



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 241**

51 Int. Cl.:
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12P 33/06 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
C12R 1/91 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05719556 .2**
96 Fecha de presentación : **25.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1721983**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2006**

54 Título: **Triterpeno hidroxilasa.**

30 Prioridad: **25.02.2004 JP 2004-49123**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2011

73 Titular/es: **MEIJI SEIKA KAISHA Ltd.**
4-16, Kyobashi 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-8002, JP

72 Inventor/es: **Hayashi, Hiroaki;**
Inoue, Kenichiro;
Hoshino, Masateru;
Shibuya, Masaaki y
Ebizuka, Yutaka

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 357 241 T3

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

DESCRIPCIÓN

Campo Técnico

Esta invención se refiere a una célula transformada mediante una técnica de ingeniería genética con el gen de un enzima que está implicado en la biosíntesis del sojasapogenol B derivado de plantas, y a un método para producir sojasapogenol B haciendo uso de la célula.

Antecedentes de la Invención

El sojasapogenol B (12-oleaneno-3,22,24-triol) es un triterpeno con un esqueleto oleanano, que ha sido aislado de la semilla de soja y cuya estructura ha sido determinada (Chem. Pharm. Bull., 24, pp. 121-129, 1976; Chem. Pharm. Bull., 30, pp. 2294-2297, 1982) (Referencias no Patentes 1 y 2) y su glucósido sojasaponina está ampliamente distribuido en las plantas leguminosas.

En lo que se refiere al sojasapogenol B, se han descrito hasta ahora su actividad anti-complemento y su acción inhibitoria de la aglutinación plaquetaria (JP-A-61-37749) (Referencia de Patente 1), su actividad antitumoral (JP-A-10-234396) (Referencia de Patente 2) y su actividad hepatoprotectora (Bioorg. Med. Chem. Lett., 7, 85-88, 1997) (Referencia no Patente 3), etcétera, y se espera su utilidad como una preparación farmacéutica o como un material de la misma.

En lo que respecta al método de producción de sojasapogenol B, se conoce un método en el cual cadenas de azúcar de la saponina contenida en las semillas de soja son hidrolizadas y posteriormente el sojasapogenol B es purificado, pero como la proporción de saponina contenida en las semillas de soja es del 0,2% aproximadamente, la cual es muy pequeña (Yakugaku Zasshi, (Journal of Pharmaceutical Sciences), 104, 162-168, 1984) (Referencia no Patente 4), existe la demanda de un método de producción más eficaz.

Se considera que la β -amirina, como precursor biosintético del sojasapogenol B, es biosintetizada mediante el cierre del anillo del 2,3-oxidoescualeno que se forma a través de la ruta del mevalonato, y el sojasapogenol B es biosintetizado posteriormente a través de dos etapas de reacciones de hidroxilación.

El soforadiol (12-oleaneno-3,22-diol), próximo estructuralmente al sojasapogenol B, es una sustancia sobre la que se ha informado que es un componente de la Kaika (*Sophora japonica*) (Yakugaku Zasshi, 78, 1090-1094, 1958) (Referencia no Patente 5) y es posible producir sojasapogenol B mediante la hidroxilación de la posición 24 del soforadiol.

En realidad, se ha descrito un método para producir sojasapogenol B por hidroxilación de la posición 24 del soforadiol utilizando una hidroxilasa derivada de una célula cultivada de *Glycyrrhiza glabra* (WO 02/086142) (Referencia de Patente 3).

Referencia de Patente 1: JP-A-61-37749

Referencia de Patente 2: JP-A-10-234396

Referencia de Patente 3: Publicación Internacional WO 02/086142

Referencia no Patente 1: Chem. Pharm. Bull., 24, pp. 121-129, 1976

Referencia no Patente 2: Chem. Pharm. Bull., 30, pp. 2294-2297, 1982

Referencia no Patente 3: Bioorg. Med. Chem. Lett., 7, 85-88, 1997

Referencia no Patente 4: Yakugaku Zasshi, (Journal of Pharmaceutical Sciences), 104, 162-168, 1984

Referencia no Patente 5: Yakugaku Zasshi, 78, 1090-1094, 1958.

Descripción de la Invención

Problemas que la Invención ha de Resolver

La β -amirina es un precursor biosintético del sojasapogenol B. La misma es biosintetizada por el cierre del anillo del 2,3-oxidoescualeno que se forma a través de la ruta del mevalonato, y el sojasapogenol B es biosintetizado posteriormente a través de dos etapas de reacciones de hidroxilación. Sin embargo, el gen de la hidroxilasa implicado en esta reacción no ha sido revelado. Por tanto, era imposible aplicar una técnica de ingeniería genética sobre la hidroxilasa.

Steele, C.L. y col. ("Molecular Characterization of the Enzyme Catalyzing the Aryl Migration Reaction of Isoflavoid Biosynthesis in Soybean"; Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 367, N° 1, 1999, páginas 146-150) describen el gen del citocromo P450 clonado en un vector baculovírico y la expresión de P450 en células de insecto y en células vegetales. La secuencia de nucleótidos y de proteínas de CYP93E1 fue enviada a la base de datos EMBL/GenBank/DDBJ (N° de Acceso del GenBank AF135485).

US 2004/031072 A1 describe construcciones de ADN recombinante que contienen polinucleótidos (de acuerdo con las secuencias SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 142.842) útiles para la mejora de plantas. Las Secuencias 100510 y 243352 descritas en US 2004/031072 A1, corresponden al gen y al polipéptido del citocromo P450, respectivamente. El material genético exógeno puede ser transferido a una célula vegetal mediante la utilización de un vector de ADN que puede ser diseñado para que se replique en *E. coli* y *A. tumefaciens*.

WO 02 086142 A1 describe la producción de sojasapogenol B mediante el tratamiento de soforadiol con una hidroxilasa originaria de una planta para hidroxilar el compuesto en su posición 24.

Hayashi, H. y col. ("Glycyrrhetic acid 24-hydroxylase activity in microsomes of cultured licorice cells"; Photochemistry, Vol. 34, N° 5, 1993, páginas 1303-1307) informan de la existencia de una monooxigenasa dependiente del citocromo P450 que cataliza la hidroxilación del grupo metilo en C-24 del ácido glicirretínico.

Medios para Resolver los Problemas

Sobre la base de la suposición de que el gen de un enzima de tipo citocromo P450 implicado en la biosíntesis del sojasapogenol B a partir de β -amirina está contenido en un clon de EST (Marcador de Secuencia Expresada) de la soja productor de sojasaponina con una elevada tasa de producción o en un clon cuya función no está identificada, los presentes inventores han llevado a cabo el análisis de las funciones de estos clones de soja utilizando una cepa de levadura mutante deficiente en lanosterol. Entre los clones analizados, la actividad hidroxilante de la posición 24 de un triterpeno de tipo oleanano, que no puede ser detectada originalmente, fue detectada en una cepa de levadura en la cual se transcribió y tradujo el polinucleótido representado por la SEC ID N°: 8. La secuencia polinucleotídica del enzima detectado con actividad hidroxilante es la SEC ID N°: 8 y la secuencia polipeptídica deducida es la SEC ID N°: 9. Se conoce una secuencia que tiene similitud con la SEC ID N°: 8, el gen CYP93E1 del citocromo P450 (Número de Acceso del GenBank AF135485, SEC ID N°: 10, cuya secuencia polipeptídica deducida es la SEC ID N°: 11). El polinucleótido representado por la SEC ID N°: 8 y el polinucleótido representado por la SEC ID N°: 10 son diferentes entre sí en términos de 3 posiciones, la posición 121, la posición 171 y la posición 1081 (de aquí en adelante, la secuencia representada por la SEC ID N°: 8 es denominada también en algunos casos gen CYP93E1 del citocromo P450). Además, el polipéptido representado por la SEC ID N°: 9 y el polipéptido representado por la SEC ID N°: 11 son diferentes entre sí en términos de las posiciones de aminoácidos 41 y 61. Los presentes inventores han revelado que el polinucleótido representado por la SEC ID N°: 8 codifica una proteína enzimática que lleva a cabo la hidroxilación de la posición 24 de un triterpeno de tipo oleanano. Sobre la base de este conocimiento, los inventores han realizado intensos esfuerzos y han llevado a cabo la invención.

Por consiguiente, la invención se refiere a un método para producir un triterpeno de tipo oleanano en el cual la posición 24 está hidroxilada, que comprende:

el cultivo de un transformante que contiene un vector de expresión con un polinucleótido que hibrida con una cadena complementaria del polinucleótido representado por la SEC ID N°: 8 bajo condiciones rigurosas, y codifica también un polipéptido que tiene actividad hidroxilante de la posición 24 de un triterpeno de tipo oleanano, para producir un polipéptido de SEC ID N°: 9; y

el permitir que el transformante actúe sobre un triterpeno de tipo oleanano, donde el transformante es un microorganismo.

Además, la presente invención se refiere a un método como el descrito anteriormente, en el que el polinucleótido es el polinucleótido representado por la SEC ID N°: 8.

Además, la presente invención se refiere a un método como el especificado anteriormente, en el que el transformante es una levadura.

Ventaja de la Invención

Mediante la invención, fue posible revelar la secuencia de nucleótidos del gen de una hidroxilasa de la posición 24 de un triterpeno de tipo oleanano y la secuencia de aminoácidos de la misma. Además, la utilización de dicho gen por medio de técnicas de ingeniería genética hace posible la producción a gran escala de la proteína enzimática como un producto génico.

Además, fue posible llevar a cabo la hidroxilación de la posición 24 de un triterpeno mediante la utilización de la proteína enzimática producida o de un transformante que contenía dicha proteína enzimática. También fue posible producir un triterpeno en el cual la posición 24 estaba hidroxilada, mediante el cultivo directo utilizando un transformante transformado con dicho gen y con un gen de la sintasa de β -amirina.

Modo Mejor de Llevar a Cabo la Invención

Como triterpenos de tipo oleanano de la invención se conocen β -amirina, soforadiol, sojasapogenoles A y B, etcétera, pero el triterpeno de tipo oleanano de la invención no se limita a los casos anteriores.

Como triterpenos de tipo oleanano en los que puede hidroxilarse la posición 24, pueden

ponerse como ejemplo β -amirina y soforadiol, pero éstos no se limitan al caso anterior, con la condición de que sea un compuesto en el cual la posición 24 pueda ser hidroxilada mediante el método de la invención. Como triterpenos en los cuales la posición 24 está hidroxilada, pueden ponerse como ejemplo los sojasapogenoles A y B, pero no se limitan a los sojasapogenoles A y B, con la condición de que sean productos de oxidación producidos mediante la invención.

De acuerdo con la invención, un triterpeno de tipo oleanano en el cual la posición 24 será hidroxilada, puede ser producido utilizando los productos de la transcripción y la traducción de un polinucleótido del gen CYP93E1 del citocromo P450 y de formas equivalentes del mismo. A este respecto, las formas equivalentes son aquellas secuencias que tienen la misma función y que hibridan bajo condiciones rigurosas con una cadena complementaria de la secuencia descrita en el gen CYP93E1 del citocromo P450.

En lo referente a "hibridan bajo condiciones rigurosas", la hibridación de un nucleótido puede ser verificada mediante la utilización de un método (por ejemplo, hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación mediante transferencia Southern o similar) en el que la hibridación se lleva a cabo utilizando como sonda una parte o la porción entera (o una cadena complementaria de la misma) de un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos representada por el gen CYP93E1 del citocromo P450. A manera ilustrativa, puede ponerse como ejemplo un caso en el que la hibridación se lleva a cabo a 55°C en presencia de 0,5 moles/l de cloruro de sodio, y posteriormente se utiliza una solución de SSC 2 x (la composición de la solución de SSC 1 x consta de NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM, pH 7,0).

La hibridación puede ser llevada a cabo de acuerdo con el método descrito en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, editado por T. Maniatis y col., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, o similar. Como ADN que puede ser hibridado, puede ponerse como ejemplo de manera ilustrativa un ADN que muestre una homología de al menos un 80% o más, preferiblemente de un 90% o más, más preferiblemente de un 95% o más, con la secuencia de nucleótidos representada por el gen CYP93E1 del citocromo P450, cuando se calcula utilizando BLAST (National Center for Biotechnology Information). A este respecto, la homología de acuerdo con la invención indica el valor numérico cuando los parámetros de BLAST son fijados como Wordsize: 3, Matrix: BLOSUM 62, Gap Costs: Existence: 11, Extension: 1.

