcgttc tccCGtcga caccattcct tCGGcgGcg gtgctcaacg 1500
 35 gcctcaacct actactgggc tgcttctaa tgcaggagtc gcataagggA gagcgtcGac 1560
 aaaccCGcgt ttgagaactt gctcaagctt ctgGtaaacg ttgtagtact ctgaaacaag 1620
 ccctagcact ctgatctgtt tctcttgggt agCGgtgagt ggTTtattgg agttcactgg 1680
 40 tttcagcaaa tctgtcatct agacaatatt gtTactaaat ttttttgaac tacaattgTT 1740
 cGtaattcat ctattattat acatcctcgt cagcaatttc tggcagacgg agTTtactaa 1800
 45 acgtctttga gtatgaggcc gagaaatcca gctctgtggc catactcagt cttgacagcc 1860
 tgctgatgTT ggctgcgttc aacGcaataa gcgtgtcctc cGactccgag ttgtgctcgt 1920
 50 tatcgtcgtt ctcatcctcg gaaaaatcac acgaaagaac atactcacca gtaggctttc 1980
 tggTccctgg ggcacggctg tttctgacgt attccggcgt tgataatagc tcgaaagtga 2040
 acgCCgagtc gcgggagTcg accgatgccc ttgagagcct tcaaccagT cagctccttc 2100
 55 cggTggGcgc gggGcatgac tatcgtcGCC gcacttatga ctgtcttctt tatcatgcaa 2160

