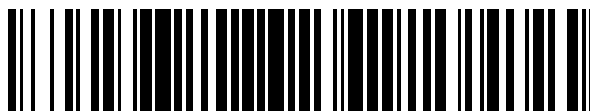


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 588**

51 Int. Cl.:
C12N 1/18 (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)
C12P 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05763706 .8**
96 Fecha de presentación: **02.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1745123**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

54 Título: **Cepas de levadura que producen colesterol y sus aplicaciones**

30 Prioridad:
06.05.2004 FR 0404890

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.11.2012

73 Titular/es:
AVENTIS PHARMA S.A. (100.0%)
20, AVENUE RAYMOND ARON
92160 ANTONY, FR

72 Inventor/es:
POMPON, DENIS;
DUMAS, BRUNO y
SPAGNOLI, ROBERTO

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 390 588 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

Cepas de levadura que producen colesterol y sus aplicaciones

La presente invención se refiere a la producción de colesterol en organismos del reino de los hongos.

5 El colesterol (véase la figura 1) es el estero animal más importante. Es un componente fundamental de las membranas celulares, de las que controla la fluidez, y está presente en todos los tejidos animales y especialmente en el tejido nervioso.

El colesterol es un producto de importante interés industrial. Así, se utiliza comúnmente en la industria cosmética. Se utiliza igualmente en la industria farmacéutica, por ejemplo en la administración de medicamentos («Drug delivery»), así como en cultivos celulares.

10 El colesterol se utiliza también en la síntesis industrial de la vitamina D₃. Esta vitamina se utiliza para complementar los alimentos humanos (en los productos lácteos, por ejemplo) y animales. El colesterol se utiliza igualmente de forma ventajosa como aditivo en alimentos animales, principalmente en alimentos destinados a gambas de criadero.

15 Actualmente, la inmensa mayoría del colesterol comercializado se extrae a partir de tejido animal (una cantidad ínfima se produce por síntesis química). Para la extracción del colesterol se utilizan dos fuentes principales: la médula espinal de bovinos y la lanolina que es la grasa natural de la lana de cordero.

20 La utilización de tejido animal como producto de partida presenta problemas. Así, los problemas recientes unidos a la transmisión del prión responsable de la tembladera de los corderos a los bovinos [enfermedad denominada en los bovinos encefalopatía espongiforme bovina (BSE por sus iniciales en inglés: Bovine Spongiform Encephalopathy)] han recordado la necesidad de prudencia durante la utilización de tejido animal como materia prima. Sin embargo, a pesar de las medidas tomadas, el riesgo de transmisión del agente patógeno no puede excluirse totalmente. Sería por lo tanto extremadamente ventajoso disponer de una fuente de colesterol que no provenga de un tejido animal.

Xu, S. et al (1988) describen una cepa de levadura que presenta una mutación del gen *erg6* y en la que la enzima 24-C-metiltransferasa está inactivada. Esta levadura expresa las enzimas naturales 7-dehidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiestero Δ²⁴-reductasa. Produce trazas de colesterol.

25 La presente invención tiene como objetivo proporcionar una fuente de colesterol abundante y segura desde el punto de vista sanitario. Los inventores han mostrado de forma sorprendente que es posible desviar la producción natural de ergosterol en los hongos producir colesterol.

Descripción general de la invención

30 La invención se refiere a una cepa de levadura que produce de manera autónoma colesterol a partir de una cepa de carbono simple

caracterizada por que expresa las enzimas 7-dehidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiestero Δ²⁴-reductasa y en la que la enzima estero 24-C metiltransferasa se ha inactivado. Más particularmente, la invención se refiere a un organismo tal como se define anteriormente en el que la enzima C-22 estero desaturasa ha sido además inactivada.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa de levadura tal como se define anteriormente caracterizada por que la expresión de las enzimas 7-dehidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiestero A²⁴-reductasa se obtiene por transformación del organismo.

La invención se refiere igualmente a un organismo del reino de los hongos tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la desactivación de la enzima estero 24-C-metiltransferasa se realiza por desactivación génica y/o la desactivación de la enzima C-22-estero desaturasa se realiza por desactivación génica.

40 Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa de levadura tal como se ha definido anteriormente, caracterizada porque se elige entre el filum *Ascomycete*, más especialmente entre el sub-filum *Saccharomycotina*, todavía más especialmente entre la clase *Saccharomycetes* o *Schizosaccharomycetes*, todavía más especialmente entre el orden *Saccharomycetales* o *Schizosaccharomycetales*, todavía más especialmente entre la familia *Saccharomycetaceae* o *Schizosaccharomycetaceae*, todavía más especialmente entre el género *Saccharomyces* o

45 *Schizosaccharomyces*.
Otro aspecto de la invención se refiere a una levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*.

50 La invención se refiere igualmente a un procedimiento de producción de colesterol de origen no animal que comprende el cultivo de un organismo tal como se ha definido anteriormente. Más especialmente, este procedimiento se caracteriza porque la etapa de cultivo del organismo es seguida por una etapa de extracción del colesterol. De forma preferida, la extracción del colesterol se realiza mediante un disolvente no miscible con el agua.

Más especialmente, el procedimiento tal como se ha definido anteriormente, se caracteriza porque se realiza una etapa de saponificación antes de la extracción del colesterol. Aún más especialmente, el procedimiento tal como se ha definido anteriormente se caracteriza porque se realiza una etapa de triturado mecánico de las células antes de la saponificación o la extracción del colesterol.

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de una cepa de levadura tal como se ha definido anteriormente para la producción de colesterol o de uno de sus intermedios metabólicos o de una mezcla de esteroides marcada con ^{13}C o con ^{14}C .

La invención se refiere igualmente a un procedimiento de producción de colesterol o de uno de sus intermedios metabólicos o de una mezcla de esteroides marcada con ^{13}C o con ^{14}C que comprende las etapas siguientes:

- 10
- cultivo de un organismo del reino de los hongos tal como se ha definido anteriormente sobre un sustrato marcado con ^{13}C o con ^{14}C y,
 - extracción de dicho colesterol, o de uno de sus intermedios metabólicos o de la mezcla de esteroides.

15 La invención se refiere igualmente a un procedimiento de fabricación de una mezcla isotópica de colesterol, de intermedios o de metabolitos de colesterol, marcados en diferentes posiciones mediante marcadores isotópicos, que comprende el cultivo de un organismo del reino de los hongos tal como se ha definido anteriormente sobre un sustrato marcado y luego sobre un sustrato no marcado, eligiéndose la duración del cultivo sobre cada uno de estos sustratos con el fin de obtener un perfil isotópico definido.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se refiere a la producción de colesterol en organismos del reino de los hongos. En los hongos, no se encuentra colesterol natural, siendo este último un esteroide animal. El esteroide mayoritario de las membranas celulares de estos organismos es el ergosterol.

25 La presente invención permite realizar la síntesis del colesterol, por la multiplicación de las levaduras, en presencia de una fuente de carbono sencilla. El método propuesto por la presente invención permite por lo tanto obtener una cantidad grande de colesterol, con un coste pequeño, ya que el procedimiento utiliza el cultivo de organismos del reino de los hongos y la adición de una fuente de carbono sencilla, fácilmente disponible en el comercio.

Por fuente de carbono sencilla, según la presente invención, se entienden las fuentes de carbono utilizables por el experto en la técnica para el crecimiento normal de una levadura. Se entiende designar principalmente los diferentes azúcares asimilables, tales como glucosa, galactosa o sacarosa, o las melazas, o los subproductos de estos azúcares. Una fuente de carbono sencilla muy particularmente preferida es el etanol y el glicerol.

30 El hecho de que la producción se realice de forma autónoma significa que no es necesario añadir sustratos para obtener el colesterol, sino que el organismo puede producirlo a partir únicamente de la fuente de carbono sencilla de partida. También está claro que la cepa puede producir el colesterol, mediante la utilización de un sustrato situado anteriormente en la vía metabólica, en la medida en que la cepa del organismo según la presente invención contenga todos los genes necesarios para la terminación de la vía metabólica de producción del colesterol.

35 La invención se refiere particularmente a una levadura genéticamente modificada que produce de manera autónoma colesterol a partir de una fuente de carbono simple.

40 Se pueden realizar una serie de modificaciones genéticas de la levadura con el fin de desviar la vía metabólica natural de producción del ergosterol hacia la producción de colesterol. La presente invención se refiere también a una levadura genéticamente modificada que expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β -hidroxisterol $\Delta 24$ -reductasa. La cepa de levadura así modificada produce colesterol. En efecto, la solicitante ha podido realizar un modelo, gracias a los resultados obtenidos, (véase la parte de los ejemplos de la presente solicitud), la vía metabólica que conduce al ergosterol y a algunos de sus derivados (véase la figura 2). La expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β -hidroxisterol $\Delta 24$ -reductasa en el hongo *S. cerevisiae* puede permitir la producción de colesterol, desviando una parte de la biosíntesis del ergosterol.