Además, el "polinucleótido que hibrida con una cadena complementaria del polinucleótido del gen CYP93E1 del citocromo P450 bajo condiciones rigurosas y que codifica también un polipéptido que tiene actividad hidroxilante de la posición 24 de un triterpeno de tipo oleanano", incluye de manera ilustrativa un polinucleótido en el que uno o dos o más nucleótidos de la secuencia polinucleotídica del gen CYP93E1 del citocromo P450 han sido eliminados, sustituidos, insertados o añadidos, y que codifica un polipéptido que tiene actividad hidroxilante de la posición 24 de un triterpeno de tipo oleanano. El número de nucleótidos a ser sustituidos en la secuencia polinucleotídica del gen CYP93E1 del citocromo P450 no está particularmente limitado, con la condición de que sea un número que satisfaga la homología anteriormente mencionada y que codifique un polipéptido que tenga actividad hidroxilante la posición 24 de un triterpeno de tipo oleanano.

Una mutación en el polinucleótido del gen CYP93E1 del citocromo P450 incluye una mutación artificial además de las mutaciones que se generan en el mundo natural. Un ejemplo del medio para producir una mutación artificial es un método para obtener un polinucleótido en el que se realiza al menos una deleción, sustitución, inserción y adición en uno o dos o más nucleótidos por medio de una técnica de ingeniería genética, mediante la introducción de una mutación aleatoria o de una mutación dirigida a un sitio utilizando el polinucleótido del gen CYP93E1 del citocromo P450. Utilizando el polinucleótido mutante obtenido de esta manera, resulta posible obtener un polipéptido con propiedades diferentes de temperatura óptima, estabilidad frente al calor, pH óptimo, estabilidad frente al pH, especificidad de sustrato, y otras propiedades similares de la actividad de este enzima.

Además, un polinucleótido que hibride con una cadena complementaria del polinucleótido del gen CYP93E1 del citocromo P450 bajo condiciones rigurosas y que codifique también un polipéptido que tenga la actividad hidroxilante de la posición 24 de un triterpeno de tipo oleanano, puede ser también obtenido mediante un método en el cual se aplica una hibridación (por ejemplo, hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación mediante transferencia Southern o similar) a otros microorganismos, plantas o animales capaces de producir un triterpeno de tipo oleanano en el cual la posición 24 esté hidroxilada (preferiblemente una planta, más preferiblemente una planta leguminosa, más preferiblemente soja, que pueda producir un triterpeno de tipo oleanano), utilizando como sonda una parte o la porción entera (o una cadena complementaria de la misma) de un nucleótido que tenga la secuencia de nucleótidos del gen CYP93E1 del citocromo P450, o mediante un método en el cual se lleve a cabo una PCR utilizando como sonda una parte o la porción entera (o una cadena complementaria de la misma) de un nucleótido que tenga la secuencia de nucleótidos del gen CYP93E1 del citocromo P450, o similar.

Además, el polinucleótido anteriormente mencionado puede ser también obtenido mediante síntesis química sobre la base de la información de la secuencia de nucleótidos. Este método puede ser llevado a cabo mediante referencia a las descripciones contenidas en Gene, vol. 60(1), pp. 115-127 (1987).

Además, la invención se refiere a un transformante preparado mediante la transformación de un huésped con un vector que puede realizar una replicación autónoma (preferiblemente un vector de expresión) para que albergue y/o exprese un polinucleótido del gen CYP93E1 del citocromo P450 y equivalentes del mismo. Di-

cho vector puede contener además un gen de la sintasa de β -amirina además del polinucleótido del gen CYP93E1 del citocromo P450 y equivalentes del mismo.

5 Como huésped, se utiliza un microorganismo. Como microorganismos, pueden ponerse como ejemplo una levadura, *Escherichia coli*, etcétera, y preferiblemente se utiliza una levadura. Es posible proporcionar una planta que tenga un contenido incrementado de un triterpeno de tipo oleanano en el que la posición 24 esté hidroxilada, mediante la transferencia del vector de la invención a la planta.

10 Como ejemplo de la levadura que va a ser transformada, está la levadura GIL 77 deficiente en sintasa de lanosterol (Kushiro, T. y col., Eur. J. Biochem., 256, 238-244, 1998). Resulta posible producir en cultivo un triterpeno en el que la posición 24 esté hidroxilada, mediante la integración de un ADNc correspondiente al gen CYP93E1 del citocromo P450 anteriormente mencionado y un gen de la sintasa de β -amirina derivado del guisante, en el vector de expresión de levaduras pESC-ERA (producido por Stratagene), transformando con el mismo la levadura GIL 77 deficiente en sintasa de lanosterol y efectuando la coexpresión de los dos genes.

15 Como vectores de expresión, se utilizan aquéllos que puedan llevar a cabo una replicación autónoma en la célula huésped o que puedan ser integrados en el cromosoma, y que tengan un promotor en una posición en la que el polinucleótido de la invención pueda ser transcrito.

Como vectores de expresión cuando la célula huésped es un microorganismo pueden ponerse como ejemplo pBluescript (producido por Stratagene), pUC18 (producido por Takara Bio), pUC118 (producido por Takara Bio), pUC19 (producido por Takara Bio), pUC119 (producido por Takara Bio), etcétera.

20 En lo que respecta al promotor, el mismo puede ser cualquier promotor que pueda efectuar la expresión en células huésped de *Escherichia coli*, de un hongo, etcétera. Pueden citarse, por ejemplo, un promotor de trp (P_{trp}), un promotor de lac (P_{lac}) y promotores similares derivados de *Escherichia coli*, de un fago, etcétera, y un promotor del gen de la Taka-amilasa, un promotor del gen TEF 1 y promotores similares derivados de una cepa de *Aspergillus*, etcétera.

25 Además, puede utilizarse también un promotor diseñado y modificado artificialmente y similares.

Con respecto al método para transferir un vector recombinante, puede utilizarse cualquier método para transferir un polinucleótido a las células huésped anteriormente mencionadas y, por ejemplo, puede citarse un método que utiliza el ión calcio [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)], etcétera.

30 Como vectores de expresión cuando una cepa de levadura es la célula huésped, pueden ponerse como ejemplo pAUR101 (producido por Takara Bio), pAUR112 (producido por Takara Bio), pl-REDI (producido por TOYOBO), etcétera.

Como promotor, puede ser cualquier promotor que pueda efectuar la expresión en la cepa de levadura.

35 Por ejemplo, pueden citarse un promotor de un gen de un enzima de la ruta glucolítica, un promotor de Gal y promotores similares.

En lo que respecta al método para transferir un vector recombinante, puede utilizarse cualquier método para transferir un polinucleótido a una cepa de levadura y pueden citarse, por ejemplo, la electroporación [Methods Enzymol., 194, 182 (1990)], el método de los esferoplastos [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)], el método del acetato de litio [Journal of Bacteriology (J. Bacteriol.), 153, 163 (1983)], etcétera.

40 En lo que respecta al medio y a las condiciones de cultivo de las células huésped, es posible seleccionar los mismos opcionalmente de acuerdo con los métodos convencionalmente conocidos. Cuando se utiliza un microorganismo como célula huésped, el medio a utilizar para el cultivo del transformante obtenido puede ser un medio natural o un medio sintético, con la condición de que sea un medio que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, etcétera, que puedan ser asimiladas por dicho microorganismo y que pueda llevar a cabo el cultivo del transformante eficazmente.

45 Como fuente de carbono puede utilizarse dextrosa de patata, glucosa, sacarosa, almidón soluble, glicerol, dextrina, melazas, ácidos orgánicos, etcétera. Como fuente de nitrógeno puede utilizarse sulfato de amonio, carbonato de amonio, fosfato de amonio, acetato de amonio y sales inorgánicas similares, o sales de amonio de ácidos orgánicos, otros compuestos de nitrógeno, peptona, extracto de levadura, extracto de embrión de maíz, hidrolizados de caseína y extracto de carne. Como sales inorgánicas, pueden utilizarse fosfato primario de potasio, fosfato secundario de potasio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, carbonato de calcio, etcétera.

55 Cuando la célula huésped es un gusano de seda, el polipéptido de la invención puede ser expresado, por ejemplo, mediante un método convencionalmente conocido que utiliza un sistema de expresión de baculovirus [Appl. Microbiol. Biotechnol., 62, 1-20 (2003)]. Además, cuando se obtiene una planta transformada con el polipéptido de la invención utilizando una célula vegetal como huésped, por ejemplo, es eficaz la transferencia

directa de genes que utiliza un plásmido Ti o un sistema plasmídico binario de *Agrobacterium tumefaciens*, un plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* o polietilén glicol o electroporación [Methods in Molecular Biology, 267, Recombinant Gene Expression, 329-50 (2004)].

Además, cuando se cultiva un transformante al que se ha transferido un vector de expresión con un promotor inducible, puede añadirse al medio un inductor según demande la ocasión. Por ejemplo, puede añadirse al medio isopropil- β -D-tiogactopiranosido o similar cuando se utilice el promotor de lac, o ácido indolacrílico o similar cuando se utilice el promotor de trp.

A este respecto, en lo referente al método para expresar el polipéptido de la invención distinto de su expresión directa, el mismo puede ser llevado a cabo de acuerdo con el método descrito en Molecular Cloning Segunda Edición o similar.

Un triterpeno de tipo oleanano en el que la posición 24 esté hidroxilada puede ser producido utilizando el transformante anteriormente descrito. El transformante es cultivado en el medio añadiendo como sustrato el triterpeno de tipo oleanano. El compuesto hidroxilado en la posición 24 así obtenido es extraído con acetato de etilo, éter o un solvente orgánico similar y purificado utilizando gel de sílice u ODS.

Además, un triterpeno de tipo oleanano en el que la posición 24 esté hidroxilada puede ser también producido preparando un extracto libre de células a partir del medio de cultivo del transformante. En ese caso, las células recogidas son suspendidas en un líquido de suspensión, las células resultantes son rotas utilizando un homogeneizador, un desintegrador sónico, una prensa francesa o similar, y posteriormente son centrifugadas para obtener un extracto libre de células. Con el fin de impedir la inactivación del polipéptido, puede añadirse al líquido tamponante un antioxidante, un estabilizador enzimático, un agente que adsorba polifenoles, un ligando de metales, etcétera. Es eficaz purificar el polipéptido para incrementar adicionalmente la actividad específica, y puede utilizarse centrifugación en una centrífuga, desplazamiento salino con sulfato de amonio o similar, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, electroforesis y técnicas similares, solas o en combinación.

El triterpeno de tipo oleanano para ser utilizado como sustrato y un coenzima son añadidos al tampón que contiene el polipéptido así obtenido e incubados a una temperatura de 15 a 45°C, preferiblemente de 20 a 37°C. Como coenzima, puede utilizarse NADH o NADPH, y puede utilizarse también conjuntamente un sistema de reconstrucción de NADPH que utiliza glucosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Además, es posible también llevar a cabo la reacción de hidroxilación mediante la adición de una reductasa de NADPH-P450 distinta de la reductasa de NADPH-P450 producida por las células transformantes.

Cuando se utilizan los transformantes descritos en el párrafo [0012] que contienen además el gen de la sintasa de β -amirina, se produce un triterpeno de tipo oleanano utilizando el 2,3-óxidoescualeno producido por las propias células transformantes, de tal manera que puede producirse el triterpeno de tipo oleanano hidroxilado en la posición 24 sin añadir el triterpeno de tipo oleanano procedente del resto externo. El compuesto hidroxilado en la posición 24 así obtenido es extraído con acetato de etilo, éter o un solvente orgánico similar y es purificado posteriormente utilizando gel de sílice u ODS. A continuación se describen resúmenes de los ejemplos de la invención.

Se seleccionaron siete especies de clones de EST y de citocromo P450 derivados de la soja cuyas funciones no se han identificado pero cuyas secuencias de nucleótidos completas han sido descritas (Números de Acceso del GenBank: AF 135485, Y 10491, Y 10982, Y 10983, Y 10493 y AF 022459, y Número de Acceso de TIGRA: TC 100921). Entre ellas, CYP93E1 (Número de Acceso del GenBank AF 135485) mostró la actividad, y el polinucleótido de SEC ID N°: 8 que mostraba una elevada homología con el mismo se describe a continuación. Un ADNc correspondiente al CYP93E1 (SEC ID N°: 8) fue amplificado mediante el método de RT-PCR a partir de un ARNm preparado de brotes de soja y se integró en el vector de expresión de levaduras pESC-ERA (producido por Stratagene), y una levadura deficiente en sintasa de lanosterol, GIL 77 (Kushiro, T y col., Eur. J. Biochem., 256, 238-244, 1998), fue transformada con el mismo para llevar a cabo el análisis de la función. Extractos libres de células de los transformantes de levadura se dejaron reaccionar con β -amirina y los productos fueron acetilados y analizados mediante GC-MS. Como resultado, se detectó 3,24-diacetoxi-12-oleanano.