EP 2 484 766 B1

ctcgtaggac aggtgccggc agcgcctctgg gtcattttcg gcgaggaccg ctttcgctgg 2220

agcgcgacga tgatcggcct gtcgcttgcg gtattcggaa tcttgcacgc cctcgtctaa 2280

5 gccttcgtca ctgggtccgc caccaaactg ttcggcgaga agcaggccat tatcgccggc 2340

atggcgcccg acgcgctggg ctacgtcttg ctggcgctcg cgacgcgagg ctggatggcc 2400

10 ttccccatta tgattcttct cgcttcgggc ggcacgagg tgcccgcgct gcaggccatg 2460

ctgtccaggc aggtagatga cgaccatcag ggacagcttc aaggatcgct cgcggtcttt 2520

15 accagcctaa cttcgatcat tggaccgctg atcgtcacgg cgatttatgc cgctcggcg 2580

agcacatgga acgggttggc atggattgta ggcgccgcc tataccttgt ctgcctcccc 2640

gcgttgcgtc gcggtgcatg gagccgggcc acctcgacct gaatggaagc cggcggcacc 2700

20 tcgctaacgg attcaccact ccaagaattg gagccaatca attcttgcgg agaactgtga 2760

atgcgcaaac caacccttgg cagaacatat ccatcgcgtc cgccatctcc agcagccgca 2820

25 cgcgggcgcat cggggggggg gggggggggg gggggttca attcatcatt tttttttat 2880

tctttttttt gatttcgggtt tccttgaat ttttttgatt cgtaaatctc cgaacagaag 2940

30 gaagaacgaa ggaaggagca cagacttaga ttggtatata tacgcatatg tagtgttgaa 3000

gaaacatgaa attgccagc attcttaacc caactgcaca gaacaaaaac ctgcaggaaa 3060

35 cgaagataaa tcatgtcgaa agctacatat aaggaacgtg ctgctactca tcctagtcct 3120

gttgctgcca agctatttaa tatcatgcac gaaaagcaaa caaacttggtg tgcttcattg 3180

gatgttcgta ccaccaagga attactggag ttagttgaag cattaggtcc caaaatttgt 3240

40 ttactaaaaa cacatgtgga tatcttgact gattttcca tggagggcac agttaagccg 3300

ctaaaggcat tatccgcaa gtacaatttt ttactcttcg aagacagaaa atttgctgac 3360

45 attggttaata cagtcaaatt gcagtactct gcgggtgat acagaatagc agaatgggca 3420

gacattacga atgcacacgg tgtggtggc ccaggatttg ttagcggttt gaagcaggcg 3480

50 gcagaagaag taacaaagga acctagaggc cttttgatgt tagcagaatt gtcatgcaag 3540

ggctccctat ctactggaga atatactaag ggtactgttg acattgcgaa gagcgacaaa 3600

gattttgtta tcggctttat tgctcaaaga gacatgggtg gaagagatga aggttacgat 3660

55 tggttgatta tgacaccgg tgtgggttta gatgacaagg gagacgcatt ggggtcaacag 3720

EP 2 484 766 B1

tatagaaccg tggatgatgt ggtctctaca ggatctgaca ttattattgt tggaaagga 3780

ctatTTGcaa agggaagga tgctaaggta gagggTgaac gttacagaaa agcaggctgg 3840

5 gaagcatatt tgagaagatg cggccagcaa aactaaaaaa ctgtattata agtaaatgca 3900

tgtatactaa actcacaaat tagagcttca atttaattat atcagttatt acccggaat 3960

10 ctcggtcgta atgattTTta taatgacgaa aaaaaaaaaat tggaaagaaa accccccccc 4020

cccccccccc ccccccccc cccccgcagc gttgggtcct ggccacgggt gcgcatgatc 4080

15 gtgctcctgt cgttgaggac cgggctaggc tggcggggtt gccttactgg ttagcagaat 4140

gaatcaccga tacgcgagcg aacgtgaagc gactgctgct gcaaaacgtc tgcgacctga 4200

gcaacaacat gaatggTctt cggTTTccgt gTTTcgtaa gtctggaac gcggaagtca 4260

20 gcgccctgca ccattatgTT ccggatctgc atcgcaggat gctgctggct accctgtgga 4320

acacctacat ctgtattaac gaagcgctgg cattgaccct gagtgattTT tctctggtcc 4380

25 cgccgcatcc ataccgccag ttgTTTacc tcacaacgTT ccagtaaccg ggcattgtca 4440

tcatcagtaa cccgtatcgt gagcatcctc tctcgTTTca tcggtatcat tcccccatg 4500

30 aacagaaatc ccccttacac ggaggcatca gtgaccaaac aggaaaaaac cgcccttaac 4560

atggcccgt ttatcagaag ccagacatta acgcttctgg agaaactcaa cgagctggac 4620

35 gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg cttcacgacc acgctgatga gctttaccgc 4680

agctgcctcg cgcgTTTcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag 4740

acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgtca 4800

40 gcgggtgTTg gcgggtgTcg gggcgcagcc atgaccagT cacgtagcga tagcggagTg 4860

tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt 4920

45 gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct tccgcttct 4980

cgctcactga ctcgctgcgc tcggTcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa 5040

50 aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa 5100

aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgTT gctggcgTTT ttccataggc 5160

tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgca 5220

55 caggactata aagataccag gcgTTTccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgTtc 5280

EP 2 484 766 B1

cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt 5340
 ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct 5400
 5 gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgctt atccggtaac tatcgtcttg 5460
 agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta 5520
 10 gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct 5580
 aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa 5640
 15 gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt 5700
 gcaagcagca gattacgcbc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta 5760
 cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat 5820
 20 caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa 5880
 gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct 5940
 25 cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgctgact ccccgctgtag tagataacta 6000
 cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgca gaccacgct 6060
 30 caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggccgag cgcagaagtg 6120
 gtctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa 6180
 35 gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtggtgt 6240
 cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggtc ccaacgatca aggcaggtta 6300
 catgatcccc catgttgctc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctctccg atcgttgctca 6360
 40 gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta 6420
 ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct 6480
 45 gagaatagtg tatgcgcgca ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg 6540
 cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac 6600
 50 tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact 6660
 gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa 6720
 atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctcttccttt 6780
 55 ttcaatatta ttgaagcatt taccaggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat 6840

gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg 6900
 acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc 6960
 5 cctttcgtct tcaagaattg 6980

Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen eines Ziel-Proteins, wobei:

- a) eine Zellkultur mit Wirtszellen einer Hefeart der Gattungen Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Kluyve-
 15 romyces, Hansenula, Arxula, Schwanniomyces, Candida, Pichia oder Yarrowia bereitgestellt wird, wobei die
 Wirtszellen
 wenigstens eine erste DNA-Sequenz enthalten, die für ein heterologes Ferritin-Protein codiert, und
 wenigstens eine zweite DNA-Sequenz enthalten, die für das Ziel-Protein codiert,
 wobei die zweite DNA-Sequenz derart mit der ersten DNA-Sequenz gekoppelt ist, dass bei der Expression der
 20 ersten und der zweiten DNA-Sequenz das Ziel-Protein an das zuvor synthetisierte Ferritin-Protein gekoppelt
 wird, so dass ein Verbund-Protein gebildet wird, und
 b) die Wirtszellen mit Hilfe der für das heterologe Ferritin-Protein codierenden ersten DNA-Sequenz und der
 für das Ziel-Protein codierenden zweiten DNA-Sequenz veranlasst werden, das das Ferritin-Protein und das
 Ziel-Protein enthaltende Verbund-Protein zu exprimieren, wobei das Verbund-Protein in den Wirtszellen gehalten
 25 wird,
 c) das Verbund-Protein aus der Zellkultur abgetrennt wird, und
 d) das Ziel-Protein von dem Verbund-Protein abgetrennt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die zweite DNA-Sequenz derart mit der ersten DNA-
 30 Sequenz gekoppelt ist, dass bei der Expression der ersten und der zweiten DNA-Sequenz das Ferritin-Protein N-
 terminal positioniert ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die zweite DNA-Sequenz über eine dritte DNA-
 35 Sequenz mit der ersten DNA-Sequenz gekoppelt ist, wobei die dritte DNA-Sequenz für ein Kopplungspeptid codiert,
 wobei bei der Expression der ersten, der zweiten und der dritten DNA-Sequenz das Kopplungspeptid an das zuvor
 synthetisierte Ferritin-Protein und das Ziel-Protein an das zuvor synthetisierte Kopplungspeptid gekoppelt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Kopplungspeptid ein Spacer-Peptid umfasst,
 wobei das Spacer-Peptid bei der Expression der ersten, der zweiten und der dritten DNA-Sequenz an das zuvor
 40 synthetisierte Ferritin-Protein gebunden wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Kopplungspeptid ein Trennstellen-Peptid
 umfasst, das eine von einem Enzym auflösbare Trennstelle bildet, wobei das Ziel-Protein an das Trennstellen-
 Peptid gebunden wird, wobei im Schritt d) die Trennstelle derart aufgelöst wird, dass das Ziel-Protein freigesetzt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Enzym eine Enteropeptidase ist und das Trenn-
 45 stellen-Peptid eine Enteropeptidase-Trennstelle umfasst.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die erste DNA-Sequenz für eine
 50 schwere Ferritin-Kette codiert.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** im Schritt a) Wirtszellen einer methy-
 lotrophen Hefeart der Gattungen Hansenula oder Pichia bereitgestellt werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Ziel-Protein ein heterologes
 55 funktionelles Protein ist, wobei das Ziel-Protein homolog nicht in einer Kopplung mit dem Ferritin-Protein auftritt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Ziel-Protein eine Serinprotease, insbesondere
 matures humanes α 1-Antichymotrypsin, umfasst.

EP 2 484 766 B1

11. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Ziel-Protein ein Peptidhormon, insbesondere matures humanes Interleukin oder humanes Parathyroid-Hormon oder ein Teilfragment davon, umfasst.
- 5 12. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Ziel-Protein ein Interferon, insbesondere matures humanes Interferon- α , umfasst.
- 10 13. Wirtszelle einer Hefeart der Gattungen Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Kluyveromyces, Hansenula, Arxula, Schwanniomyces, Candida, Pichia oder Yarrowia, wobei die Wirtszelle wenigstens eine erste DNA-Sequenz enthält, die für ein heterologes Ferritin-Protein codiert, und wenigstens eine zweite DNA-Sequenz enthält, die für ein heterologes Ziel-Protein codiert, wobei die zweite DNA-Sequenz derart mit der ersten DNA-Sequenz gekoppelt ist, dass bei einer Expression der ersten und der zweiten DNA-Sequenz das Ziel-Protein an das zuvor synthetisierte Ferritin-Protein derart gekoppelt wird, dass ein Verbund-Protein gebildet und das Verbund-Protein in der Wirtszelle gehalten wird.
- 15 14. Wirtszelle nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** die zweite DNA-Sequenz derart mit der ersten DNA-Sequenz gekoppelt ist, dass bei der Expression der ersten und der zweiten DNA-Sequenz das Ferritin-Protein N-terminal positioniert ist.
- 20 15. Wirtszelle nach Anspruch 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die zweite DNA-Sequenz über eine dritte DNA-Sequenz mit der ersten DNA-Sequenz gekoppelt ist, wobei die dritte DNA-Sequenz für ein Kopplungspeptid codiert, wobei bei der Expression der ersten, der zweiten und der dritten DNA-Sequenz das Kopplungspeptid an das zuvor synthetisierte Ferritin-Protein und das Ziel-Protein an das zuvor synthetisierte Kopplungspeptid gekoppelt wird.
- 25 16. Wirtszelle nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Kopplungspeptid ein Spacer-Peptid umfasst, wobei das Spacer-Peptid bei der Expression der ersten, der zweiten und der dritten DNA-Sequenz an das zuvor synthetisierte Ferritin-Protein gebunden wird.
- 30 17. Wirtszelle nach Anspruch 15 oder 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Kopplungspeptid ein Trennstellen-Peptid umfasst, das eine von einem Enzym auflösbare Trennstelle bildet, wobei das Ziel-Protein an das Trennstellen-Peptid gebunden wird,
- 35 18. Wirtszelle nach einem der Ansprüche 13 - 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** die erste DNA-Sequenz für eine schwere Ferritin-Kette codiert.