45 La enzima 7-deshidrocolesterol reductasa tiene el número EC: 1.3.1.21 en la clasificación internacional de enzimas (Enzyme Classification). Se denomina igualmente delta-5,7-esterol-delta-7-reductasa, 7-DHC reductasa o esteroide delta-7-reductasa y se denominará igualmente Delta-7 esteroide reductasa, Delta-7Red, Delta 7 Reductasa o $\Delta 7$ -reductasa en la parte siguiente de este documento. Esta enzima cataliza en estado natural, por ejemplo en plantas, la reducción NADPH dependiente del delta 5, 7-colestadienol en delta 5 colestenoil o la reducción de intermedios esteroides que presentan doble enlace en 7-8 (Taton y Rahier, 1991). El gen que codifica para la enzima 7-deshidrocolesterol reductasa ha sido aislado por primera vez en la planta *Arabidopsis thaliana*, el aislamiento del gen correspondiente y la expresión de esta enzima en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido descrita en la patente EP0727489. Las secuencias de este gen y de la proteína son accesibles con el número de entrada GenBank siguiente: U49398 (Lecain et al., 1996).

Se han descrito una serie de homólogos de este gen en otras especies. Se trata por ejemplo del gen homólogo en el hombre (cuya secuencia de nucleótidos es accesible con el número GenBank AF034544, la secuencia proteica de número GenBank: AAC05086) (Moebius et al., 1998). Del gen homólogo en la rata *Rattus norvegicus* (cuya secuencia de nucleótidos es accesible con el número GenBank: AB016800, la secuencia proteica con el número GenBank: BAA34306). Se han identificado igualmente en la gallina *Gallus gallus* con la referencia Genbank BM490402 o en el sapo *Xenopus laevis* con la referencia Genbank B1315007 o el pez cebra *Danio rerio* con la referencia Genbank BQ132664. Se encuentra igualmente un gen que codifica para la actividad delta7 esteroil reductasa en plantas como el arroz *Oryza sativa* con la referencia Genbank CA753545, la patata *Solanum tuberosum* con la referencia Genbank BF342071. Este gen que codifica para la actividad delta7 esteroil reductasa puede encontrarse igualmente en la protista *Mastigomoeba balamuthi* con la referencia Genbank BE636562.

El experto podrá aislar fácilmente otros genes homólogos que codifican para la enzima 7-deshidrocolesterol reductasa en otros organismos. Podrá principalmente referirse al método de clonación descrito en el ejemplo 1 de la patente EP0727489, que describe un método de clonación que permite aislar un ADNc que codifica para una proteína que tiene una actividad delta-5,7-esteroil-delta-7-reductasa. El experto podrá determinar fácilmente la actividad de la 7-deshidrocolesterol reductasa de las proteínas correspondientes, utilizando principalmente el ensayo de actividad igualmente descrito en el ejemplo de la patente EP0727489.

La expresión de la enzima 7-deshidrocolesterol reductasa en un organismo del reino de los hongos según la invención se puede obtener por cualquier método conocido por el experto. Se puede tratar en particular de la transformación del organismo por una construcción que contiene una casete de expresión constituida por la enzima 7-deshidrocolesterol reductasa y de un terminador de transcripción adaptado según las reglas habituales conocidas por el experto. Como promotor homólogo se utilizará en general un promotor adecuado para permitir una expresión suficiente y funcional de la proteína heteróloga. El promotor puede ser, por ejemplo, el promotor PGK, el promotor ADH, el promotor CYC1, el promotor GAL10/CYC1, el promotor TDH3 o el promotor TPI. El terminador puede ser, por ejemplo, el terminador del gen de la fosfoglicerato cinasa (PGK). Dicha casete de expresión puede integrarse en forma de una o de varias copias en el genoma nuclear o mitocondrial del huésped, o estar contenida en una estructura artificial del tipo cromosoma artificial de levadura (YAC) o estar contenido en un elemento genético episómico como un plásmido. Para realizar este tipo de expresión se pueden utilizar por ejemplo levaduras del tipo *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* o *Pichia pastoris*.

Preferentemente, la enzima 7-deshidrocolesterol reductasa expresada es la enzima de la planta *Arabidopsis thaliana* (un ejemplo del modo de expresión de esta enzima en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido descrito en la patente EP0727489). Sin embargo, se puede tratar de cualquier enzima homóloga o no, natural o artificial, que presente la misma actividad enzimática.

La enzima 3 β -hidroxiesteroil Δ 24-reductasa, igualmente denominada DHCR24 o 24-deshidrocolesterol reductasa, cataliza en estado natural la reducción del desmosteroil (colesta 5, 24 dienoil) o de los derivados del lanosterol que posee un doble enlace en 24-25 en la cadena lateral (por ejemplo el 14 desmetil-lanoesteroil, el cimosterol o el colesta-7, 24-dienoil), reducción necesaria principalmente para la biosíntesis del colesterol en humanos (Waterham H. R. et al., 2001). Esta enzima se denominará igualmente 24-(25) esteroil reductasa, delta 24 esteroil reductasa o Δ 24-reductasa en la parte restante este documento.

El gen que codifica para la enzima 3 β -hidroxiesteroil Δ 4-reductasa ha sido aislado por primera vez en humanos, el aislamiento del gen correspondiente y la expresión de esta enzima en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido descrita en la publicación Waterham H. R. et al., 2001. Las secuencias de este gen y de la proteína son accesibles con los números de entrada GenBank siguientes: NM_014762 y NP_055577.

Se han descrito una serie de homólogos de este gen en otras especies. Se trata por ejemplo del gen homólogo en el ratón (*Mus musculus*) (cuya secuencia de nucleótidos es accesible con el número GenBank: NM_053272 y la secuencia proteica con el número GenBank: NP_444502). Se han descrito homólogos en el gusano *Caenorhabditis elegans* y principalmente un ADN complementario con la referencia Genbank AF026214. Se han descrito igualmente secuencias homólogas en plantas como el algodón *Gossypium hirsutum* con la referencia Genbank AAM 47602.1, el arroz *Oryza sativa* con la referencia Genbank AAP53615 y el guisante *Pisum sativum* con la referencia Genbank AAK15493.

El experto podrá aislar fácilmente otros genes homólogos que codifican para la enzima 3- β hidroxiesteroil Δ 24-reductasa en otros organismos. Se podrá referir principalmente al método de clonación descrito en la publicación Waterham H. R. et al., 2001. El experto en la materia podrá igualmente fácilmente determinar la actividad 3- β -hidroxiesteroil Δ 24-reductasa de las proteínas correspondientes particularmente utilizando el ensayo de actividad igualmente descrito en la publicación (Waterham et al., 2001).

La expresión de la enzima 3 β -hidroxiesteroil Δ 24-reductasa en una levadura según la invención puede obtenerse por cualquier medio conocido por el experto en la materia. Se puede tratar en particular de los medios descritos anteriormente en lo que se refiere a la expresión de la enzima 7-deshidrocolesterol reductasa.

Preferentemente, la enzima 3 β -hidroxiestero Δ 24-reductasa expresada es la enzima humana. Un ejemplo de aislamiento del gen correspondiente y de la expresi3n de esta enzima en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se describe en la publicaci3n Waterham H. R. et al., 2.001. Sin embargo, se puede tratar de cualquier enzima hom3loga o no, natural o artificial, que presente la misma actividad enzim3tica.

- 5 Ventajosamente, las levaduras seg3n la presente invenci3n expresan las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiestero Δ 24-reductasa y presentan adem3s una desactivaci3n de la enzima estero Δ 24-C-metiltransferasa.

La enzima estero Δ 24-C-metiltransferasa tiene el n3mero EC-2.1.1.41 en la clasificaci3n internacional de enzimas (*Enzyme Classification*). Tambi3n se denomina ERG6p, Delta(24)-metiltransferasa, Delta(24)-estero Δ 24-C-metiltransferasa, Zimosterol-24-metiltransferasa, S-adenosil-4-metionina:estero Δ 24-C-metiltransferasa; SMT1, 10 24-estero Δ 24-C-metiltransferasa, S-adenosil-L-metionina:delta(24(23))-estero Δ 24-C-metiltransferasa o Fitosterol metiltransferasa. Esta enzima cataliza en estado natural la metilaci3n en C-24 del cimosterol que lleva a la formaci3n del fecosterol

El gen que codifica para la enzima estero Δ 24-C-metiltransferasa se ha denominado *Erg6* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia de este gen es accesible con el n3mero de entrada GenBank siguiente: NC_001145. La secuencia de la prote3na correspondiente es accesible con el n3mero de entrada GenBank 15 siguiente: NP_013706 (Bowman et al., 1997), (Goffeau et al., 1996).