De la misma manera, extractos libres de células de los transformantes de levadura se dejaron reaccionar con soforadiol y los productos fueron acetilados y analizados mediante GC-MS. Como resultado, se detectó triacetilsojasapogenol B.

Se añadió β -amirina al medio de cultivo de los transformantes de levadura y se dejó que experimentara la reacción, y posteriormente se recogieron las células. Se extrajeron y acetilaron las fracciones liposolubles y posteriormente se analizaron mediante GC-MS. Como resultado se detectó 3,24-diacetoxi-12-oleanano.

El ADNc de SEC ID N°: 8 anteriormente mencionado y el gen de la sintasa de β -amirina derivado del guisante fueron integrados en el vector de expresión de levaduras pESC-ERA (producido por Stratagene) y la levadura GIL 77 deficiente en sintasa de lanosterol fue transformada con el mismo, produciéndose de este modo la coexpresión de los dos genes. Esta levadura transformada, denominada GIL77/pESC-PSY-CYP93E1, ha sido depositada el 6 de Febrero de 2004 como FERM P-19675 (transferida a FERM

BP-10201 el 6 de Enero de 2005) en el International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (código postal 305-8566; Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón).

La levadura transformada fue cultivada y se recogieron las células. La fracción liposoluble fue extraída y acetilada y posteriormente analizada mediante GC-MS. Como resultado, se detectó 3,24-diacetoxi-12-oleanoeno.

De la misma manera, el ADNc de SEC ID N°: 8 anteriormente mencionado y el gen de la sintasa de triterpenos mixtos derivado de *Arabidopsis thaliana* fueron integrados en el vector de expresión de levaduras pESC-ERA (producido por Stratagene) y la levadura GIL 77 deficiente en sintasa de lanosterol fue transformada con el mismo, produciéndose de este modo la coexpresión de los dos genes.

La levadura transformada fue cultivada y se recogieron las células. La fracción liposoluble fue extraída y acetilada y posteriormente analizada mediante GC-MS. Como resultado, se detectó 3,24-diacetoxi-12-oleanoeno. No fueron detectables otros diacetoxitriterpenos.

Sobre la base de los resultados anteriores, se confirmó la actividad hidroxilante de la posición 24 de soforadiol y β -amirina, que no se había detectado originalmente, de tal manera que pudo revelarse que la SEC ID N°: 8 es un gen que codifica un enzima que hidroxila la posición 24 de un triterpeno de tipo oleanano. Por otra parte, esta actividad no fue detectada en los otros 6 genes del P450 examinados de la misma manera.

A continuación se describe la invención con más detalle basada en ejemplos, pero la invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1

(1) Preparación de ADNc de brotes de soja

El ARN total fue extraído mediante el método del fenol/cloroformo de hojas jóvenes de soja (soja verde de maduración temprana, Atariya Noen) después de 14 días de maceración en agua. Mediante la utilización de éste como molde, se preparó ADNc utilizando la transcriptasa inversa Superscript II (producida por GIBCO BRL) y el cebador mostrado en la SEC ID N°: 1.

(2) Amplificación del polinucleótido de SEC ID N°: 8

Utilizando como molde el ADNc preparado en el punto (1) anteriormente mencionado, y como cebadores los oligofragmentos de ADN que corresponden al extremo N y al extremo C del polipéptido mostrados en las SEC ID N°s: 2 y 3, se llevó a cabo una PCR (30 ciclos, ADN polimerasa Ex Taq producida por Takara Shuzo) a una temperatura de hibridación de 65°C para obtener un clon de CYP93E1 de longitud completa (SEC ID N°: 8).

(3) Construcción de pESC-CYP93E1 y preparación de una levadura transformada

El clon de longitud completa obtenido en el punto (2) anterior fue tratado con *SpeI* y *ClaI* e integrado en el sitio de *SpeI-ClaI* del vector de expresión de levaduras pESC-URA (producido por Stratagene). El mismo fue denominado pESC-CYP93E. El pESC-CYP93E fue transferido a la cepa de levadura INVSC 2 (producida por Invitrogen) utilizando "Frozen-EZ Yeast Transformation II" (fabricado por Zymo Research).

(4) Ensayo de actividad enzimática *in vitro*

La levadura transformada fue inoculada en 20 ml de medio SC-U (Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990) que contenía un 2% de rafinosa en lugar de glucosa y cultivada a 30°C y a 220 rpm durante 18 horas. A ello se añadieron Hemina (13 μ g/ml de concentración final) y galactosa (2% de concentración final) para llevar a cabo el cultivo durante 20 horas bajo las mismas condiciones. Las células fueron recogidas por centrifugación, transferidas a un vial de rosca de 2 ml de capacidad y suspendidas de nuevo mediante la adición de 100 μ l de un tampón de extracción (preparado mediante la adición de un 10% de sacarosa, EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 14 mM a tampón fosfato de potasio 50 mM de pH 7,5). Esferas de vidrio con un diámetro de 0,4 a 0,6 mm (producidas por Luchi Seieido) fueron lavadas con ácido clorhídrico diluido y añadidas a las células. Se llevó a cabo la rotura de las células mediante enfriamiento a 4°C utilizando MINI-BEADREADER (producido por BIOSPEC). Todo ello fue posteriormente mezclado con 400 μ l de tampón de extracción y se agitó exhaustivamente, posteriormente se centrifugó a 3500 g durante 5 minutos mientras se mantenía en refrigeración a 4°C para recuperar 400 μ l aproximadamente del sobrenadante como un líquido enzimático bruto. Al mismo se añadieron 100 μ l de un tampón de reacción concentrado (preparado mediante la adición de NADPH 10 mM, glucosa-6-fosfato (G6P) 75 mM y 2,5 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) al tampón de extracción) y 5 μ l de una solución 10 mM de β -amirina en metanol. Se dejó que todo esto experimentara la reacción a 30°C durante 6 horas. Después de añadir 10 μ l de ácido clorhídrico 12 N, se concentró mediante la realización de la extracción de los componentes liposolubles, dos veces, utilizando 500 μ l de acetato de etilo. La acetilación del extracto se realizó añadiendo al mismo 20 μ l de piridina y anhídrido acético y dejándolo reposar durante una noche. La reacción fue parada mediante la adición a la misma de 200 μ l de una solución acuosa de metanol al 50% y se concentró llevando a cabo una extracción dos veces utilizando 200 μ l de hexano (1). Como ensayo control, se prepararon muestras mediante el mismo método en: 2) un caso en el cual se utilizó un

líquido enzimático bruto derivado de un transformante preparado empleando pESC-URA, 3) un caso en el cual no se añadió β -amirina como sustrato, 4) un caso en el cual la reacción se llevó a cabo utilizando un líquido enzimático bruto tratado con calor a 100°C durante 5 minutos, y 5) un caso en el cual se añadió la misma cantidad de glucosa en lugar de galactosa con el fin de inhibir el promotor de GAL 1 de pESC-CYP93E1. Cada una de ellas se disolvió en 20 μ l de hexano y una porción de 1 μ l de las mismas fue sometida a análisis mediante GC-MS (cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas GC-MS-QP 2010 fabricado por Shimadzu Corp., columna: Rtx-5MS fabricada por RESTEK, diámetro interno 0,25 mm, espesor de la membrana 0,25 μ m, longitud 30 m; programa de elevación de la temperatura: 3 minutos de mantenimiento a 230°C, aumento de la temperatura a 10°C/minutos, 8 minutos de mantenimiento a 230°C). Se llevó a cabo la monitorización de los iones totales (TIM) y se analizó la presencia o ausencia del producto mediante un cromatograma de masas de $m/z = 218$ (pico base de 3 β ,24-diacetoxi-12-oleaneno). No se encontró formación de 3 β ,24-diacetoxi-12-oleaneno por TIM (resultados no descritos). Sin embargo, se observó 3 β ,24-diacetoxi-12-oleaneno en el cromatograma de masas de $m/z = 218$ mediante las condiciones de 1) (Fig. 1). Sobre la base de este resultado, se confirmó que el producto de la traducción de CYP93E1 tenía actividad para llevar a cabo la hidroxilación de la posición 24 de β -amirina.

A continuación, con el fin de examinar su reactividad con soforadiol, la reacción enzimática se llevó a cabo de la misma manera utilizando como sustrato soforadiol (5 μ l, 10 mM), y se realizó el análisis mediante GC-MS de la misma manera que anteriormente. El pico de triacetil sojasapogenol B fue encontrado mediante el análisis del cromatograma de masas ($m/z = 216$ pico base de triacetil sojasapogenol B) del producto bajo las condiciones de reacción del punto 1) anteriormente mencionado (Fig. 2). Sobre la base de este resultado, se reveló que el producto de la traducción de CYP93E1 tenía actividad para llevar a cabo la hidroxilación de la posición 24 no sólo de β -amirina sino también de soforadiol.

(5) Ensayo de actividad enzimática *in vivo*

La levadura transformada fue inoculada en 20 ml de medio SC-U que contenía un 2% de rafinosa en lugar de glucosa y se cultivó a 30°C y a 220 rpm durante 18 horas. A todo ello se añadieron hemina (13 μ g/ml de concentración final) y galactosa (2% de concentración final) y a todo ello se añadieron además 10 μ l de una solución 10 mM en metanol de β -amirina como sustrato. Para suministrar oxígeno, la parte superior del tubo Falcon fue sellada con un tapón de algodón y el mismo fue posteriormente cultivado durante 24 horas asépticamente y aeróbicamente. Las células fueron recogidas por centrifugación y transferidas a un vial de rosca de 2 ml de capacidad. A las mismas se añadió una porción de 250 μ l de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 40% y 250 μ l de metanol, y la mezcla fue agitada exhaustivamente y tratada con calor a 100°C durante 5 minutos. La misma fue concentrada llevando a cabo la extracción de los componentes liposolubles dos veces utilizando 500 μ l de hexano. La acetilación del extracto se realizó mediante la adición al mismo de 20 μ l de piridina y anhídrido acético y dejándolo reposar durante una noche. La reacción fue parada mediante la adición a la misma de 200 μ l de una solución acuosa al 50% de metanol y todo esto fue concentrado llevando a cabo una extracción dos veces utilizando 200 μ l de hexano (1). Como ensayo control, se prepararon muestras mediante el mismo método en: 2) un caso en el cual se utilizó un transformante preparado utilizando pESC-URA, 3) un caso en el cual no se añadió β -amirina como sustrato y 4) un caso en el cual se añadió la misma cantidad de glucosa en lugar de galactosa con el propósito de inhibir el promotor de GAL 1 de pESC-CYP93E1. Cada una de ellas fue disuelta en 10 μ l de hexano y una porción de 1 μ l de las mismas fue sometida a análisis mediante GC-MS bajo las mismas condiciones que en (4) (las condiciones son las mismas que en el ensayo de (4)). El pico de 3 β ,24-diacetoxi-12-oleaneno fue observado mediante TIM bajo las condiciones de 1) (Fig. 3), y el patrón de corte de la MS del pico coincidía con la preparación estándar (Fig. 4). Sobre la base de los resultados de la determinación mediante la proporción del área de los picos de TIM, puede considerarse que se obtuvieron varios μ g de 3 β ,24-dihidroxi-12-oleaneno cuando se cultivaron utilizando 1 litro de medio bajo las mismas condiciones del caso anterior (adición de 2 mg de β -amirina aproximadamente).

(6) Construcción del plásmido de expresión pESC-PSY

Utilizando como molde un plásmido en el que se había integrado el gen de la sintasa de β -amirina PSY derivado del guisante (AB034802, Eur. J. Biochem., 267, 3543-3460, 2000), y utilizando como cebadores los oligofragmentos de ADN mostrados en las SEC ID N^{os}: 4 y 5 que corresponden al extremo N y al extremo C del polipéptido, se llevó a cabo una PCR (30 ciclos, ADN polimerasa Ex Taq producida por Takara Shuzo) a una temperatura de hibridación de 58°C para obtener un fragmento de PSY en el cual se habían introducido sitios de *Sall* y *NheI* en el extremo N y en el extremo C, respectivamente. El pESC-PSY fue preparado introduciendo el mismo en los sitios de *Sall* y *NheI* de pESC-URA, y la actividad sintasa de β -amirina fue confirmada mediante un método convencionalmente conocido (Eur. J. Biochem., 267, 3543-3460, 2000).

(7) Construcción del plásmido de expresión pESC-PSY-CYP93E1 y preparación de la levadura transformada

Se sometieron a digestión con *Sall* y *Clal* pESC-PSY y pESC-CYP93E1. Ligando el fragmento que contenía PSY y el fragmento que contenía CPY93E1 así obtenidos, se construyó el plásmido pESC-PSY-CYP93E1 que coexpresaba PSY y CYP93E1. Se obtuvo un transformante transfiriendo este plásmido a la cepa de levadura GIL 77 utilizando "Frozen-EZ Yeast Transformation II".