Claims

- 40 1. A method of producing a target protein, wherein:
- 45 a) a cell culture with host cells of yeast type of the genus Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Kluyveromyces, Hansenula, Arxula, Schwanniomyces, Candida, Pichia or Yarrowia is prepared, wherein the host cells contain at least one first DNA sequence, which codes for a heterologous ferritin protein, and contain at least one second DNA sequence, which codes for the target protein, wherein the second DNA sequence is coupled to the first DNA sequence such that on expression of the first and the second DNA sequence the target protein is coupled to the previously synthesised ferritin protein so that a composite protein is formed, and
- 50 b) the host cells are induced, with the aid of the first DNA sequence coding for the heterologous ferritin protein and the second DNA sequence coding for the target protein, to express the composite protein containing the ferritin protein and the target protein, wherein the composite protein is held in the host cells,
- c) the composite protein is separated from the cell culture, and
- d) the target protein is separated from the composite protein.
- 55 2. A method as claimed in claim 1, **characterised in that** the second DNA sequence is coupled to the first DNA sequence such that on expression of the first and the second DNA sequence the ferritin protein is in the N-terminal position.
3. A method as claimed in claim 1 or 2, **characterised in that** the second DNA sequence is coupled to the first DNA sequence via a third DNA sequence, wherein the third DNA sequence codes for a coupling peptide, wherein, on

expression of the first, second and third DNA sequence, the coupling peptide is coupled to the previously synthesised ferritin protein and the target protein is coupled to the previously synthesised coupling peptide.

- 5
4. A method as claimed in claim 3, **characterised in that** the coupling peptide includes a spacer peptide, wherein the spacer peptide, on expression of the first, second and third DNA sequence, is bonded to the previously synthesised ferritin protein.
- 10
5. A method as claimed in claim 3 or 4, **characterised in that** the coupling peptide includes a cleaving peptide, which forms a cleavage site which may be broken by an enzyme, wherein the target protein is bonded to the cleaving peptide, wherein in step d) the cleavage site is broken such that the target protein is liberated.
- 15
6. A method as claimed in claim 5, **characterised in that** the enzyme is an enteropeptidase and the cleaving peptide includes an enteropeptidase cleavage site.
- 20
7. A method as claimed in one of claims 1-6, **characterised in that** the first DNA sequence codes for a ferritin heavy chain.
8. A method as claimed in one of claims 1-7, **characterised in that** in step a) host cells of a methylotropic yeast type of the genus *Hansenula* or *Pichia* are prepared.
- 25
9. A method as claimed in one of claims 1-8, **characterised in that** the target protein is a heterologous, functional protein, wherein the target protein does not occur homologously in a coupling with the ferritin protein.
- 30
10. A method as claimed in claim 9, **characterised in that** the target protein includes a serine protease, particularly mature human α 1-antichymotrypsin.
- 35
11. A method as claimed in claim 9, **characterised in that** the target protein includes a peptide hormone, particularly mature, human interleukin or human parathyroid hormone or a fragment thereof.
- 40
12. A method as claimed in claim 9, **characterised in that** the target protein includes an interferon, particularly mature, human interferon- α .
- 45
13. A host cell of a yeast type of the genus *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Arxula*, *Schwanniomyces*, *Candida*, *Pichia* or *Yarrowia*, wherein the host cell contains at least one first DNA sequence, which codes for a heterologous ferritin protein, and contains at least one second DNA sequence, which codes for heterologous target protein, wherein the second DNA sequence is coupled to the first DNA sequence such that, on expression of the first and second DNA sequence, the target protein is coupled to the previously synthesised ferritin protein such that a composite protein is formed and the composite protein is held in the host cell.
- 50
14. A host cell as claimed in claim 13, **characterised in that** the second DNA sequence is coupled to the first DNA sequence such that, on expression of the first and second DNA sequence, the ferritin protein is in the N-terminal position.
- 55
15. A host cell as claimed in claim 13 or 14, **characterised in that** the second DNA sequence is coupled to the first DNA sequence via a third DNA sequence, wherein the third DNA sequence codes for a coupling peptide, wherein, on expression of the first, second and third DNA, the coupling peptide is coupled to the previously synthesised ferritin protein and the target protein is coupled to the previously synthesised coupling peptide.
16. A host cell as claimed in claim 15, **characterised in that** the coupling peptide includes a spacer peptide, wherein the spacer peptide, on expression of the first, second and third DNA sequence, is bonded to the previously synthesised ferritin protein.
17. A host cell as claimed in claim 15 or 16, **characterised in that** the coupling peptide includes a cleaving peptide, which forms a cleavage site breakable by an enzyme, wherein the target protein is bonded to the cleaving peptide.
18. A host cell as claimed in one of claims 13 - 17, **characterised in that** the first DNA sequence codes for a ferritin heavy chain.