Se han descrito una serie de hom3logos de este gen en otros hongos. Se trata por ejemplo del gen hom3logo en la *Schizosaccharomyces pombe* (cuya secuencia de nucle3tidos es accesible con el n3mero GenBank Z99759 y la 20 secuencia proteica con el n3mero GenBank: CAB16897) (Wood et al., 2002). Del gen hom3logo en la *Neurospora crassa* (cuya secuencia de nucle3tidos es accesible con el n3mero GenBank: NCB24P7 y, la secuencia proteica con el n3mero GenBank: CAB97289). Del gen hom3logo en la *Candida albicans* (cuya secuencia de nucle3tidos es accesible con el n3mero GenBank: AF031941 y la secuencia proteica con el n3mero GenBank: AAC26626) (Jensen-Pergakes et al., 1998). Se han descrito igualmente genes que codifican una enzima hom3loga ERG6 en *Candida lusitanae* con la referencia Genbank AA021936.1 e igualmente en *Pneumocystis carinii* (Kaneshiro et al., 2002) o en 25 *Kluyveromyces lactis* (Ozier-Kalogeropoulos et al., 1998).

El experto podr3 aislar f3cilmente otros genes hom3logos del gen *Erg6* en los organismos del reino de los hongos. El experto podr3 igualmente determinar f3cilmente la actividad de la estero Δ 24-C-metiltransferasa de las prote3nas correspondientes utilizando principalmente como ensayo de actividad la complementaci3n funcional de una cepa de 30 levadura con ruptura por estos genes. La complementaci3n se eval3a entonces por la formaci3n de esteroides ramificados en la posici3n 24, en particular esteroides de tipo ergosta- que contienen un grupo metileno en posici3n 24-28. La presencia de una actividad biol3gica estero Δ 24-C-metiltransferasa de tipo ERG6 ser3 igualmente determinada *in vitro* gracias a las t3cnicas desarrolladas por (McCammon et al., 1984) o por Taylor et Parks (Taylor y Parks, 1978). Por otra parte, los esteroides producto y sustrato de la enzima ERG6 se separar3n por cromatograf3a en fase gaseosa seg3n la t3cnica desarrollada por Nes en (Methods in Enzymology Steroids and Isoprenoids Vol3men 35 111 parte B, 1.985 «A comparison of Methods for the Identification of Sterols» pp3-37).

La cepa de levadura seg3n la presente invenci3n que expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiestero Δ 24-reductasa y que presenta adem3s una desactivaci3n de la enzima 24-C-metiltransferasa produce 40 colesterol. La solicitante ha podido determinar en efecto que, de forma sorprendente, la desactivaci3n de la enzima estero Δ 24-C-metiltransferasa bloquea la v3a de bios3ntesis anterior del ergosterol y permite una producci3n aumentada de colesterol por la cepa de levadura (v3ase la parte experimental de la presente solicitud).

La expresi3n de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiestero Δ 24-reductasa se realiza como se describe a continuaci3n.

La inactivaci3n de la enzima estero Δ 24-C-metiltransferasa se puede realizar por cualquier medio conocido por el 45 experto. Se puede tratar en particular de la introducci3n por mutag3nesis de una mutaci3n sin sentido, de una inserci3n o una delecci3n que provoca un cambio del marco de lectura en el gen que codifica dicha prote3na.

Se puede tratar igualmente de la expresi3n de un ARN antisentido complementario del ARN mensajero que codifica dicha prote3na o del sistema de extinci3n g3nica conocido por el experto con el nombre de ARNi (*small interfering RNA*) y de los sistemas enzim3ticos asociados si aquellos no existen de forma natural en el hu3sped. La mutag3nesis puede efectuarse en la secuencia codificadora o en una secuencia no codificadora de manera que 50 inactive la prote3na codificada o impida su expresi3n o su traducci3n. La mutag3nesis puede efectuarse *in vitro* o *in situ*, por supresi3n, sustituci3n, delecci3n y/o adici3n de una o varias bases en el gen considerado o por desactivaci3n g3nica.

Se puede tratar en particular de la introducci3n de un ADN ex3geno en la secuencia codificadora o promotora (por ejemplo un casete de expresi3n con un promotor y/o terminador hom3logo y una parte codificadora heter3loga). La casete de expresi3n permite ventajosamente la expresi3n de un marcador de selecci3n. Igualmente es posible 55 modificar el promotor del gen con el fin de reducir el nivel de expresi3n. Para los hongos, la desactivaci3n se hace igualmente por interrupci3n de la secuencia codificadora con un gen marcador heter3logo u hom3logo. Las principales t3cnicas para interrumpir un gen de los hongos se describen en el art3culo de Johnston et al (2.002)

(Methods in Enzymology Volúmen 350 Editado por Christine Guthrie y Gerry Fink ; «Gene Disruption» ; M. Johnston, L. Riles, J. Hegemann pp290-315).

Ventajosamente, las levaduras según la presente invención expresan las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa y presentan además una desactivación de la enzima C-22-esterol-desaturasa.

- 5 La enzima C-22-esterol desaturasa se denomina igualmente ERG5p, Cyp61, citocromo p-45061 y esterol delta-22-desaturasa. Esta enzima cataliza en estado natural la conversión del ergosta-5,7,24(28)-trienol en ergosta-5,7,22,24(28)-tetraenol añadiendo un doble enlace en la posición C22 (véase la figura 2).

10 El gen que codifica para la enzima enzima C-22-esterol desaturasa se ha denominado *Erg5* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia de este gen es accesible con el número de entrada GenBank siguiente: U34636. La secuencia de la proteína correspondiente es accesible con los números de entrada GenBank siguientes: AAB06217 (Skaggs et al., 1996) o P54781 (Bowman et al., 1997).

15 Se han descrito una serie de homólogos de este gen en otros hongos. Se trata por ejemplo del gen homólogo en la *Schizosaccharomyces pombe* (cuya secuencia de nucleótidos es accesible con el número GenBank Z98974 y la secuencia proteica con el número GenBank: CAB11640) (Wood et al., 2002). Del gen homólogo en la *Symbiotaphrina buchneri* (cuya secuencia de nucleótidos es accesible con el número GenBank: AB086896 y la secuencia proteica con el número GenBank: BAC01142) (Noda y Koizumi, 2003). Del gen homólogo en la *Symbiotaphrina kochii* (cuya secuencia de nucleótidos es accesible con el número GenBank: AB086890 y la secuencia proteica con el número GenBank: BAC01139) (Noda y Koizumi, 2003). Del gen homólogo en la *Candida albicans* (cuya secuencia de nucleótidos es accesible con el número GenBank: AL033396 y la secuencia proteica con el número GenBank: CAA21953) (Tait et al., 1997). El gen ERG5 se ha descrito igualmente en la *Candida lusitanae* con la referencia Genbank AAO48601.

20 El experto podrá aislar fácilmente otros genes homólogos del gen *Erg5* en los organismos del reino de los hongos. El experto podrá igualmente determinar fácilmente la actividad C-22-esterol desaturasa de las proteínas correspondientes, principalmente utilizando el ensayo de actividad descrito por Skaggs, B. A., et al., 1.996. Esta actividad podrá igualmente evidenciarse por el enriquecimiento funcional de una levadura *S. cerevisiae* previamente rota al nivel del gen *erg5*. Este enriquecimiento se evidenciará por la presencia en la cepa enriquecida de ergosta-5,7,22-trienol. La actividad C-22 esterol desaturasa se puede medir *in vitro* utilizando el método descrito por Kelly y Baldwin et al JBC (1997) después de la lisis de las levaduras (Kelly et al., 1997).

25 La cepa de levadura según la presente invención que expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa y que presenta además una desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa produce colesterol. La solicitante ha podido determinar en efecto que la desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa bloquea ventajosamente la conversión del colesterol en colest-5, 22-dienol y permite una estabilización de la producción de colesterol (véase la parte experimental de la presente solicitud). Este bloqueo interviene también a nivel de la conversión del colest-5,7-dienol, un precursor del colesterol en colest-5,7,22-trienol, un precursor del colest-5,22-dienol. De forma sorprendente, la enzima C-22-esterol desaturasa acepta, en efecto, como sustrato el colesterol que ella convierte en colest-5, 22-dienol. Esta reacción parásita se puede eliminar por desactivación de la enzima 22-esterol desaturasa, tal como ha podido ser determinado por la demandante.

30 La expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa se realiza como se describe a continuación. La desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa se puede realizar por cualquier medio conocido por el experto. Se puede tratar en particular de los métodos descritos anteriormente que se refieren a la desactivación de la enzima esterol 24-C-metiltransferasa.