(8) Ensayo de coexpresión de PSY y CYP93E1

La cepa de levadura transformada fue inoculada en un medio preparado suplementando 20 ml del medio SC-U que contenía un 2% de glucosa como fuente de carbono, con hemina (13 µg/ml de concentración final), ergosterol (20 µg/ml de concentración final) y Tween 80 (5 mg/ml de concentración final), y cultivada a 30°C y 220 rpm durante 1,5 días. El medio fue cambiado por un medio preparado mediante la adición de hemina (13 µg/ml de concentración final), ergosterol (20 µg/ml de concentración final) y Tween 80 (5 mg/ml de concentración final) a 20 ml del medio SC-U que contenía un 2% de galactosa como fuente de carbono, y posteriormente el cultivo fue continuado a 30°C y 220 rpm durante 1 día. Las células fueron transferidas a tampón fosfato de potasio 50 mM de pH 7,5, mezclado con hemina (13 µg/ml de concentración final) y glucosa (3% de concentración final) e incubadas posteriormente a 30°C y 220 rpm durante 1 día. Se preparó una muestra acetilada para análisis mediante GC-MS de la misma manera que en el método de ensayo de (4). Como ensayo control, se prepararon muestras mediante el mismo método de un transformante preparado utilizando pESC-URA y de un transformante preparado utilizando pESC-PSY y pESC-CYP93E1. Cada una de estas muestras fue disuelta en 1000 µl de hexano y una porción de 1 µl de las mismas fue sometida a análisis mediante GC-MS (las condiciones son las mismas que en el ensayo de (4)). Según se muestra en la Fig. 5, se observaba por TIM un pico correspondiente a 3β,24-diacetoxi-12-oleaneno solamente cuando se utilizó la cepa de levadura transformada con pESC-PSY-CYP93E1. Como resultado del análisis de determinativo por la proporción de las áreas de los picos, puede considerarse que se obtuvieron varios cientos de µg de 3β,24-dihidroxi-12-oleaneno cuando se cultivaron utilizando 1 litro de medio bajo estas condiciones.

(9) Cultivo a gran escala (1 l) de GIL 77/pESC-PSY-CYP93E1

La cepa de levadura transformada fue inoculada en un matraz cónico de 500 ml de capacidad cargado con 250 ml de un medio preparado mediante la adición de hemina (13 µg/ml de concentración final), ergosterol (20 µg/ml de concentración final) y Tween 80 (5 mg/ml de concentración final) a 250 ml del medio SC-U que contenía un 2% de rafinosa como fuente de carbono. Esto fue preparado para 4 matraces y se llevó a cabo el cultivo en 1 litro de volumen total. Después de cultivar a 30°C y a 220 rpm durante 20 horas, el mismo fue suplementado con galactosa (2% de concentración final) y cultivado posteriormente a 30°C y a 220 rpm durante 20 horas. Las células completas fueron transferidas a 100 ml de tampón fosfato de potasio 50 mM de pH 7,5, mezclado con hemina (13 µg/ml de concentración final) y glucosa (3% de concentración final) e incubadas posteriormente a 30°C y a 220 rpm durante 1 día.

(10) Aislamiento del producto a partir de 1 litro de cultivo de GIL 77/pESC-PSY-CYP93E1

Las células fueron recogidas de la mezcla de cultivo obtenida en (9), mezcladas con 50 ml de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 40% y 50 ml de metanol y calentadas bajo reflujo durante 1 hora. La extracción de la fracción liposoluble fue llevada a cabo utilizando 50 ml de hexano. La fracción de hexano fue lavada exhaustivamente tres veces con 50 ml de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La extracción se llevó a cabo repitiendo esta operación 3 veces para obtener 23 mg aproximadamente de la fracción liposoluble.

Esta fracción fue purificada mediante dos etapas de cromatografía instantánea en columna de gel de sílice. Primeramente, la fracción liposoluble anteriormente mencionada fue disuelta en benceno y purificada utilizando gel de sílice FC-40 (4 g, producido por Wako Pure Chemical Industries) y un sistema de solventes hexano-acetato de etilo. Posteriormente, dicha fracción fue purificada utilizando gel de sílice FC-40 (2 g) y un sistema de solventes benceno-acetato de etilo para obtener 0,55 mg de 3β,24-dihidroxi-12-oleaneno.

(11) Construcción del plásmido de expresión pESC-YUP43

Se utilizó como molde un plásmido al que se había integrado un gen YUP43 de la sintasa de triterpenos multifuncional derivado de *Arabidopsis thaliana* (Tetrahedron Lett., 41, 7705-7710, 2000) que proporciona 9 especies de triterpenos, incluyendo β-amirina, y utilizando como cebadores los oligofragmentos de ADN mostrados en las SEC ID N^{os}: 6 y 7 que corresponden al extremo N y al extremo C del polipéptido; se llevó a cabo una PCR (temperatura de hibridación 58°C, 30 ciclos, ADN polimerasa Ex Taq producida por Takara Shuzo) para obtener un fragmento de YUP43 en el cual los sitios de *SalI* y *NheI* estaban introducidos en el extremo N y en el extremo C, respectivamente. El pESC-YUP43 fue preparado introduciendo el mismo en los sitios de *SalI* y *NheI* de pESC-URA, y la actividad sintasa de triterpenos multifuncional fue confirmada mediante un método convencionalmente conocido (Tetrahedron Lett., 41, 7705-7710, 2000).

(12) Construcción del plásmido de expresión pESC-YUP43-CYP93E1 y preparación de una levadura transformada

Los plásmidos pESC-YUP43 y pESC-CYP93E1 fueron digeridos con *SalI* y *ClaI*. Ligando el fragmento que contenía YUP43 y el fragmento que contenía CYP93E1, se construyó el plásmido pESC-YUP43-CYP93E1 que coexpresaba YUP43 y CYP93E1. Se obtuvo un transformante transfiriendo el mismo a la cepa de levadura GIL 77 utilizando "Frozen-EZ Yeast Transformation II".

(13) Ensayo de coexpresión de polipéptidos de los productos de transcripción y traducción de YUP43 y del polinucleótido de SEC ID N^o: 8

Mediante el mismo método de (8), se prepararon muestras de los transformantes obtenidos respectivamente utilizando pESC-URA, pESC-YUP43, pESC-CYP93E1 y pESC-YUP43-CYP93E1. Cada uno de ellos fue disuelto en 1000 μ l de hexano y una porción de 1 μ l de los mismos fue sometida a análisis mediante GC-MS (las condiciones son las mismas que en el ensayo de (4)). Según se muestra en la Fig. 7, se observó un pico de 3 β ,24-diacetoxi-12-oleaneno mediante TIM solamente cuando se utilizó la cepa de levadura transformada con pESC-YUP43-CYP93E1. Como la cantidad producida de β -amirina por YUP43 era menor que la producida por PSY, la cantidad producida de 3 β ,24-diacetoxi-12-oleaneno estaba disminuida en comparación con la producida por el transformante pESC-PSY-CYP93E1. Por otra parte, los picos que fueron considerados como formas de hidroxilación de otros triterpenos (lupeol, butiroespermol, tirucaladienol, taraxaesterol, pseudotaraxaesterol, baurelenol, α -amirina y multiflorenol) eran iguales o menores que el límite de detección. Aunque la invención ha sido descrita con detalle y con referencia a realizaciones específicas de la misma, será obvio para una persona experta en la técnica que pueden realizarse en la misma diferentes cambios y modificaciones sin alejarse del espíritu y del ámbito de la invención.

Esta solicitud está basada en una solicitud de patente japonesa registrada el 25 de Febrero de 2004 (Solicitud de Patente de Japonesa N^o 2004-049123).

Aplicabilidad Industrial

Mediante la invención, se ha hecho posible manipular, mediante una técnica de ingeniería genética, un enzima que lleva a cabo la hidroxilación de la posición 24 de un triterpeno de tipo oleanano. Por consiguiente, la utilización de una célula en la cual se haya integrado dicho gen de una hidroxilasa hace posible su empleo en, por ejemplo, la producción de la hidroxilasa por una cepa de levadura, la aplicación de la reacción de hidroxilación, la producción microbiana de un triterpeno vegetal, etcétera. Además, mediante la integración del gen de la hidroxilasa en una planta, surge la posibilidad de aplicar la misma en el campo de la agricultura, tal como para incrementar la producción de sojasapogenol o de un triterpeno similar.

Breve Descripción de las Figuras

La [Fig. 1] muestra la actividad hidroxilante (*in vitro*) de la posición 24 de β -amirina presentada por el producto de la traducción de la SEC ID N^o: 8. Más ilustrativamente, muestra un cromatograma de masas monitorizando m/Z = 218 que fue analizado mediante GC-MS después de la acetilación del producto. A a F muestran los resultados siguientes. A: muestra estándar de 3 β ,24-diacetoxi-12-oleaneno. B: producto obtenido permitiendo la reacción de un líquido enzimático bruto preparado a partir de una cepa de levadura transformada con pESC-CYP93E1 con β -amirina en coexistencia con un sistema de regeneración de NADPH. C: un producto de la reacción de B llevada a cabo eliminando la β -amirina del sistema de reacción. D: un producto de la reacción de B llevada a cabo utilizando un líquido enzimático bruto desnaturalizado por calor. E: la cepa de levadura transformada con pESC-CYP93E1 fue cultivada añadiendo glucosa, siendo el resto de las condiciones las mismas que en B. F: se utilizó un líquido enzimático bruto preparado a partir de una cepa de levadura transformada con un plásmido pESC-URA vacío, siendo las demás condiciones las mismas que en B.

La [Fig. 2] muestra la actividad hidroxilante (*in vitro*) de la posición 24 de soforadiol presentada por el producto de la traducción de la SEC ID N^o: 8. Más ilustrativamente, muestra un cromatograma de masas monitorizando m/Z = 216 que fue analizado mediante GC-MS después de la acetilación del producto. A a F muestran los resultados siguientes. A: muestra estándar de triacetil sojasapogenol B. B: producto obtenido permitiendo la reacción de un líquido enzimático bruto preparado a partir de una cepa de levadura transformada con pESC-CYP93E1 con soforadiol en coexistencia con un sistema de regeneración de NADPH. C: un producto de la reacción de B llevada a cabo eliminando el soforadiol del sistema de reacción. D: un producto de la reacción de B llevada a cabo utilizando un líquido enzimático bruto desnaturalizado por calor. E: la cepa de levadura transformada con pESC-CYP93E1 fue cultivada añadiendo glucosa, siendo el resto de las condiciones las mismas que en B. F: se utilizó un líquido enzimático bruto preparado a partir de una cepa de levadura transformada con un plásmido pESC-URA vacío, siendo las demás condiciones las mismas que en B.

La [Fig. 3] muestra la actividad hidroxilante (*in vivo*) de la posición 24 de β -amirina presentada por el producto de la traducción de la SEC ID N^o: 8. Más ilustrativamente, muestra un cromatograma mediante TIM de GC-MS después de la acetilación del producto. A a E muestran los resultados siguientes. A: una muestra estándar de 3 β ,24-diacetoxi-12-oleaneno (20 pmoles). B: un producto obtenido mediante la adición de β -amirina a una cepa de levadura transformada con pESC-CYP-93E1. C: un caso en el cual no se añadió β -amirina, siendo las demás condiciones las mismas que en B. D: la levadura transformada fue cultivada añadiendo glucosa, siendo las demás condiciones las mismas que en B. E: se añadió β -amirina a una cepa de levadura transformada con un plásmido pESC-URA vacío, siendo las otras condiciones las mismas que en B.

La [Fig. 4] muestra la actividad hidroxilante (*in vivo*) de la posición 24 de β -amirina presentada por el producto de la traducción de la SEC ID N^o: 8. A y B muestran los resultados siguientes. A: un espectro de masas del pico al tiempo de retención de 15,35 minutos, detectado en B de la Fig. 3. B: un espectro de masas de A de la Fig. 3 (muestra estándar de 3 β ,24-diacetoxi-12-oleaneno).

La [Fig. 5] muestra la producción de 3 β ,24-dihidroxi-12-oleaneno por la coexpresión de CYP93E1 y la sintasa de β -amirina (PSY). Más ilustrativamente, muestra un cromatograma mediante TIM del

análisis por GC-MS después de la acetilación de la fracción liposoluble obtenida de la levadura transformada respectiva (GIL 77). A a E muestran los resultados siguientes. A: muestra estándar de 3 β ,24-diacetoxi-12-oleaneno (20 pmoles). B: un extracto de la cepa de levadura transformada con pESC-PSY-CYP93E1. C: un extracto de la cepa de levadura transformada con pESC-PSY. D: un extracto de la cepa de levadura transformada con pESC-CYP93E1. E: un extracto de la cepa de levadura transformada con pESC-URA.