Revendications

1. Procédé de fabrication d'une protéine cible, dans lequel :
 - a) on prépare une culture cellulaire de cellules hôtes d'un type de levure des espèces *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Arxula*, *Schwanniomyces*, *Candida*, *Pichia* ou *Yarrowia*, dans laquelle les cellules hôtes contiennent au moins une première séquence d'ADN qui code pour une protéine de ferritine hétérologue et contiennent au moins une deuxième séquence d'ADN qui code pour la protéine cible, dans lequel la deuxième séquence d'ADN est couplée à la première séquence d'ADN de sorte que, lors de l'expression de la première et de la deuxième séquence d'ADN, la protéine cible soit couplée à la protéine de ferritine préalablement synthétisée de sorte que soit formée une protéine composite, et
 - b) les cellules hôtes sont, à l'aide de la première séquence d'ADN codant pour la protéine de ferritine hétérologue et de la deuxième séquence d'ADN codant pour la protéine cible, amenées à exprimer la protéine composite contenant la protéine de ferritine et la protéine cible, la protéine composite étant maintenue dans les cellules hôtes,
 - c) la protéine composite est séparée de la culture cellulaire et
 - d) la protéine cible est séparée de la protéine composite.
2. Procédé selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** la deuxième séquence d'ADN est couplée à la première séquence d'ADN de sorte que, lors de l'expression de la première et de la deuxième séquence d'ADN, la protéine de ferritine soit placée en position N-terminale.
3. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, **caractérisé en ce que** la deuxième séquence d'ADN est couplée à la première séquence d'ADN via une troisième séquence d'ADN, moyennant quoi la troisième séquence d'ADN code pour un peptide de couplage, où, lors de l'expression de la première, de la deuxième et de la troisième séquence d'ADN, le peptide de couplage est couplé à la protéine de ferritine préalablement synthétisée et la protéine cible au peptide de couplage préalablement synthétisé.
4. Procédé selon la revendication 3, **caractérisé en ce que** le peptide de couplage comprend un peptide d'espacement, dans lequel le peptide d'espacement est lié à la protéine de ferritine préalablement synthétisée lors de l'expression de la première, de la deuxième et de la troisième séquence d'ADN.
5. Procédé selon la revendication 3 ou la revendication 4, **caractérisé en ce que** le peptide de couplage comprend un peptide d'interface, qui forme une interface soluble par un enzyme, dans lequel la protéine cible est liée au peptide d'interface et dans lequel, à l'étape d), l'interface est dissoute de sorte que la protéine cible soit libérée.
6. Procédé selon la revendication 5, **caractérisé en ce que** l'enzyme est une entéropeptidase et le peptide d'interface comprend une interface d'entéropeptidase.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, **caractérisé en ce que** la première séquence d'ADN code pour une chaîne de ferritine lourde.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, **caractérisé en ce que**, à l'étape a), on prépare des cellules hôtes d'un type de levure méthylophile des espèces *Hansenula* ou *Pichia*.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, **caractérisé en ce que** la protéine cible est une protéine fonctionnelle hétérologue, dans lequel la protéine cible n'intervient pas de manière homologue dans un couplage avec la protéine de ferritine.
10. Procédé selon la revendication 9, **caractérisé en ce que** la protéine cible est une protéase de sérine, en particulier une α 1-antichymotrypsine humaine mature.
11. Procédé selon la revendication 9, **caractérisé en ce que** la protéine cible est une hormone peptidique, en particulier une interleukine humaine mature ou une hormone de parathyroïde humaine ou encore un fragment partiel de celle-ci.
12. Procédé selon la revendication 9, **caractérisé en ce que** la protéine cible comprend un interféron, en particulier un interféron- α humain mature.

EP 2 484 766 B1

13. Cellule hôte d'un type de levure des espèces *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Arxula*, *Schwanniomyces*, *Candida*, *Pichia* ou *Yarrowia*, dans laquelle la cellule hôte :

5 contient au moins une première séquence d'ADN qui code pour une protéine de ferritine hétérologue, et contient au moins une deuxième séquence d'ADN qui code pour une protéine cible hétérologue, dans laquelle la deuxième séquence d'ADN est couplée à la première séquence d'ADN de sorte que, lors d'une expression de la première et de la deuxième séquence d'ADN, la protéine cible soit couplée à la protéine de ferritine préalablement synthétisée de sorte que soit formée une protéine composite et que la protéine composite soit conservée dans la cellule hôte.

- 10 14. Cellule hôte selon la revendication 13, **caractérisée en ce que** la deuxième séquence d'ADN est couplée à la première séquence d'ADN de sorte que, lors de l'expression de la première et de la deuxième séquence d'ADN, la protéine de ferritine assume une position N-terminale.

- 15 15. Cellule hôte selon la revendication 13 ou la revendication 14, **caractérisée en ce que** la deuxième séquence d'ADN est couplée à la première séquence d'ADN via une troisième séquence d'ADN, moyennant quoi la troisième séquence d'ADN code pour un peptide de couplage, dans laquelle, lors de l'expression de la première, de la deuxième et de la troisième séquence d'ADN, le peptide de couplage est couplé à la protéine de ferritine préalablement synthétisée et la protéine cible est couplée au peptide de couplage préalablement synthétisé.