35 Ventajosamente, las levaduras según la presente invención expresan las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa y presentan además una desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa y una desactivación de la enzima esterol 24-C-metiltransferasa. Estas cepas presentan en efecto las ventajas acumuladas de las dos desactivaciones y son cepas productoras de colesterol.

40 La expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa y la desactivación de las enzimas C-22-esterol desaturasa y esterol 24-C-metiltransferasa se realizan como se ha descrito anteriormente.

45 En un modo de realización, el colesterol está presente en la cepa del organismo según la presente invención en una proporción superior a 20%, preferentemente a 35% y de forma más preferida a 50% o más del total de los esteroides producidos por la cepa según la invención (principalmente los intermedios de síntesis).

50 Preferiblemente, las levaduras se eligen entre el filum Ascomycetes, de forma más preferida se eligen del sub-filum Saccharomycotina, de forma aún más preferida se eligen de la clase *Saccharomycetes* o *Schizosaccharomycetes*, de forma aún más preferida se eligen del orden *Saccharomycetales* o *Schizosaccharomycetales*, de forma aún más preferida se eligen de la familia *Saccharomycetaceae* o *Schizosaccharomycetaceae*, de forma aún más preferida se eligen del género *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, de forma completamente preferida los organismos del reino de los Hongos según la invención pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*.

La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento de producción de colesterol de origen no animal que comprende las etapas siguientes:

- se cultiva una levadura tal como se describe anteriormente,
- extraer el colesterol producido por este organismo.

5 La extracción se basa en el tratamiento de la levadura con un disolvente del colesterol preferentemente no miscible con el agua. Este tratamiento puede asociarse preferentemente con un método cualquiera de triturado mecánico de las células. Más preferentemente la levadura se tratará antes de la extracción con el disolvente, con una mezcla de saponificación destinada a liberar el colesterol opcionalmente unido a otros componentes celulares, como en particular los ácidos grasos. Esta mezcla de saponificación podrá estar constituida por una base, por ejemplo
10 amoníaco, sosa o potasa disuelta en agua o más preferentemente en un disolvente orgánico en agua como por ejemplo metanol o etanol o una mezcla disolvente-agua. La saponificación se podrá realizar sin o preferentemente con calentamiento a una temperatura de 60-120°C, a presión atmosférica o a baja presión. La extracción con el disolvente no miscible con el agua podrá reemplazarse por una extracción en fase sólida sobre una resina hidrófoba. Un método de extracción de los esteroides ha sido descrito por L. Parks et al. (1.985) (Methods in Enzymology 111 Editado por L Rilling, L. Parks, C. Bottema, R. Rodriguez y Thomas Lewis pp333-339).

El colesterol bruto así obtenido se podrá purificar por cualquier método conocido por el experto, en particular el descrito por Boselli E., Velazco V., Caboni M. F. y Lercker G. J Chromatogr A. 2.001 May 11; 917 (1-2): 239-44.

Igualmente se podrán utilizar otros métodos como el descrito para la extracción del colesterol a partir de la lana de cordero. El experto podrá principalmente referirse a los métodos descritos en las patentes estadounidenses US-2.688.623 o US-2.650.929 o en las patentes británicas GB690.879, GB646.227 o GB613.778.

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de cepas según la presente invención con el fin de obtener el colesterol o uno de sus intermedios metabólicos, o una mezcla de esteroides marcada. Se entiende por intermedio metabólico del colesterol principalmente los esteroides especificados en la figura 2. Se puede tratar principalmente de
25 colest-8,24(25)-dienol, colest-7, 24(25)-dienol, colest-5,7,24(25)-trienol, colest-5,24(25)-dienol y colest-5,22-dienol.

El principio de la obtención de un colesterol marcado se describe en la figura 10. Esta manipulación consiste, en primer lugar, en hacer crecer la levadura sobre un sustrato totalmente marcado. Las células se cultivan a continuación en un sustrato no marcado. Hay así un cambio de marcación isotópica de la fuente de carbono y sigue la síntesis *de novo* de intermedios metabólicos y luego de esteroles, incluyendo el colesterol, que comprende un
30 cambio progresivo de marcación. Se trata por lo tanto de un perfil complejo, pero perfectamente determinable experimentalmente, que representa una firma isotópica única que depende a la vez:

- 1) del protocolo de marcación y en particular de la duración y de las condiciones de cultivo en el sustrato marcado y no marcado,
- 2) de la estructura genética precisa de la cepa utilizada, y
- 35 • 3) del tiempo preciso de finalización de los cultivos.

Una vez que se finaliza el cultivo (por ejemplo por lisis celular o por finalización del cultivo en presencia de una concentración sub-lethal de productos antifúngicos citotóxicos o citoestáticos), el colesterol marcado o uno de sus intermedios metabólicos, o una mezcla de esteroides marcados, se extrae y se purifica como se ha descrito anteriormente.

40 El perfil isotópico del colesterol marcado o de uno de sus intermedios metabólicos o de la mezcla de esteroides marcados tiene varias propiedades únicas:

- 1) se puede modular a voluntad actuando sobre las condiciones de cultivo, la cepa utilizada y el esteroles elegido. Se puede producir por lo tanto un registro de marcadores único.
- 2) Se puede combinar, a saber, que varias firmas isotópicas correspondientes a varios esteroides únicos
45 marcados por perfiles isotópicos ellos mismos modulables, se pueden combinar para formar un "alfabeto molecular".
- 3) Es reproducible y fácil de determinar experimentalmente.
- 4) Corresponde a una mezcla molecular marcadora fácil de aislar, estable, incolora e inodora, no volátil, no tóxica y que se puede incorporar a alimentos, medicamentos, aditivos o a otros productos asimilables por el hombre.

- 5) Es infalsificable, salvo que se disponga de las cepas recombinantes específicas y de condiciones muy precisas de marcación, de cultivo y de extracción. Además el conocimiento de la firma isotópica no permite rehacer los parámetros que han permitido producirla.

Así, gracias a la presente invención se puede obtener fácilmente un «alfabeto isotópico» infalsificable, de utilización general y que se puede incorporar en cualquier tipo de productos, incluso consumibles. Las «palabras isotópicas» que se pueden constituir a partir de tal alfabeto tienen un número casi ilimitado sacando provecho a la vez los perfiles de marcación y los diferentes tipos de esteroides. La incorporación de tales firmas en el seno de productos muy variados constituye por lo tanto un método único de marcación infalsificable, contrariamente por ejemplo a las firmas de ADN que pueden reproducirse una vez que se conocen. Por otro lado, la firma se puede leer de forma no destructiva, por ejemplo por ionización láser seguida de análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF o similar).

La utilización de un sustrato marcado con ^{13}C en el lugar y sitio de las fuentes de carbono no marcado por el cultivo de las levaduras según la invención permite la síntesis de esteroides y en particular de colesterol muy marcado (que comprende al menos 95% de átomos de carbono ^{13}C). Igualmente es posible, mediante la misma estrategia, la preparación de esteroides y de colesterol radiactivo por ^{14}C . El procedimiento se puede así incorporar a cepas de levaduras que producen esteroides y principalmente hidrocortisona (véase la solicitud de patente WO 02/061.109) para producir esteroides marcados con ^{13}C o con ^{14}C , por ejemplo para ensayos RIA.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Fórmula química del colesterol, así como nomenclatura utilizada generalmente para la numeración de los diferentes átomos de carbono y el nombre de los diferentes ciclos. Los cuatro ciclos de la molécula de colesterol se denominan respectivamente A, B, C y D y los átomos de carbono se numeran de 1 a 27.

Figura 2: Esquema simplificado de la parte posterior de la vía de síntesis de los esteroides de tipo ergosta- y colesta- en las levaduras naturales o modificadas. El esquema no es exhaustivo pero permite definir las etapas en las que intervienen las enzimas citadas en este documento. Las proteínas ERG2p, ERG3p, ERG5p y ERG6p son proteínas de hongos o de levadura, mientras que las proteínas Delta-7Red (Delta-7-esterol reductasa) y Delta-24-(25)Red (Delta-24-(25)esterol reductasa) son proteínas heterólogas originadas por mamíferos o plantas.