La [Fig. 6] muestra la ¹H-RMN del producto obtenido a partir de 1 litro del medio de cultivo de GIL 77/pESC-PSY-CYP93E1.

La [Fig. 7] muestra la producción de 3 β ,24-dihidroxi-12-oleaneno mediante la coexpresión del producto de la traducción de la SEC ID N^o: 8 y una sintasa de triterpenos multifuncional (YUP43). Más ilustrativamente, muestra un cromatograma mediante TIM del análisis por GC-MS después de la acetilación de la fracción liposoluble obtenida de la levadura transformada respectiva (GIL 77). A a E muestran los resultados siguientes. A: muestra estándar de 3 β ,24-diacetoxi-12-oleaneno (20 pmoles). B: un extracto de la cepa de levadura transformada con pESC-YUP43-CYP93E1. C: un extracto de la cepa de levadura transformada con pESC-YUP43. D: un extracto de la cepa de levadura transformada con pESC-CYP93E1. E: un extracto de la cepa de levadura transformada con pESC-URA.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Meiji Seika Kaisha LTD.

<120> Hidroxilasa de triterpenos

<130> P05160900

<150> JP 2004-049123

<151> 25-02-2004

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador para ADNc

<400> 1

gactcgagtc gacaacgatt tttttttt t

32

<210> 2

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador directo para CYP93E1

<400> 2

aaacactagt atgctagaca tcaaaggcta c

31

<210> 3
 <211> 31
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia del cebador inverso para CYP93E1
 <400> 3
 ttcaatcgat tcaggcagcg aacggagtga a 31
 10
 <210> 4
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador directo para PSY
 <400> 4
 ctctcgcgac aagatgtgga ggttgaagat a 31
 20 <210> 5
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador inverso para PSY
 <400> 5
 gtccgctagc tcaaggcaaa ggaactcttc t 31
 30 <210> 6
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para YUP43
 35 <220>
 <221> características_varias
 <223> Cebador directo para YUP43
 <400> 6
 tagggtcgcac attatgtgga agttgaagat a 31

<210> 7
 <211> 31
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso para YUP43
 <400> 7
 taaggctagc ctaaagatct tgatgagttg c 31
 10
 <210> 8
 <211> 1542
 <212> ADN
 <213> Soja
 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1542)
 <223>
 <400> 8
 20 atg cta gac atc aaa ggc tac ctc gta ctc ttc ttc cta tgg ttc ata 48
 Met Leu Asp Ile Lys Gly Tyr Leu Val Leu Phe Phe Leu Trp Phe Ile
 1 5 10 15
 tca acc att ctg ata cgt tcc atc ttc aag aaa cca cag cgt cta aga 96
 Ser Thr Ile Leu Ile Arg Ser Ile Phe Lys Lys Pro Gln Arg Leu Arg
 25 20 25 30
 ctc cca ccg ggt cct cca att tca gta ccc ttg ctg gga cac gcg cca 144
 Leu Pro Pro Gly Pro Pro Ile Ser Val Pro Leu Leu Gly His Ala Pro
 35 40 45
 tat ctc cgt tca ctg ctc cac caa gcc ttg tac aag cta tca ctg cgc 192
 30 Tyr Leu Arg Ser Leu Leu His Gln Ala Leu Tyr Lys Leu Ser Leu Arg
 50 55 60
 tat gga ccc ttg atc cac gtc atg atc ggt tcg aag cac gtg gtg gtg 240
 Tyr Gly Pro Leu Ile His Val Met Ile Gly Ser Lys His Val Val Val
 65 70 75 80
 35 gcg tcg tcg gcg gag acg gcc aag cag atc ctc aaa acc tcg gag gag 288
 Ala Ser Ser Ala Glu Thr Ala Lys Gln Ile Leu Lys Thr Ser Glu Glu
 85 90 95
 gca ttc tgc aac cgt ccc tta atg ata gcg agc gag agc cta acc tac 336
 Ala Phe Cys Asn Arg Pro Leu Met Ile Ala Ser Glu Ser Leu Thr Tyr

ES 2 357 241 T3

100 105 110
 ggc gcg cgc gac tac ttc ttc atc ccc tac ggc aca tac tgg cgg ttc 384
 Gly Ala Ala Asp Tyr Phe Phe Ile Pro Tyr Gly Thr Tyr Trp Arg Phe
 115 120 125
 5 ctg aag aag ctc tgc atg acg gag ctt ctg agc ggg aag acc ctg gag 432
 Leu Lys Lys Leu Cys Met Thr Glu Leu leu Ser Gly Lys Thr Leu Glu
 130 135 140
 cat ttc gtg aga atc cgc gag agc gag gtg gag gcg ttc ctc aag aga 480
 His Phe Val Arg Ile Arg Glu Ser Glu Val Glu Ala Phe Leu Lys Arg
 10 145 150 155 160
 atg atg gag att tca ggc aat gga aat tac gag gtg gtg atg agg aag 528
 Met Met Glu Ile Ser Gly Asn Gly Asn Tyr Glu Val Val Met Arg Lys
 165 170 175
 gag ctc ata acg cac acg aat aac atc atc acg agg atg ata atg ggg 576
 15 Glu Leu Ile Thr His Thr Asn Asn Ile Ile Thr Arg Met Ile Met Gly
 180 185 190
 aag aag agt aat gcg gaa aac gat gag gtg gcc agg ttg agg aag gtg 624
 Lys Lys Ser Asn Ala Glu Asn Asp Glu Val Ala Arg Leu Arg Lys Val
 195 200 205
 20 gtg agg gag gtc ggg gag ttg ctt ggg gcg ttt aac ttg ggg gat gtt 672
 Val Arg Glu Val Gly Glu Leu Leu Gly Ala Phe Asn Leu Gly Asp Val
 210 215 220
 att ggg ttc atg agg cct ttg gat ctg caa ggg ttt ggg aag aag aac 720
 Ile Gly Phe Met Arg Pro Leu Asp Leu Gln Gly Phe Gly Lys Lys Asn
 25 225 230 235 240
 atg gaa act cac cac aag gtg gat gcg atg atg gag aag gtg ttg agg 768
 Met Glu Thr His His Lys Val Asp Ala Met Met Glu Lys Val Leu Arg
 245 250 255
 gag cat gag gag gct agg gct aag gaa gat gct gac tct gat agg aag 816
 30 Glu His Glu Glu Ala Arg Ala Lys Glu Asp Ala Asp Ser Asp Arg Lys
 260 265 270
 aag gat ctt ttt gat att ttg ttg aac ctc att gaa gct gat ggt gct 864
 Lys Asp Leu Phe Asp Ile Leu Leu Asn Leu Ile Glu Ala Asp Gly Ala
 275 280 285

gac aat aag ctc act aga gag agt gcc aaa gcc ttt gct ctg gac atg 912
 Asp Asn Lys Leu Thr Arg Glu Ser Ala Lys Ala Phe Ala Leu Asp Met
 290 295 300

ttc atc gcc ggc aca aac ggc ccc gca agc gtc cta gag tgg tca ctg 960
 5 Phe Ile Ala Gly Thr Asn Gly Pro Ala Ser Val Leu Glu Trp Ser Leu
 305 310 315 320

gcg gag ctg gtg aga aac ccc cac gtt ttc aag aag gca aga gaa gag 1008
 Ala Glu Leu Val Arg Asn Pro His Val Phe Lys Lys Ala Arg Glu Glu
 325 330 335

10 att gag tca gtg gta ggc aaa gaa agg ctg gtc aaa gaa tca gac att 1056
 Ile Glu Ser Val Val Gly Lys Glu Arg Leu Val Lys Glu Ser Asp Ile
 340 345 350

ccc aac cta cca tac cta caa gca ttg ctg aag gaa acc cta agg ctg 1104
 Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Leu Leu Lys Glu Thr Leu Arg Leu
 15 355 360 365

cac ccg cca acc cca ata ttc gca aga gaa gcc atg cga aca tgc cag 1152
 His Pro Pro Thr Pro Ile Phe Ala Arg Glu Ala Met Arg Thr Cys Gln
 370 375 380

gtt gaa ggc tac gac att ccg gaa aat tcc act att ttg atc agc aca 1200
 20 Val Glu Gly Tyr Asp Ile Pro Glu Asn Ser Thr Ile Leu Ile Ser Thr
 385 390 395 400

tgg gcc att ggt agg gat cca aat tac tgg gat gac gca ctc gag tac 1248
 Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asn Tyr Trp Asp Asp Ala Leu Glu Tyr
 405 410 415

25 aag ccg gag agg ttc ttg ttc tcc gac gac ccg ggc aag agc aag att 1296
 Lys Pro Glu Arg Phe Leu Phe Ser Asp Asp Pro Gly Lys Ser Lys Ile
 420 425 430

gac gtg agg ggg cag tac tat cag ctc ctg ccc ttt ggg agc ggg aga 1344
 Asp Val Arg Gly Gln Tyr Tyr Gln Leu Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg
 30 435 440 445

aga agc tgc ccc gga gcc tcg cta gcg ttg ctt gtc atg caa gca acg 1392
 Arg Ser Cys Pro Gly Ala Ser Leu Ala Leu Leu Val Met Gln Ala Thr
 450 455 460

ES 2 357 241 T3

cta gcg agt ttg atc cag tgc ttc gac tgg atc gtt aat gat ggt aaa 1440
 Leu Ala Ser Leu Ile Gln Cys Phe Asp Trp Ile Val Asn Asp Gly Lys
 465 470 475 480
 aac cat cat gtt gac atg tct gag gaa ggg agg gtg act gtg ttt ttg 1488
 5 Asn His His Val Asp Met Ser Glu Glu Gly Arg Val Thr Val Phe Leu
 485 490 495
 gcc aag cca ctc aag tgc aag cct gtt ccg cgt ttc act ccg ttc gct 1536
 Ala Lys Pro Leu Lys Cys Lys Pro Val Pro Arg Phe Thr Pro Phe Ala
 500 505 510
 10 gcc tga 1542
 Ala
 <210> 9
 <211> 513
 15 <212> PRT
 <213> Soja
 <400> 9
 Met Leu Asp Ile Lys Gly Tyr Leu Val Leu Phe Phe Leu Trp Phe Ile
 1 5 10 15
 20 Ser Thr Ile Leu Ile Arg Ser Ile Phe Lys Lys Pro Gln Arg Leu Arg
 20 25 30
 Leu Pro Pro Gly Pro Pro Ile Ser Val Pro Leu Leu Gly His Ala Pro
 35 40 45
 Tyr Leu Arg Ser Leu Leu His Gln Ala Leu Tyr Lys Leu Ser Leu Arg
 25 50 55 60
 Tyr Gly Pro Leu Ile His Val Met Ile Gly Ser Lys His Val Val Val
 65 70 75 80
 Ala Ser Ser Ala Glu Thr Ala Lys Gln Ile Leu Lys Thr Ser Glu Glu
 85 90 95
 30 Ala Phe Cys Asn Arg Pro Leu Met Ile Ala Ser Glu Ser Leu Thr Tyr
 100 105 110
 Gly Ala Ala Asp Tyr Phe Phe Ile Pro Tyr Gly Thr Tyr Trp Arg Phe
 115 120 125
 Leu Lys Lys Leu Cys Met Thr Glu Leu leu Ser Gly Lys Thr Leu Glu
 35 130 135 140
 His Phe Val Arg Ile Arg Glu Ser Glu Val Glu Ala Phe Leu Lys Arg
 145 150 155 160
 Met Met Glu Ile Ser Gly Asn Gly Asn Tyr Glu Val Val Met Arg Lys
 165 170 175