- 20 16. Cellule hôte selon la revendication 15, **caractérisée en ce que** le peptide de couplage comprend un peptide d'espacement, dans laquelle le peptide d'espacement est lié à la protéine de ferritine préalablement synthétisée lors de l'expression de la première, de la deuxième et de la troisième séquence d'ADN.

- 25 17. Cellule hôte selon la revendication 15 ou la revendication 16, **caractérisée en ce que** le peptide de couplage comprend un peptide d'interface, qui forme une interface soluble par un enzyme, dans laquelle la protéine cible est liée au peptide d'interface.

- 30 18. Cellule hôte selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, **caractérisée en ce que** la première séquence d'ADN code pour une chaîne de ferritine lourde.

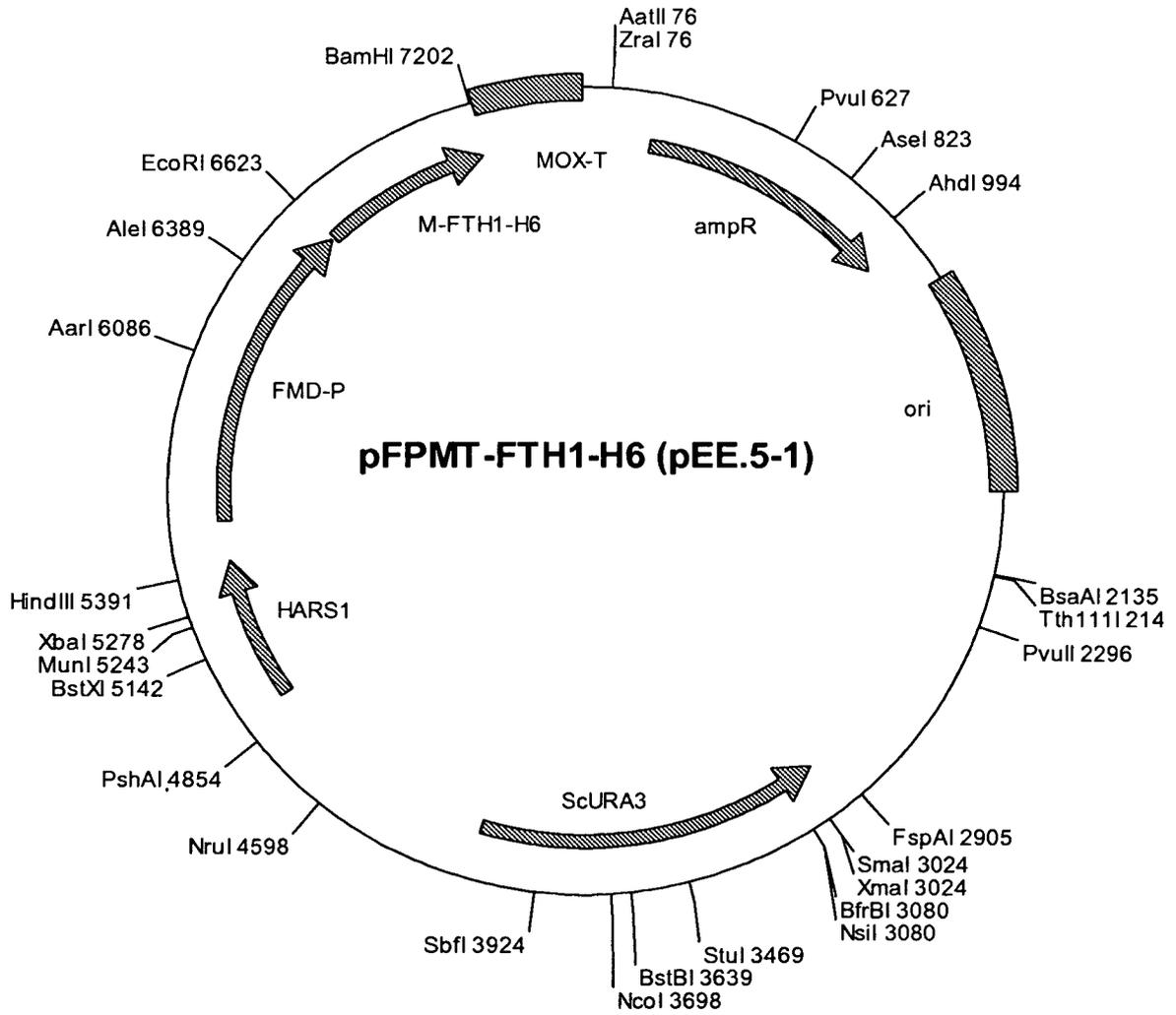


Fig. 1

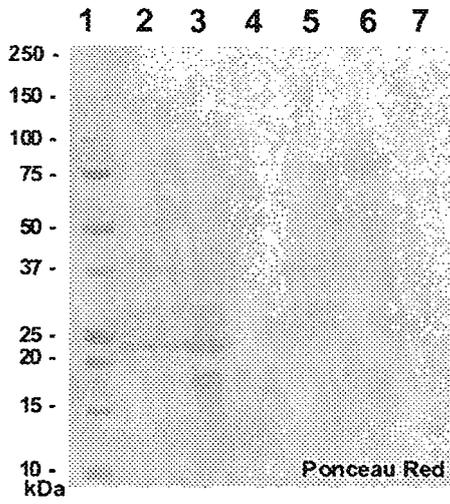


Fig. 2A

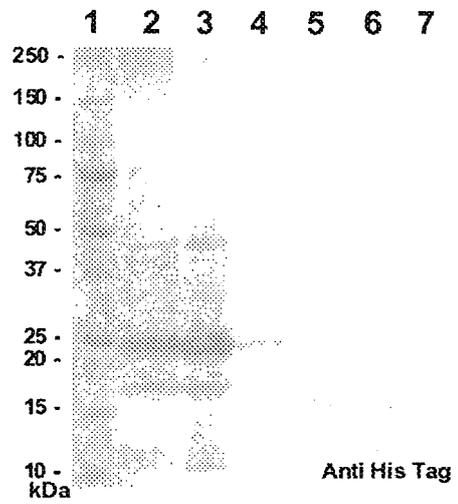


Fig. 2B

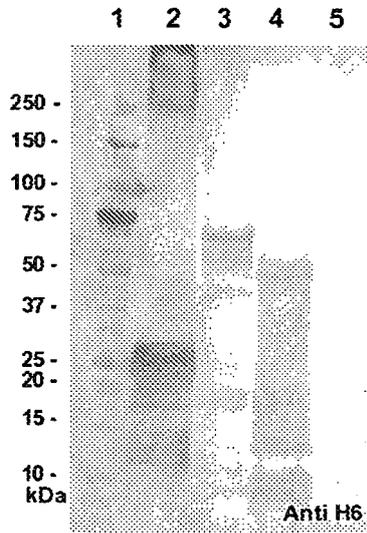


Fig. 3

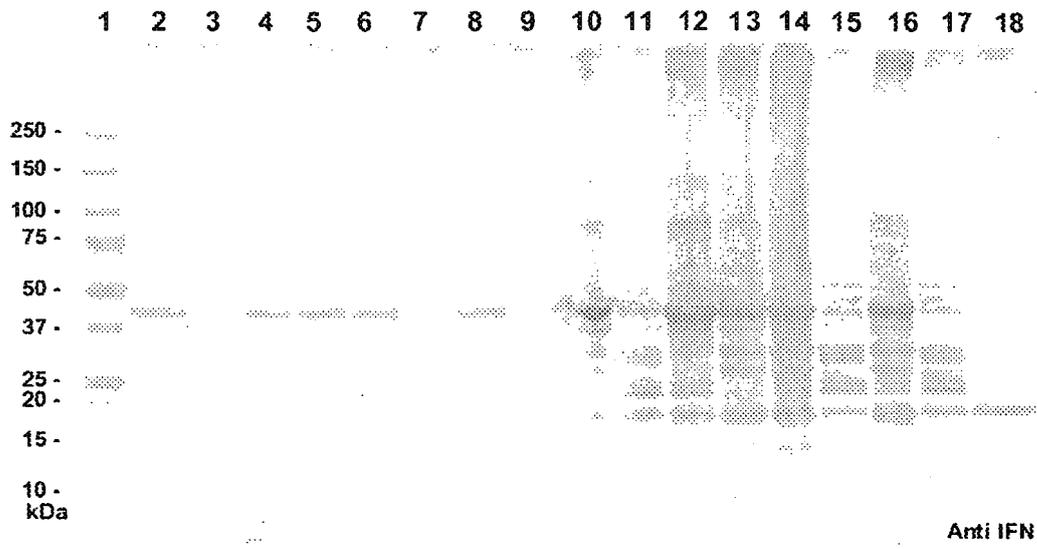


Fig. 4

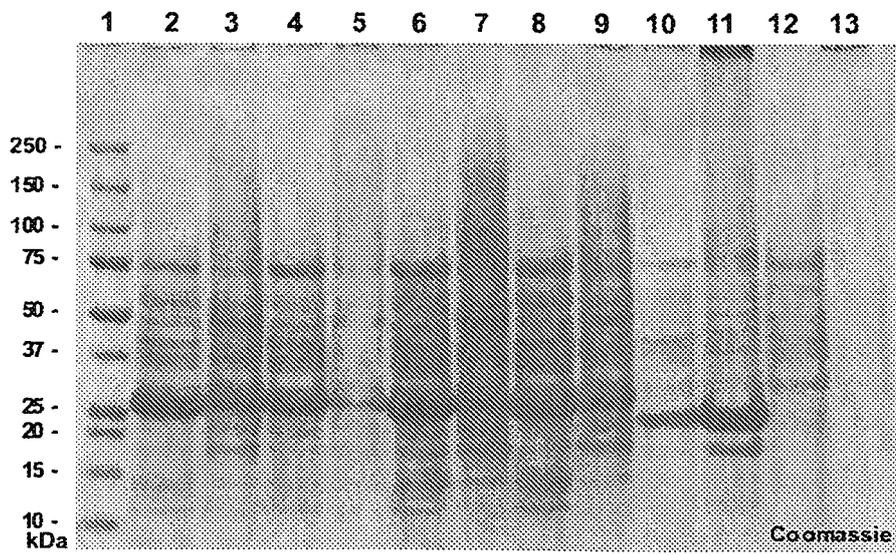


Fig. 5

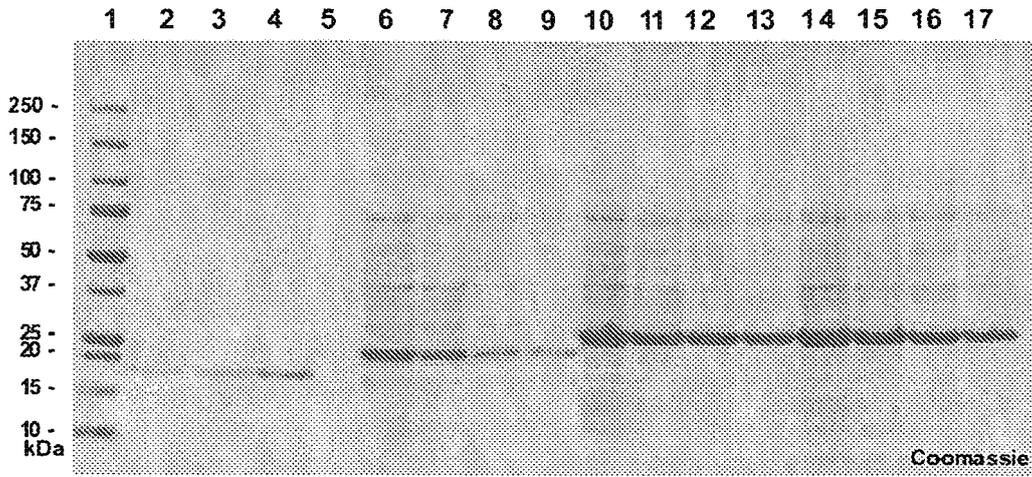


Fig. 6



Fig. 7A

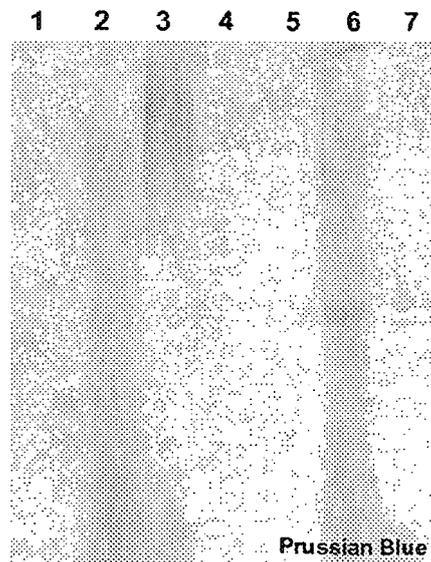


Fig. 7B

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **P. SANTAMBROGIO ; S. LEVI ; A. COZZI ; E. ROVIDAJ ; A. ALBERTINI ; P. AROS.** Production and Characterization of Recombinant Heteropolymers of Human Ferritin H and L Chains. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 12744-12783 [0009]
- **Y. M. SHIN ; T. H. KWON ; K. S. KIM ; K. S. CHAE ; D. H. KIM ; M.S. YANG.** Enhanced Iron Uptake of *Saccharomyces cerevisiae* by Heterologous Expression of a Tadpole Ferritin Gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, vol. 67, 1280-1283 [0009]
- **J. L. LEE ; H. S. SONG ; H. J. KIM ; J. H. PARK ; D. K. CHUNG ; C. S. PARK ; D. JEUNG ; H. Y. KIM.** Functional expression and production of human H-ferritin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.*, 2003, vol. 25, 1019-1023 [0009]
- **MEYER A. F. et al.** An expression system matures: a highly efficient and costeffective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, vol. 63, 373-381 [0060]
- **KIM et al.** Expression of Heteropolymeric Ferritin Improves Iron Storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, 1999-2005 [0062]