Figura 3: Perfil comparativo por HPLC con detección UV a 206 nm de los esteroides libres de las cepas derivadas de la cepa BMA64 e identificación de estos esteroides. Las cepas estudiadas son las siguientes: WGIF01 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* (véase ejemplo 1), WGIF02 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la $\Delta 24$ -reductasa, ejemplo 12), WGIF03 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la $\Delta 7$ -reductasa, ejemplo 13), WGIF04 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la $\Delta 7$ -reductasa y la $\Delta 24$ -reductasa, ejemplo 14). C5 : colest-5-enol (colesterol) ; C5,22: colest-5,22-dienol; C5, 24: colest-5,24-dienol (desmosterol); C8,24: colest-8,24-dienol (cimosterol); C5, 7,22: colest-5,7,22-trienol; C5.7, 24: colest-5,7,24-trienol; C5, 22,24: colest-5,22,24-trienol; C5, 7,22,24: colest-5,7,22,24-tetraenol; lan: lanosterol.

Figura 4: Perfil comparativo por HPLC con detección UV a 206 nm de los esteroides libres de la cepa WGIF04 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la $\Delta 7$ -reductasa y la $\Delta 24$ -reductasa, ejemplo 14) después de 0, 2, 4, 8, 24 horas de inducción con galactosa. Δ : cepa WGIF01 (ejemplo 1). Para la cepa WGIF04, las tomas de muestra se realizan 0, 2, 4, 8 y 24 horas después del vertido de la fuente de carbono en galactosa. El perfil de la cepa BMA64 que contiene la ruptura del *erg6* (WGIF01) presentada es el obtenido inmediatamente después del vertido en galactosa. Este perfil prácticamente no cambia durante el transcurso de la inducción (0-24 horas). La señal de absorción a 206 nm corresponde a coeficientes de absorción variables de un esteroide a otro. C5.: colest-5-enol (colesterol) ; C5,22: colest-5,22-dienol; C5, 24: colest-5,24-dienol (desmosterol); C8,24: colest-8,24-dienol (cimosterol); C5, 7,22: colest-5,7,22-trienol; C5.7, 24: colest-5,7,24-trienol; C5, 22,24: colest-5,22,24-trienol; C5, 7,22,24: colest-5,7,22,24-tetraenol; lan: lanosterol.

Figura 5: Perfil comparativo por HPLC con detección por electropulverización con ionización positiva (espectrometría de masas) de los esteroides libres de la cepa WGIF04 (ejemplo 14) después de 0, 2, 4, 8 y 24 horas de inducción con galactosa. Δ : cepa WGIF01. C5 : colest-5-enol (colesterol) ; C5,22: colest-5,22-dienol; C5, 24: colest-5,24-dienol (desmosterol); C8,24: colest-8,24-dienol (cimosterol); Los perfiles de HPLC provienen de los mismos ensayos que los de la figura 4.

Figure 5A (izquierda) : detección a $m/z = 367$, Figura 5B (derecha) $m/z = 369$. Ordenada: número de iones detectados/segundo Abscisa: duración de la elución en minutos.

Figura 6: Detalle del perfil a $m/z = 369$ por HPLC para las tres cepas: WGIF01, CA10 que contiene el plásmido de expresión para la delta-24-esterol reductasa y para la WGIF04, el colesterol se inyecta como patrón interno. Las cantidades de esteroides totales inyectados para las tres cepas corresponden a extracciones a partir de cantidades idénticas de cultivos medidos por absorbancia a 600 nm.

Figura 7: Perfiles comparativos de los esteroides totales (libres y esterificados) por cromatografía en fase gaseosa de las cepas WGIF01 (deleción del *erg6*), WGIF02 (deleción del *erg6* con expresión de la $\Delta 24$ -reductasa), WGIF03

(delección del *erg6* con expresión de la $\Delta 7$ -reductasa), WGIF04 (delección del *erg6* con expresión de la $\Delta 24$ -reductasa y de la $\Delta 7$ -reductasa) y CA10 pYES_Delta24 (fondo genético FY1679, delección del *erg5* con expresión de la $\Delta 24$ -reductasa, $\Delta 7$ reductasa y *erg5*). Las escalas de respuesta (corrientes de ionización de llama) son arbitrarias. Los perfiles no se pueden comparar de forma cualitativa de una cepa a otra. La escala de tiempos de retención es, sin embargo, la misma para todas las cepas (los tiempos de retención se expresan en minutos). La identificación de los esteroides se realiza según los criterios descritos en la presente invención.

Figura 8: Reparto cuantitativo de los principales esteroides libres en las cepas de levadura [BMA64 (figura 8A), WGIF01 (figura 8B), WGIF02 (figura 8C) y WGIF03 (figura 8D)] evaluada en base a los espectros UV. El reparto se da en % del total de las especies representadas en la figura y son las únicas detectables en cantidades apreciables. En ausencia de patrones para varios de los esteroides intermedios, la cuantificación se realiza en base a los espectros UV asociados con cada uno de los picos del cromatograma por HPLC utilizando los coeficientes de absorción evaluados dados a continuación (véase la tabla 1, los coeficientes de absorción se expresan en mM por litro y por cm.). Para hacer esto, los coeficientes de absorción correspondientes a los restos estructurales insaturados presentes en la estructura de un esteroide dado se buscan en la tabla 1 y opcionalmente se suman (si hay varios restos presentes en una misma molécula) para proporcionar una evaluación del coeficiente de extinción de cada tipo de esteroide. La evaluación se realiza utilizando los valores a 280 nm si hay presente al menos un resto que absorba a esta longitud de onda, en su defecto se utiliza la longitud de onda a 235 nm y, a falta de absorción a esta última, se utiliza la longitud de onda a 206 nm para evaluar las concentraciones de cada uno de los esteroides a partir de las señales de absorción respectivas por HPLC.

Figura 9: Reparto cuantitativo de los principales esteroides libres en la cepa de levadura WGIF4 evaluado en base a los espectros UV. Las cuantificaciones se realizan de la forma descrita en la figura 8.

Figura 10: Principio de marcación isotópica de los esteroides por sustitución de las fuentes de carbono.

Figura 11: Evaluación de los perfiles de marcación isotópica del colesterol producido por la cepa WGIF04 después de 4, 8 y 24 horas de inducción. Los esteroides libres se extraen y se separan por HPLC como se ha descrito. Se adquiere un espectro de masas entre los valores de $m/z = 300$ y $m/z = 450$ cada 0,2 segundos durante la elución. Estos espectros se promedian entonces en ventanas de 1,8 segundos y luego se someten a una regresión multilínea utilizando como base de regresión un conjunto de 24 vectores que representan las distribuciones de masa teóricas del colesterol marcado por una incorporación al azar mediante tiradas independientes de carbono 13 en cada una de las 27 posiciones de la molécula con una probabilidad de marcación sobre cada átomo de carbono variable entre 0 y 1, según el vector considerado. Las probabilidades de marcación de los diferentes vectores utilizados como base se eligen de forma tal que el coeficiente de correlación cruzada de las distribuciones de dos vectores consecutivos de la base sea 0,92, iniciando la base con un vector correspondiente a una probabilidad de presencia de 100% en todas las posiciones para el carbono 12. El ajuste multilínea se realiza según un criterio estadístico del mínimo cuadrado anulando los términos no diagonales de la matriz de los productos de las derivadas parciales del método de Gauss (filtración numérica máxima). Después del análisis, los espectros de masa se reconstruyen entonces sobre la base optimizada. Las curvas representadas en las figuras representan por lo tanto el resultado de la reconstrucción filtrada óptima después de normalización de la amplitud máxima al valor 100.

Para cada tiempo de inducción, las dos curvas representan dos perfiles independientes que corresponden a tiempos de elución que difieren en 1,8 segundos y corresponden a espectros situados en la zona central del pico de elución del colesterol. La figura demuestra la gran reproducibilidad del análisis.

Figura 12: Ejemplo de diferentes firmas isotópicas al nivel de diferentes esteroides o de diferentes tiempos de inducción. Mismo cálculo y representación que para la figura 11, pero para diferentes esteroides y diferentes tiempos de inducción.

El valor de RT indica el intervalo de tiempos de retención utilizado para el cálculo (en minutos). Los valores de este intervalo son los siguientes:

Fig. 12 A : RT = 12,25 - 12,42,

Fig. 12 B : RT = 12,2 - 12,7,

Fig. 12 C : RT = 12,25 - 12,35,

Fig. 12 D : RT = 13,3 - 13,6,

Los tiempos de inducción son de 8 ó 24 horas.

Los valores de m/z indican el límite izquierdo y derecho de los valores de m/z . El valor más pequeño de m/z para cada cuadro corresponde al valor de m/z para el esteroide totalmente constituido por carbono 12.

Figura 13: Perfiles comparados de los esteroides totales (libres y esterificados) por cromatografía en fase gaseosa de las cepas YIM59/pIM303 (parte A de la figura) y de la cepa YIM59/pIM331 (parte B de la figura) (véase el ejemplo

18). Las escalas de respuesta son arbitrarias. La escala de tiempos de retención es la misma para las dos cepas (los tiempos de retención se expresan en minutos). La identificación de los esteroides se realiza según los criterios descritos en la presente invención.