ES 2 357 241 T3

	Glu Leu Ile Thr His Thr Asn Asn Ile Ile Thr Arg Met Ile Met Gly	180	185	190	
	Lys Lys Ser Asn Ala Glu Asn Asp Glu Val Ala Arg Leu Arg Lys Val	195	200	205	
5	Val Arg Glu Val Gly Glu Leu Leu Gly Ala Phe Asn Leu Gly Asp Val	210	215	220	
	Ile Gly Phe Met Arg Pro Leu Asp Leu Gln Gly Phe Gly Lys Lys Asn	225	230	235	240
10	Met Glu Thr His His Lys Val Asp Ala Met Met Glu Lys Val Leu Arg	245	250	255	
	Glu His Glu Glu Ala Arg Ala Lys Glu Asp Ala Asp Ser Asp Arg Lys	260	265	270	
	Lys Asp Leu Phe Asp Ile Leu Leu Asn Leu Ile Glu Ala Asp Gly Ala	275	280	285	
15	Asp Asn Lys Leu Thr Arg Glu Ser Ala Lys Ala Phe Ala Leu Asp Met	290	295	300	
	Phe Ile Ala Gly Thr Asn Gly Pro Ala Ser Val Leu Glu Trp Ser Leu	305	310	315	320
	Ala Glu Leu Val Arg Asn Pro His Val Phe Lys Lys Ala Arg Glu Glu	325	330	335	
20	Ile Glu Ser Val Val Gly Lys Glu Arg Leu Val Lys Glu Ser Asp Ile	340	345	350	
	Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Leu Leu Lys Glu Thr Leu Arg Leu	355	360	365	
25	His Pro Pro Thr Pro Ile Phe Ala Arg Glu Ala Met Arg Thr Cys Gln	370	375	380	
	Val Glu Gly Tyr Asp Ile Pro Glu Asn Ser Thr Ile Leu Ile Ser Thr	385	390	395	400
	Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asn Tyr Trp Asp Asp Ala Leu Glu Tyr	405	410	415	
30					

ES 2 357 241 T3

Lys Pro Glu Arg Phe Leu Phe Ser Asp Asp Pro Gly Lys Ser Lys Ile
 420 425 430
 Asp Val Arg Gly Gln Tyr Tyr Gln Leu Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg
 435 440 445
 5 Arg Ser Cys Pro Gly Ala Ser Leu Ala Leu Leu Val Met Gln Ala Thr
 450 455 460
 Leu Ala Ser Leu Ile Gln Cys Phe Asp Trp Ile Val Asn Asp Gly Lys
 465 470 475 480
 Asn His His Val Asp Met Ser Glu Glu Gly Arg Val Thr Val Phe Leu
 10 485 490 495
 Ala Lys Pro Leu Lys Cys Lys Pro Val Pro Arg Phe Thr Pro Phe Ala
 500 505 510
 Ala

 15 <210> 10
 <211> 1542
 <212> ADN
 <213> Soja
 <220>
 20 <221> CDS
 <222> (1)..(1542)
 <223>
 <400> 10
 atg cta gac atc aaa ggc tac ctc gta ctc ttc ttc cta tgg ttc ata 48
 25 Met Leu Asp Ile Lys Gly Tyr Leu Val Leu Phe Phe Leu Trp Phe Ile
 1 5 10 15
 tca acc att ctg ata cgt tcc atc ttc aag aaa cca cag cgt cta aga 96
 Ser Thr Ile Leu Ile Arg Ser Ile Phe Lys Lys Pro Gln Arg Leu Arg
 20 25 30
 30 ctc cca ccg ggt cct cca att tca ata ccc ttg ctg gga cac gcg cca 144
 Leu Pro Pro Gly Pro Pro Ile Ser Ile Pro Leu Leu Gly His Ala Pro
 35 40 45
 tat ctc cgt tca ctg ctc cac caa gca ttg tac aag cta tca ctg cgc 192
 Tyr Leu Arg Ser Leu Leu His Gln Ala Leu Tyr Lys Leu Ser Leu Arg
 35 50 55 60
 tat gga ccc ttg atc cac gtc atg atc ggt tcg aag cac gtg gtg gtg 240
 Tyr Gly Pro Leu Ile His Val Met Ile Gly Ser Lys His Val Val Val
 65 70 75 80
 gcg tcg tcg gcg gag acg gcc aag cag atc ctc aaa acc tcg gag gag 288

Ala Ser Ser Ala Glu Thr Ala Lys Gln Ile Leu Lys Thr Ser Glu Glu
85 90 95
gca ttc tgc aac cgt ccc tta atg ata gcg agc gag agc cta acc tac 336
Ala Phe Cys Asn Arg Pro Leu Met Ile Ala Ser Glu Ser Leu Thr Tyr
5 100 105 110
ggc gcg gcg gac tac ttc ttc atc ccc tac ggc aca tac tgg cgg ttc 384
Gly Ala Ala Asp Tyr Phe Phe Ile Pro Tyr Gly Thr Tyr Trp Arg Phe
115 120 125
ctg aag aag ctc tgc atg acg gag ctt ctg agc ggg aag acc ctg gag 432
10 Leu Lys Lys Leu Cys Met Thr Glu Leu leu Ser Gly Lys Thr Leu Glu
130 135 140
cat ttc gtg aga atc cgc gag agc gag gtg gag gcg ttc ctc aag aga 480
His Phe Val Arg Ile Arg Glu Ser Glu Val Glu Ala Phe Leu Lys Arg
145 150 155 160
15 atg atg gag att tca ggc aat gga aat tac gag gtg gtg atg agg aag 528
Met Met Glu Ile Ser Gly Asn Gly Asn Tyr Glu Val Val Met Arg Lys
165 170 175
gag ctc ata acg cac acg aat aac atc atc acg agg atg ata atg ggg 576
Glu Leu Ile Thr His Thr Asn Asn Ile Ile Thr Arg Met Ile Met Gly
20 180 185 190
aag aag agt aat gcg gaa aac gat gag gtg gcc agg ttg agg aag gtg 624
Lys Lys Ser Asn Ala Glu Asn Asp Glu Val Ala Arg Leu Arg Lys Val
195 200 205
gtg agg gag gtc ggg gag ttg ctt ggg gcg ttt aac ttg ggg gat gtt 672
25 Val Arg Glu Val Gly Glu Leu Leu Gly Ala Phe Asn Leu Gly Asp Val
210 215 220
att ggg ttc atg agg cct ttg gat ctg caa ggg ttt ggg aag aag aac 720
Ile Gly Phe Met Arg Pro Leu Asp Leu Gln Gly Phe Gly Lys Lys Asn
225 230 235 240

	atg gaa act cac cac aag gtg gat gcg atg atg gag aag gtg ttg agg	768
	Met Glu Thr His His Lys Val Asp Ala Met Met Glu Lys Val Leu Arg	
	245 250 255	
	gag cat gag gag gct agg gct aag gaa gat gct gac tct gat agg aag	816
5	Glu His Glu Glu Ala Arg Ala Lys Glu Asp Ala Asp Ser Asp Arg Lys	
	260 265 270	
	aag gat ctt ttt gat att ttg ttg aac ctc att gaa gct gat ggt gct	864
	Lys Asp Leu Phe Asp Ile Leu Leu Asn Leu Ile Glu Ala Asp Gly Ala	
	275 280 285	
10	gac aat aag ctc act aga gag agt gcc aaa gcc ttt gct ctg gac atg	912
	Asp Asn Lys Leu Thr Arg Glu Ser Ala Lys Ala Phe Ala Leu Asp Met	
	290 295 300	
	ttc atc gcc ggc aca aac ggc ccc gca agc gtc cta gag tgg tca ctg	960
	Phe Ile Ala Gly Thr Asn Gly Pro Ala Ser Val Leu Glu Trp Ser Leu	
15	305 310 315 320	
	gcg gag ctg gtg aga aac ccc cac gtt ttc aag aag gca aga gaa gag	1008
	Ala Glu Leu Val Arg Asn Pro His Val Phe Lys Lys Ala Arg Glu Glu	
	325 330 335	
	att gag tca gtg gta ggc aaa gaa agg ctg gtc aaa gaa tca gac att	1056
20	Ile Glu Ser Val Val Gly Lys Glu Arg Leu Val Lys Glu Ser Asp Ile	
	340 345 350	
	ccc aac cta cca tac cta caa gca gtg ctg aag gaa acc cta agg ctg	1104
	Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val Leu Lys Glu Thr Leu Arg Leu	
	355 360 365	
25	cac ccg cca acc cca ata ttc gca aga gaa gcc atg cga aca tgc cag	1152
	His Pro Pro Thr Pro Ile Phe Ala Arg Glu Ala Met Arg Thr Cys Gln	
	370 375 380	
	gtt gaa ggc tac gac att ccg gaa aat tcc act att ttg atc agc aca	1200
	Val Glu Gly Tyr Asp Ile Pro Glu Asn Ser Thr Ile Leu Ile Ser Thr	
30	385 390 395 400	
	tgg gcc att ggt agg gat cca aat tac tgg gat gac gca ctc gag tac	1248
	Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asn Tyr Trp Asp Asp Ala Leu Glu Tyr	
	405 410 415	

ES 2 357 241 T3

```

aag ccg gag agg ttc ttg ttc tcc gac gac ccg ggc aag agc aag att      1296
Lys Pro Glu Arg Phe Leu Phe Ser Asp Asp Pro Gly Lys Ser Lys Ile
      420      425      430
gac gtg agg ggg cag tac tat cag ctc ctg ccc ttt ggg agc ggg aga      1344
5  Asp Val Arg Gly Gln Tyr Tyr Gln Leu Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg
      435      440      445
aga agc tgc ccc gga gcc tcg cta gcg ttg ctt gtc atg caa gca acg 1392
Arg Ser Cys Pro Gly Ala Ser Leu Ala Leu Leu Val Met Gln Ala Thr
      450      455      460
10 cta gcg agt ttg atc cag tgc ttc gac tgg atc gtt aat gat ggt aaa      1440
Leu Ala Ser Leu Ile Gln Cys Phe Asp Trp Ile Val Asn Asp Gly Lys
      465      470      475      480
aac cat cat gtt gac atg tct gag gaa ggg agg gtg act gtg ttt ttg      1488
Asn His His Val Asp Met Ser Glu Glu Gly Arg Val Thr Val Phe Leu
15      485      490      495
gcc aag cca ctc aag tgc aag cct gtt ccg cgt ttc act ccg ttc gct      1536
Ala Lys Pro Leu Lys Cys Lys Pro Val Pro Arg Phe Thr Pro Phe Ala
      500      505      510
gcc tga
20 Ala
1542

<210> 11
<211> 513
<212> PRT
25 <213> Soja
<400> 11
Met Leu Asp Ile Lys Gly Tyr Leu Val Leu Phe Phe Leu Trp Phe Ile
1      5      10      15
Ser Thr Ile Leu Ile Arg Ser Ile Phe Lys Lys Pro Gln Arg Leu Arg
30      20      25      30
Leu Pro Pro Gly Pro Pro Ile Ser Ile Pro Leu Leu Gly His Ala Pro
      35      40      45
Tyr Leu Arg Ser Leu Leu His Gln Ala Leu Tyr Lys Leu Ser Leu Arg
      50      55      60

```

ES 2 357 241 T3

Tyr Gly Pro Leu Ile His Val Met Ile Gly Ser Lys His Val Val Val
 65 70 75 80
 Ala Ser Ser Ala Glu Thr Ala Lys Gln Ile Leu Lys Thr Ser Glu Glu
 85 90 95
 5 Ala Phe Cys Asn Arg Pro Leu Met Ile Ala Ser Glu Ser Leu Thr Tyr
 100 105 110
 Gly Ala Ala Asp Tyr Phe Phe Ile Pro Tyr Gly Thr Tyr Trp Arg Phe
 115 120 125
 10 Leu Lys Lys Leu Cys Met Thr Glu Leu leu Ser Gly Lys Thr Leu Glu
 130 135 140
 His Phe Val Arg Ile Arg Glu Ser Glu Val Glu Ala Phe Leu Lys Arg
 145 150 155 160
 Met Met Glu Ile Ser Gly Asn Gly Asn Tyr Glu Val Val Met Arg Lys
 165 170 175
 15 Glu Leu Ile Thr His Thr Asn Asn Ile Ile Thr Arg Met Ile Met Gly
 180 185 190
 Lys Lys Ser Asn Ala Glu Asn Asp Glu Val Ala Arg Leu Arg Lys Val
 195 200 205
 20 Val Arg Glu Val Gly Glu Leu Leu Gly Ala Phe Asn Leu Gly Asp Val
 210 215 220
 Ile Gly Phe Met Arg Pro Leu Asp Leu Gln Gly Phe Gly Lys Lys Asn
 225 230 235 240
 Met Glu Thr His His Lys Val Asp Ala Met Met Glu Lys Val Leu Arg
 245 250 255
 25 Glu His Glu Glu Ala Arg Ala Lys Glu Asp Ala Asp Ser Asp Arg Lys
 260 265 270
 Lys Asp Leu Phe Asp Ile Leu Leu Asn Leu Ile Glu Ala Asp Gly Ala
 275 280 285
 30 Asp Asn Lys Leu Thr Arg Glu Ser Ala Lys Ala Phe Ala Leu Asp Met
 290 295 300
 Phe Ile Ala Gly Thr Asn Gly Pro Ala Ser Val Leu Glu Trp Ser Leu
 305 310 315 320
 Ala Glu Leu Val Arg Asn Pro His Val Phe Lys Lys Ala Arg Glu Glu
 325 330 335

ES 2 357 241 T3

	Ile Glu Ser Val Val Gly Lys Glu Arg Leu Val Lys Glu Ser Asp Ile	340	345	350	
	Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val Leu Lys Glu Thr Leu Arg Leu	355	360	365	
5	His Pro Pro Thr Pro Ile Phe Ala Arg Glu Ala Met Arg Thr Cys Gln	370	375	380	
	Val Glu Gly Tyr Asp Ile Pro Glu Asn Ser Thr Ile Leu Ile Ser Thr	385	390	395	400
	Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asn Tyr Trp Asp Asp Ala Leu Glu Tyr	405	410	415	
10	Lys Pro Glu Arg Phe Leu Phe Ser Asp Asp Pro Gly Lys Ser Lys Ile	420	425	430	
	Asp Val Arg Gly Gln Tyr Tyr Gln Leu Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg	435	440	445	
15	Arg Ser Cys Pro Gly Ala Ser Leu Ala Leu Leu Val Met Gln Ala Thr	450	455	460	
	Leu Ala Ser Leu Ile Gln Cys Phe Asp Trp Ile Val Asn Asp Gly Lys	465	470	475	480
	Asn His His Val Asp Met Ser Glu Glu Gly Arg Val Thr Val Phe Leu	485	490	495	
20	Ala Lys Pro Leu Lys Cys Lys Pro Val Pro Arg Phe Thr Pro Phe Ala	500	505	510	
	Ala				

REIVINDICACIONES

1.- Un método para producir un triterpeno de tipo oleanano en el cual la posición 24 está hidroxilada, que comprende:

5 el cultivo de un transformante que contiene un vector de expresión con un polinucleótido que hibrida con una cadena complementaria del polinucleótido representado por la SEC ID N°: 8 bajo condiciones rigurosas y también codifica un polipéptido que tiene actividad hidroxilante de la posición 24 de un triterpeno de tipo oleanano, con el fin de producir un polipéptido de SEC ID N°: 9; y

el permitir que el transformante actúe sobre un triterpeno de tipo oleanano, donde el transformante es un microorganismo.

10 2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polinucleótido es el polinucleótido representado por la SEC ID N°: 8.

3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el transformante es una levadura.