5 La presente invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes que deben considerarse ilustrativos y no limitativos.

Las técnicas de biología molecular utilizadas son descritas por Ausubel *et al.*, algunas manipulaciones de levaduras son descritas por Adams *et al* (Adams y Holm, 1996).

EJEMPLO 1: Construcción de una cepa de levadura *S. cerevisiae* interrumpida en el gen *erg6* (cepa WGIF01):

10 Se ha obtenido la cepa de levadura *S. cerevisiae* WGIF01 cuyo gen *ERG6* está interrumpido por el gen *TRP1* por transformación de la cepa BM64 mediante un producto de PCR que contiene un gen funcional *TRP1* limitado por dos extremidades homólogas al gen *ERG6*.

15 La cepa BM64 (de genotipo *MAT α* ; *ura3-52*; *trp1 Δ 2*; *leu2-3_112*; *his3-11*; *ade2-1*; *can1-100*) es un derivado de la cepa de levadura *S. cerevisiae* W303 *MAT α* por delección total del gen *TRP1*. La cepa BMA64 y la cepa W303 *MAT α* se describen en la publicación de Baudin-Baillieu *et al* (Baudin-Baillieu *et al.*, 1997). Para aislar el gen *TRP1*, se ha amplificado el gen *TRP1* del plásmido pFL44 (Bonneaud *et al.*, 1991) utilizando la *Z-TaqI* (una ADN polimerasa ADN dependiente) suministrada por la compañía Takara (PanVera LLC 501 Charmany Drive Madison, WI 53719 USA). El par cebador utilizado permite la amplificación por la ADN polimerasa del gen *TRP1* limitado por secuencias correspondientes al gen *ERG6*. La secuencia de estos iniciadores es la siguiente:

OERG6trp1 : 5'
 (CCTAGCGACGAAAAGCATCATTGGAGTGAATAACTTGGACTTACCAAttcttag
 cattttgacg) 3' (SEQ ID N° 1).
 OERG6trp2 : 5' 5'
 (GCATAAGAGTGAAACAGAATTGAGAAAAAGACAGGCCCAATTCAaattcggg
 tcgaaaaaagaaaagg) 3' (SEQ ID N° 2).
 20

El producto de la PCR (Polymerase Chain Reaction) así obtenido se purifica por electroelución del fragmento correspondiente al tamaño esperado y se utiliza para transformar la cepa BM64 por la técnica del cloruro de litio como describe Gietz *et al.*, 1995.

25 Después de transformación, las levaduras tratadas se muestran sobre un medio mínimo que no contiene triptófano (Gietz *et al.*, 1995). Se obtienen así 41 colonias de BM64 transformadas protótrofas para el triptófano. En estas 41 colonias se ensayan tres veces sus propiedades: sensibilidad a la nistatina, estructura genómica de la inserción del gen *TRP1* y perfil por cromatografía en fase gaseosa de los esteroides totales que producen.

30 Para ello, las 41 colonias se transfieren a un medio mínimo que contiene respectivamente 10, 20 ó 50 μ g/mL de nistatina, una decena de colonias es capaz de crecer sobre el medio que contiene una dosis de 50 μ g/mL de nistatina. Estas colonias resistentes se seleccionan para verificar su estructura génica, así como sus composiciones en esteroides.

35 La inserción del gen *TRP1* en el gen *ERG6* se verifica por PCR utilizando un par de oligonucleótidos que cubren la unión entre el gen *TRP1* funcional y el *ERG6* con ruptura. Este par de oligonucleótidos es el siguiente: OERG6trp3: AGGGCCGAACAAAGCCCCGATCTTC (SEQ ID N° 3) y OERG6trp4: GGCAAACCGAGGAAGTCTTGG (SEQ ID N° 4).

Algunas cepas presentan el perfil de PCR esperado, es decir un fragmento de 800 pares de bases que corresponde al tamaño esperado para una inserción del *TRP1* en el *ERG6*.

40 Con el fin de verificar que el gen *ERG6* está totalmente desactivado en estas cepas, se ha realizado un análisis de las composiciones en esteroides de estas cepas por cromatografía en fase gaseosa y por cromatografía líquida de alta presión (Dupont *et al.*, 2003; Szczebara *et al.*, 2003).

Estos análisis confirman la ausencia de síntesis de ergosterol y la acumulación de esteroides anormales compatibles con las perturbaciones esperadas de la vía de biosíntesis de la cepa con ruptura.

Se ha seleccionado más especialmente una cepa y se la ha denominado WGIF01.

EJEMPLO 2: Construcción de las cepas CA10, CA14 y CA23.

Las cepas **CA10** (de genotipo: *MAT α* , *rho*⁺, *GAL2*, *ura3-52*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *erg5::HYGRO^R*, *ade2::GAL10/CYC1:: Δ 7Reductasa::PGK1*, *LEU2::GAL10/CYC1::matADR::PGK1*), **CA14** (de genotipo : *MAT α* , *rho*⁺, *GAL2*, *ura3-52*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *erg5::HYGRO^R* *att2::G418^R*, *ade2::GAL10/CYC1:: Δ 7Reductasa::PGK1*, *LEU2::GAL10/CYC1::matADR::PGK1*), y **CA23** (de genotipo: *MAT α* , *rho*⁺, *GAL2*, *ura3-52*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *erg5::HYGRO^R*, *are1::G418^R*, *are2::HIS3*, *ade2::GAL10/CYC1:: Δ 7Reductasa::PGK1*, *LEU2::GAL10/CYC1::matADR::PGK1*), así como sus construcciones se describen en la referencia de Duport *et al.* cuyo contenido técnico en lo que se refiere a la construcción de estas cepas se incorpora como referencia en la presente solicitud. Estas cepas producen o contienen en sus membranas esteroides no naturales (como se ha descrito en la solicitud de patente europea EP 0727489) y en particular el ergosta-5-enol (campesterol).

Estas tres cepas no expresan el producto del gen *ERG5* que es no funcional por inserción en su secuencia codificadora del gen de resistencia a la higromicina. Además estas cepas expresan el cADN que codifica para la Δ 7-reductasa de planta (la solicitud de patente europea EP0727489 describe principalmente la clonación de la Δ 7-reductasa de la planta *Arabidopsis thaliana*, que se incorpora como referencia en la presente solicitud, siendo el número de entrada GenBank de esta secuencia ATU49398). La cepa CA14 se deriva de la cepa CA10 por ruptura del gen *ATF2*. El producto de este gen lleva a una acetilación de la pregnenolona en la posición 3 (como se describe en la solicitud de patente WO99/40.203).

La cepa CA23 es una cepa derivada de la cepa CA10 por delección de los genes *ARE1* y *ARE2*, las dos proteínas Are1p y Are2p son responsables de la esterificación del ergosterol (Sturley, 2000) y opcionalmente del colesterol ya que son homólogas de la enzima responsable de la esterificación del colesterol en los mamíferos (ACAT).

EJEMPLO 3: Construcción del plásmido de expresión de la Δ 24-25 reductasa de origen humano (plásmido pYES_Delta24)

La construcción de este plásmido ha sido descrita por Waterham *et al*/2001. La construcción ha consistido en poner el cADN que codifica para la Delta-24-esterol reductasa bajo el control del promotor pGAL1 y del terminador tCYC1 en el vector pYES2 (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, Francia). Este plásmido es un plásmido lanzadera *E. coli/ S. cerevisiae* y contiene un origen de replicación de 2 micrones y un gen *URA3*, lo que permite su replicación en la levadura y facilidades de selección de las levaduras transformadas por este plásmido.

El promotor GAL1 puede además ser inducido con galactosa.

EJEMPLO 4: Construcción del plásmido pAG1 que expresa la Δ 7-reductasa de *A. thaliana*.

Se ha construido un plásmido específicamente para la expresión de la Delta-7-reductasa de *A. thaliana* sobre un vector monocopia. Para esta construcción se ha utilizado el plásmido pAM1. Este plásmido, cuya construcción se ha descrito en la solicitud PCT WO02/061.109 (véase el ejemplo 9.b de dicha solicitud, que se incorpora en la presente solicitud como referencia) es un plásmido lanzadera *E. coli/ S. cerevisiae* basado en una secuencia de replicación autónoma y un centrómero (ARS CEN). El marcador de selección es el gen *ADE2*. Este plásmido es compatible y por lo tanto puede replicarse al mismo tiempo que un plásmido basado en un origen de replicación de 2 micrones. Este plásmido posee en particular un sitio único *NotI* que permite clonar las casetes de expresión, tal como se ha descrito en la solicitud PCT anterior.