FIG. 1

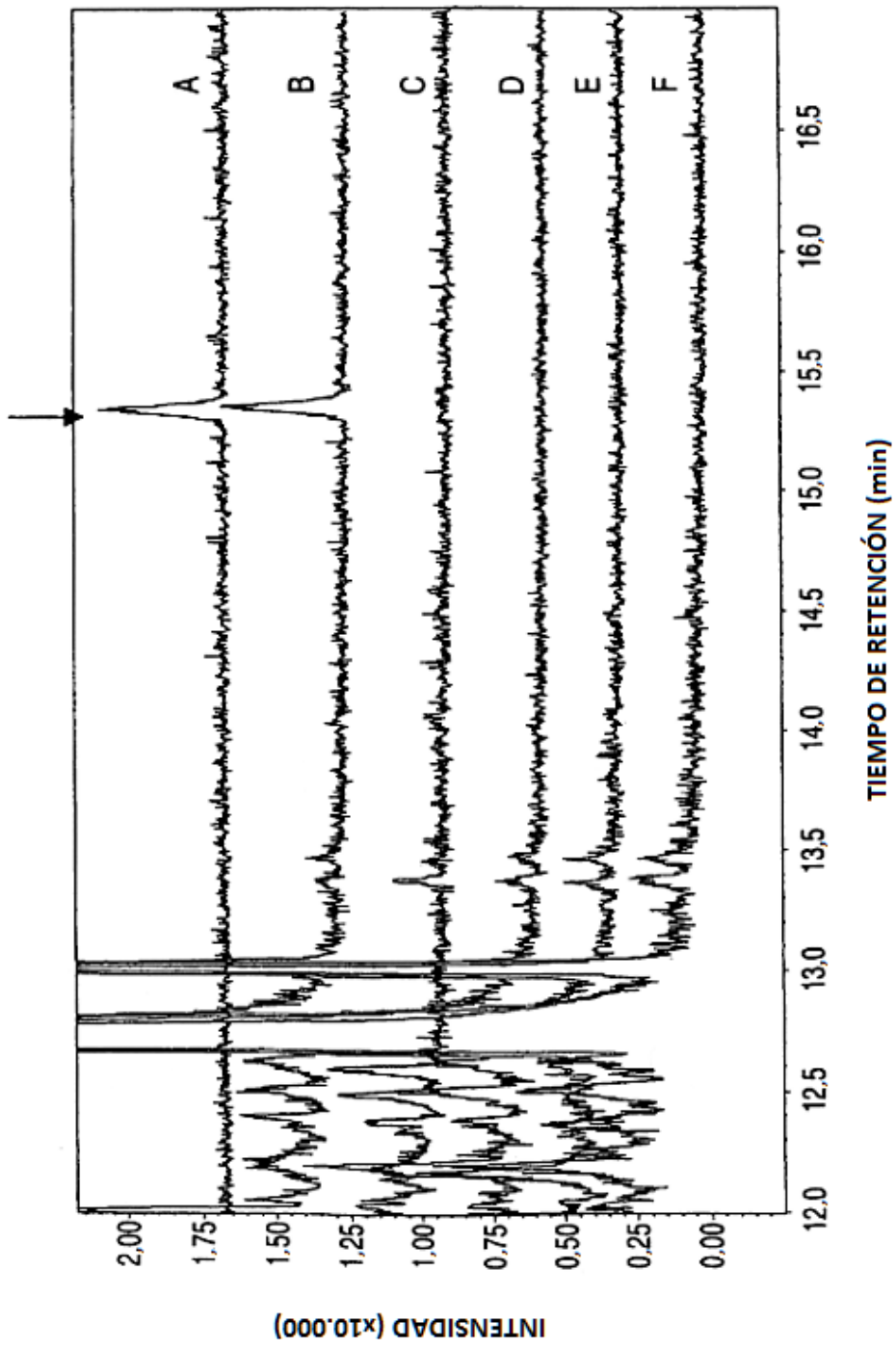


FIG. 2

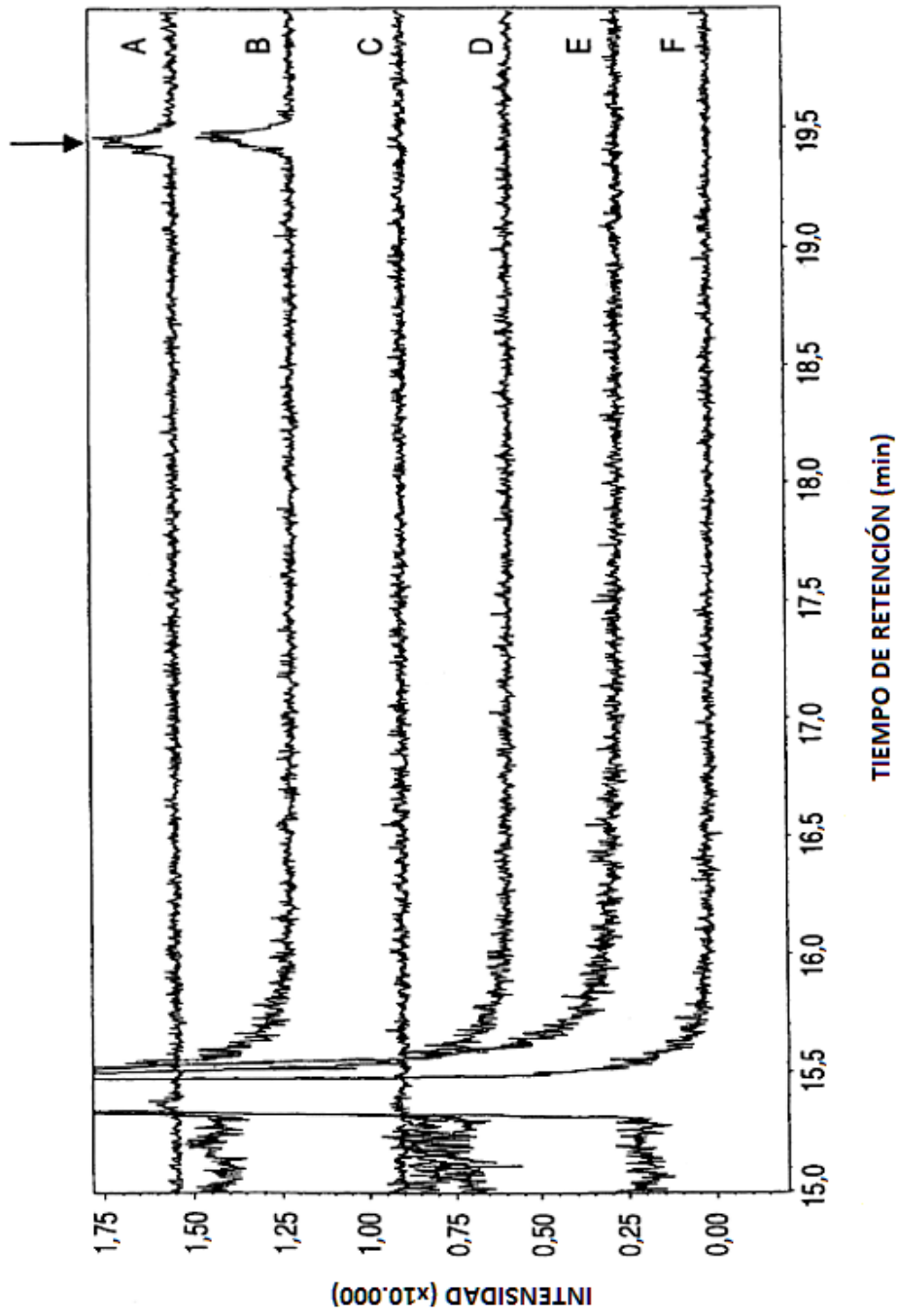


FIG. 3

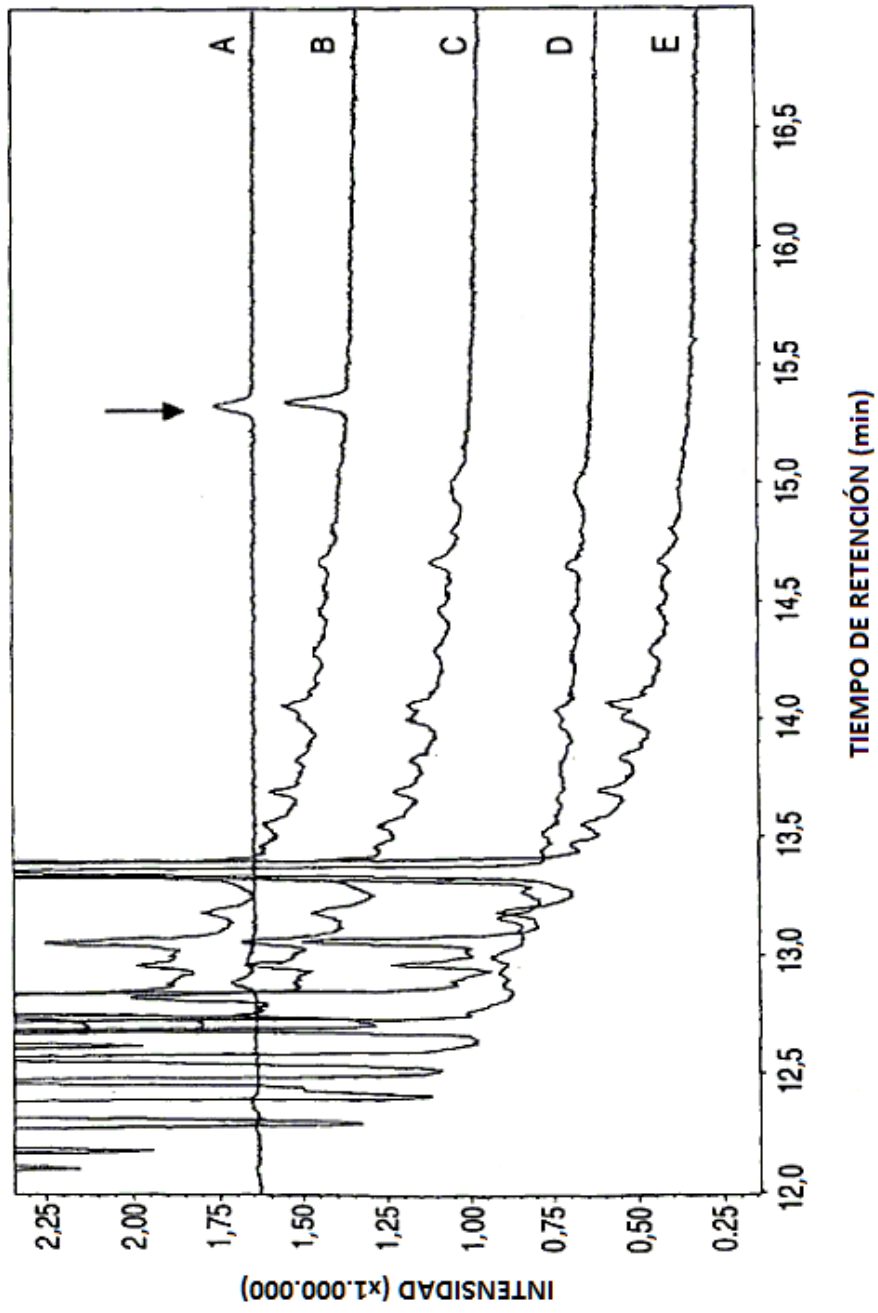


FIG. 4

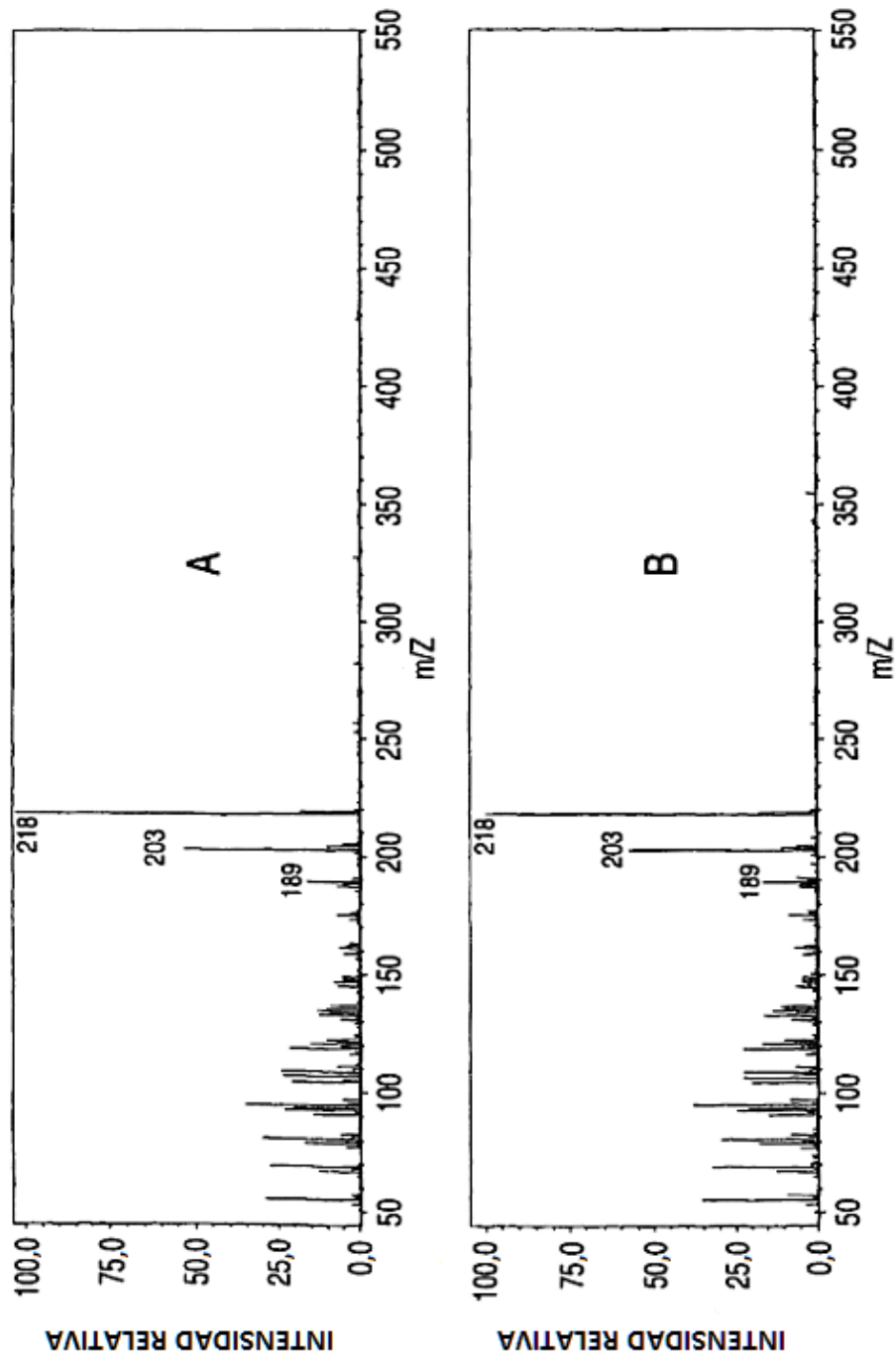


FIG. 5

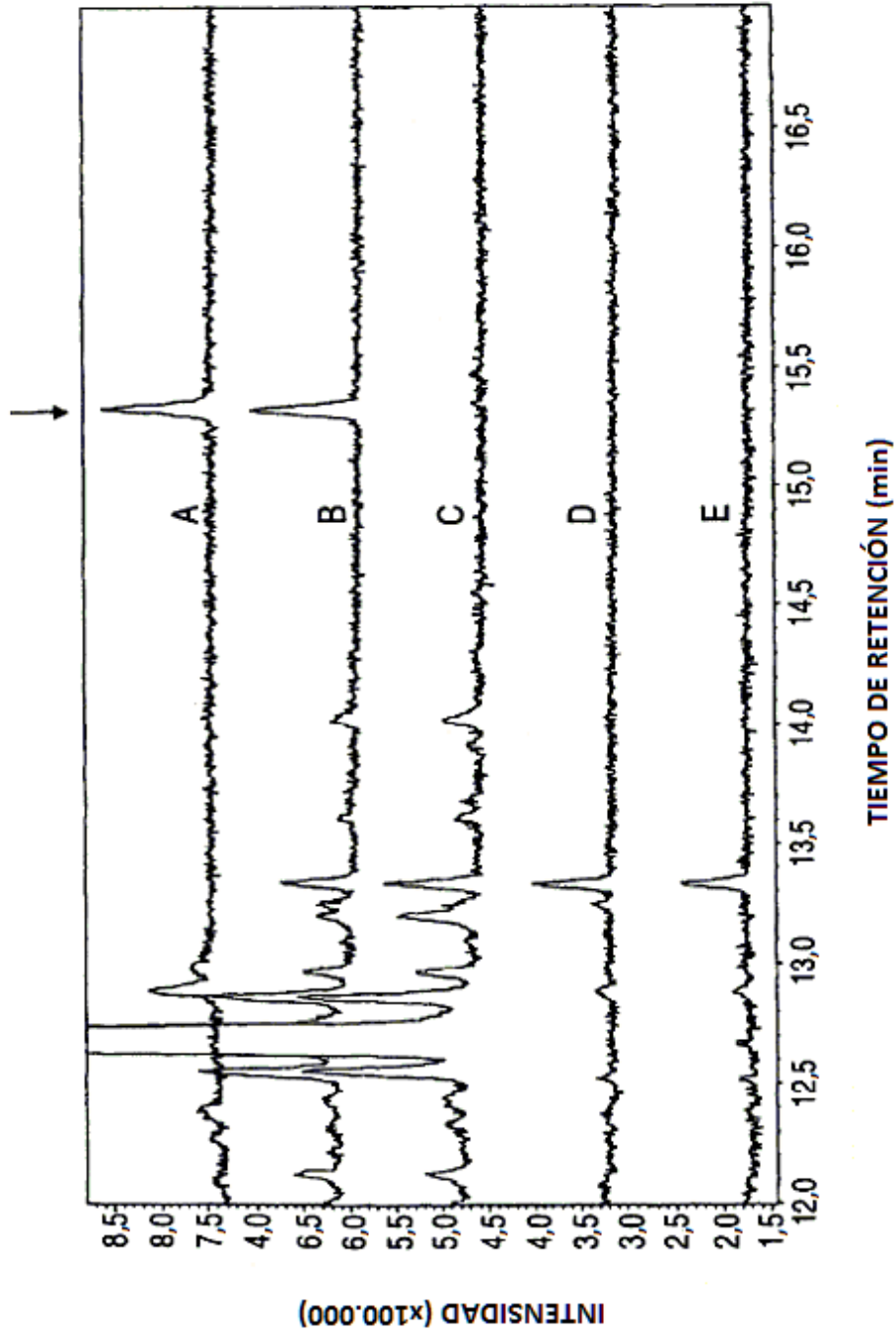


FIG. 6

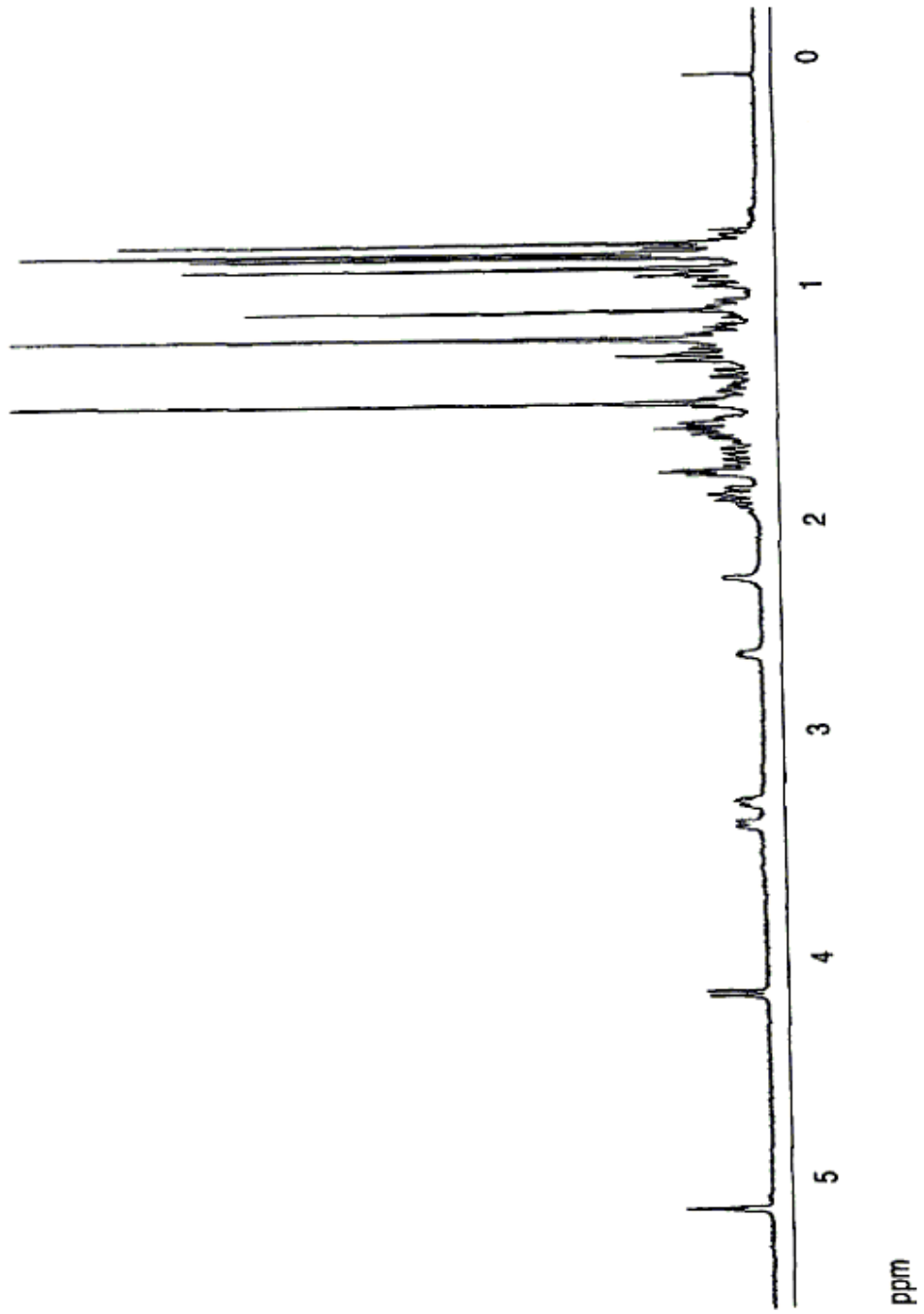


FIG. 7