Este sitio se ha utilizado para clonar una casete de expresión de la Delta7-reductasa de *A. thaliana* que proviene de la cepa CA10. En efecto, esta casete de expresión es muy eficaz y permite a la cepa CA10, que presenta además ruptura en el *ERG5*, producir campesterol (ergosta-5-enol) como esteroide mayoritario (Duport *et al.*, 1.998). El fragmento de ADN genómico de la cepa CA10 que contiene el gen de la delta7-reductasa se amplifica mediante los cebadores siguientes:

OSA72 5' (TATATAGCGGCCGCTTTTCGCTGATTAATTACCCCAG) 3' (SEQ ID N° 5)

OSA 77 5' (TATATAGCGGCCGCGAGAAGTGACGCAAGCATCA) 3' (SEQ ID N° 6).

La amplificación se realiza sobre el ADN genómico de la cepa CA10 preparada por la técnica rápida de extracción con fenol/cloroformo como describe Adams *et al* (*Adams y Holm, 1996*).

Se utilizan cincuenta nanogramos de ADN genómico de CA10 como matriz para la amplificación mediante cebadores OSA72 y OSA77. La Taq ADN polimerasa y las condiciones enzimáticas provienen de la sociedad Stratagene. Las condiciones de amplificación eran las siguientes: desnaturalización inicial de 5 min a 95°C y luego, a continuación, se realizan treinta ciclos que consisten en una desnaturalización de 30 s a 95°C, una hibridación de 30 s a 50°C y luego un alargamiento de 1 min a 72°C. La reacción se finaliza con una extensión final de 10 min a 72°C.

El fragmento de PCR se digiere a continuación con la enzima *NotI*, se purifica sobre gel de agarosa y luego se clona de forma clásica al nivel del sitio único *NotI* del plásmido pAM1. El plásmido así obtenido se ha denominado pAG1.

Se trata de un vector monocopia que permite la expresión de la Delta7-reductasa de *A. thaliana* en la levadura, situándose el gen de la Delta7-reductasa bajo el control del promotor GAL10/CYC1 (Lecain et al., 1996).

EJEMPLO 5: Extracción de los esteroides libres y esterificados en la levadura para los análisis:

1) Condiciones de extracción de los esteroides libres y esterificados en la levadura: (procedimiento 1)

5 **a) Condiciones de extracción de los esteroides libres:**

El residuo celular se lava dos veces con 500 µL de agua desionizada y se filtra en un tubo de vidrio.

Las células se vuelven a poner en suspensión en 500 µL de agua que contiene bolas de vidrio de 0,5 mm que corresponden a 150 µL de líquido en el tubo.

10 Se realiza una extracción dos veces con 2 mL de 1,2-dicloroetano con agitación fuerte con un ciclón durante 10 minutos. Después de la primera extracción, la mezcla de células, bolas de vidrio y disolvente se centrifuga durante 5 minutos a 1.500 g con el fin de separar las dos fases.

15 Las dos fracciones orgánicas resultantes de las dos extracciones sucesivas se juntan y se secan en corriente de nitrógeno durante varias horas. El extracto esteroideo se suspende en 100µl de acetonitrilo para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Szczepara et al., 2003) o en 100µl de hexano para los análisis por cromatografía en fase gaseosa (GC) (Duport et al., 2003).

b) Condiciones de extracción de los esteroides totales: saponificación y extracción de los esteroides esterificados, análisis cuantitativo, procedimiento 1.

20 El residuo celular se vuelve a poner en suspensión en 500 µL de agua purificada. Se le añade a esta suspensión 2 mL de hidróxido de potasio KOH al 10% en metanol. La mezcla se calienta durante una hora a 60°C en tubos cerrados. Después de incubación y una vez que los tubos han vuelto a temperatura ambiente, la mezcla se extrae tres veces con 2 mL de hexano. Entre cada extracción, se separan las dos fases mediante una centrifugación de 5 minutos a 1.500 g. Después de cada extracción, la fase orgánica se transfiere a un nuevo tubo, luego las tres fases orgánicas se juntan y luego se secan en corriente de nitrógeno.

25 El residuo esteroideo se resuspende en 100µl de acetonitrilo 100% puro para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Szczepara et al., 2003) o en 100µl de hexano para los análisis por cromatografía en fase gaseosa (GC) (Duport et al., 2003).

2) Condiciones de extracción de los esteroides libres y esterificados en la levadura para análisis cuantitativo (procedimiento 2).

30 Las cepas se cultivan en medio rico (10g de bactopectona por litro y 10 g de extractos de levadura por litro) con 2% de glucosa como fuente de carbono para obtener 500mg de células liofilizadas. Estas células secas se recogen en 3 mL de metanol (100%) que contiene 1 g de KOH y trazas de pirogalol y luego la mezcla se incuba durante 45 minutos a 90°C. Después de volver a temperatura ambiente, los esteroides se extraen con 5 mL de hexano. La fase orgánica se separa en tres muestras del mismo volumen y se secan en corriente de aire. Dos de las muestras de los esteroides extraídos se recogen en 100 µL de hexano para los análisis por cromatografía en fase gaseosa (GC) y por cromatografía en fase gaseosa acoplada con espectrometría de masas (GC/MS) y la tercera muestra se recoge en 150 µL de metanol para los estudios por cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC).

EJEMPLO 6: Análisis de los esteroides libres y esterificados en la levadura por cromatografía en fase gaseosa (GC)

1) Cromatografía en fase gaseosa (GC) con detección por FID (ionización por llama)

40 Se prepara el extracto esteroideo (libre o total) en suspensión en hexano según el procedimiento 1 [véase el ejemplo 5 1) a) y b)]. Se añade un testigo de inyección a la mezcla de esteroideo, en general colesterol a una concentración de 10 a 50 ng/µL. A continuación se inyecta a 1 a 3 µL de la muestra en un aparato de cromatografía en fase gaseosa en las siguientes condiciones. Se inyectan 1 a 3 µL en una columna Alltech de tipo SE30 (Referencia de la columna: 30m X 0,32 mm ID X 0,25 µm). El gas portador es helio. La relación de inyección fraccionada (*split*) es entre 50 y 80. 45 La presión en cabeza de columna es de 2,11 kg/cm². El inyector se regula a 280°C. La temperatura inicial de la columna es de 130°C durante 0,5 minutos. Sube a 230°C a razón de 40°C/min y luego de 230°C a 280°C a razón de 3°C/min. La columna se mantiene a continuación a 290°C. La temperatura del detector es de 310°C.

2) Cromatografía en fase gaseosa (GC) con detección por FID (ionización de llama) acoplada con espectrometría de masas (GC/MS).

50 Se prepara el extracto esteroideo total en suspensión en hexano según el procedimiento 2. El aparato de GC utilizado está equipado de un inyector clásico con inyección fraccionada o no fraccionada («*split/split less*»), con una columna clásica DB5 de una longitud de 30 metros y un diámetro de 0,25 mm.

La inyección se realiza a 230°C con helio como gas portador con un caudal de 2mL/mn. La columna pasa de 130 a 290°C en 4 etapas. La columna se mantiene a 130°C antes de la inyección y luego se sube a 230°C con una rampa de 40°C/min, luego de 230°C a 280°C con una rampa de 3°C/min y luego de 280°C a 290°C con una rampa de 30°C/min. Se deja la columna a 290°C durante 5 minutos.

5 A la salida de la columna de cromatografía en fase gaseosa, las moléculas se analizan por espectrometría de masas por vaporización en una cámara de ionización, tal como la de un aparato de tipo Turbo Mass de Perkin Elmer. Las moléculas se fragmentan por un haz de electrones de alta energía. Los diferentes fragmentos se separan a continuación mediante un filtro cuadrupolar y luego se detectan con un detector de iones. A cada masa localizada en la gráfica de corriente iónica le corresponde un espectro de masas que reagrupa las masas de todos los productos de fragmentación del ión M⁺. Este espectro de masas obtenido con un tiempo de retención dado sobre la columna se compara con bibliotecas de productos fragmentados así como con los descritos para los esteroides por Quail y Kelly. [Methods in Molecular Biology Vol 53 Yeast Protocols Editado por Evans; M. Quail y S. Kelly "The Extraction and Analysis of Sterols from Yeast" pp 123-131 (1.996)].

10 De esta manera, se ha podido poner en evidencia el efecto de la delección del gen *ERG6* en la cepa WGIF01 y principalmente la ausencia de ergosta-8,24(28)-dienol y la presencia de un esteroide del tipo colestano- que tiene el doble enlace en 24(25).

EJEMPLO 7: Análisis de los esteroides libres y esterificados en la levadura por cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC) con detección UV o detección por espectrometría de masas.

1) Análisis por HPLC con detección UV :

20 Se inyectan 10 a 30 µL del extracto esteroideo [en suspensión en acetonitrilo o en metanol y preparado según el procedimiento 1 ó 2 (véase el ejemplo 5)] en una columna de tipo X terra RP18, 4,6 X 100 mm (Waters, Milford, MA01757 USA).

La separación se realiza con un gradiente compuesto de agua que contiene 0,02% de TFA (ácido trifluoroacético) (tampón A) y acetonitrilo puro (tampón B). La columna se mantiene a 60°C durante el análisis.

25 El aparato de HPLC utilizado es del tipo «Waters 600 E System Controller» (Waters, Milford, MA01757 USA). La detección UV se ha realizado con un detector de red de diodos que cubre las longitudes de onda de 206 a 350 nm. La columna se ha equilibrado con un tampón con 20% (v/v) de tampón A (acetonitrilo) y 80% de tampón B [agua que contiene 0,02% de TFA (ácido trifluoroacético)]. Se efectúa un gradiente lineal a partir de una disolución que contiene 50 % de tampón A y 50 % de tampón B. Al cabo de 10 min, la composición del tampón de elución es de 25% de tampón A para 75 % de tampón B. Se aplica entonces un nuevo gradiente lineal de forma que a los 30 min el gradiente alcance el valor de 100% en tampón B. Este valor se mantiene durante 5 minutos para limpiar la columna.

2) Análisis por HPLC con detección por espectrometría de masas (HPLC/MS):

35 En el caso del análisis por espectrometría de masas, la muestra se mantiene a 30°C y la columna se mantiene a 60°C durante el análisis. El aparato HPLC utilizado es del tipo «Alliance HT Waters 2790», acoplado con un detector de masas «Waters MicroMass ZQ». A diferencia del método de detección anterior, el tampón de elución A no contiene TFA sino que los dos tampones A y B contienen 0,01% (v/v) de ácido fórmico.

La columna se ha equilibrado con un tampón que contiene 80% de tampón A' (agua que contiene 0,01% (v/v) de ácido fórmico) y 20% de tampón B' (acetonitrilo que contiene 0,01% (v/v) de ácido fórmico).

40 La inyección comienza con un tampón que contiene 50% de estos dos tampones. Se realiza un gradiente lineal con dos rampas a partir de una disolución que contiene 50% de tampón A' y 50% de tampón B'.

45 Al cabo de 10 minutos, la composición del tampón de elución es de 25% de tampón A' y 75% de tampón B'. A continuación se modifica la rampa del gradiente para alcanzar 12,5% de tampón A' y 87,5% de tampón B' después de 25 minutos de análisis y luego 100% de tampón B' a los 30 minutos. Este valor se mantiene durante 5 minutos para regenerar la columna.

50 El detector de masas «Waters MicroMass ZQ» se regula para barrer en ionización positiva por electropulverización los valores de m/z comprendidos entre 295 y 450. Se elige un modo de adquisición «continuo» para el barrido. Además se realiza una extracción de señal en modo «SIR» en paralelo a todas las masas esperadas en abundancia isotópica natural para los esteroides que se van a analizar. El detector se regula de forma que resuelva totalmente sin interferencia de las moléculas que difieren en 1 unidad de m/z. El total de las adquisiciones se regula de forma que la duración total de la adquisición que, corresponde al barrido y al tiempo total de adquisición del conjunto de los SIR sea inferior a 2 segundos.

EJEMPLO 8: Cultivo de las cepas de levaduras para el análisis de su contenido en esterol con o sin marcación con ^{13}C :

Las cepas que se van a analizar se han cultivado en un volumen de 50 mL de medio de Kappeli (Kappeli et al., 1985) que contiene 2% de D-glucosa normal o de D-glucose- $^{13}\text{C}_6$ [para los experimentos de marcación, (véase la figura 10)].

La densidad óptica del cultivo inicial es de 0,1 a 600 nm. Este cultivo se incuba durante 72 horas a una temperatura de 30°C con agitación a 200 revoluciones por minuto.

A continuación las células se recuperan por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos. A continuación el residuo celular se analiza directamente mediante las técnicas de análisis presentadas en el ejemplo 5 (para los estudios que no necesitan inducción con galactosa).

Sin embargo, para los estudios de la cinética de inducción de la expresión de la delta-7-reductasa y la delta-24-reductasa (cepas transformadas por el plásmido pYES_Delta24 y/o pAG1), el residuo se vuelve a poner en suspensión en 50 mL de medio de Kappeli reciente que contiene 2% de galactosa (sin marcar con ^{13}C).

Este cultivo se incuba a una temperatura de 30°C con agitación a 200 revoluciones por minuto. Se recuperan 10 mL de cultivo después de 0 horas, 2 horas, 4 horas, 8 horas y 24 horas de cultivo.

Estas muestras de cultivo se centrifugan a 800 g durante 10 minutos, el residuo celular se congela y se conserva a -20°C antes de la extracción esterólica por los métodos descritos en el ejemplo 5.

EJEMPLO 9: Identificación de los esteroides presentes en las cepas analizadas:

La identificación de los esteroides se basa en la combinación de los principios siguientes:

- Comparación del comportamiento por GC, HPLC, GC/MS y HPLC/MS con patrones auténticos en el caso del campesterol (ergosta-5-enol), del ergosterol (ergosta-5,7,22-trienol), del colesterol (colesta-5-enol), del desmosterol (colesta-5, 24-dienol) , del colesta-5,22-dienol y del cimosterol (colesta-8,24-dienol).

- Análisis del espectro de absorción por HPLC y detección UV mediante red de diodos (véase el ejemplo 7-1):

Este método permite identificar sin ambigüedad mediante una base espectral, cinco tipos de esteroides: 1) tipo SA1: sin sistema diénico conjugado; 2) tipo SA2: presencia de un sistema diénico 5,7; 3) tipo SA3: presencia de un sistema diénico 22,24(25); 4) tipo SA4: presencia de un sistema diénico 8,14; 5) tipo SA5: presencia de un sistema diénico 22, 24(28); Los tipos SA3 y SA5 no pueden coexistir por razones estructurales. Los tipos SA2 y SA4 no pueden coexistir por razones de biosíntesis, el tipo SA2 puede estar asociado con restos estructurales de los tipos SA1, SA3 y SA5 para formar espectros compuestos aditivos.

- Análisis de los tiempos de retención por GC y por HPLC en base a una actividad aproximada de los desplazamientos de los tiempos de retención asociados a cada tipo de insaturación y a la presencia de un esqueleto de tipo ergosta- o colesta-. No siendo este criterio absoluto, se utiliza como ayuda a la identificación y para eliminar ambigüedades, pero presenta un riesgo de error si se utiliza solo. Por lo tanto sólo se utiliza en combinación con los otros criterios.

- Análisis por GC/MS (véase el ejemplo 6-2) que proporciona el peso molecular y un perfil de fragmentación que puede ser comparado con bibliotecas de espectros.

- Análisis por HPLC/MS (véase el ejemplo 7-2) con electropulverización que proporciona, en el caso de los 3-hidroxi-esteroides, una señal principal para el peso molecular -17 [protonación (+1) y pérdida de una molécula de agua (-18)].

- Análisis con el conjunto de los sistemas anteriores de la composición en esteroides de las diferentes cepas de levaduras de referencia con ruptura en diferentes puntos de la biosíntesis.

- Análisis de las variaciones de la composición en esterol durante la complementación con diferentes enzimas de biosíntesis y de la cinética de esta complementación durante la inducción de esta complementación.

- Análisis del perfil de marcación de los diferentes esteroides con el isótopo 13 del carbono.

- Análisis del espectro UV de los esteroides separados por HPLC con un tiempo de retención dado.

Los dos dobles enlaces 5,7 conjugados presentan un espectro típico con dos picos de absorción entre 265 y 280 nm. El último doble enlace conjugado en 8, 14 se puede identificar por un pico de absorción a 245 nm.

EJEMPLO 10: Identificación de los esteroides presentes en la cepa BMA64:

La cepa BMA64 se cultiva en un volumen de 50 mL de medio de Kappeli que contiene 2% de D-glucosa para el análisis cuantitativo y comparativo de los esteroides. La densidad óptica del cultivo inicial es de 0,1 a 600 nm. Este cultivo se incuba durante 72 horas a una temperatura de 30°C con agitación a 200 revoluciones por minuto.

- 5 Las células se recuperan a continuación por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos y el residuo celular se analiza por las técnicas presentadas en el ejemplo 5. Los diferentes análisis descritos han permitido identificar los esteroides producidos por esta cepa.

Se ha determinado así que esta cepa acumula más de 80% de los esteroides libres en forma de ergosterol (ergosta-5,7,22-trienol) (véase la Figura 8). Esta cepa produce otros esteroides minoritarios detectables, se trata del ergosta-5,7-dienol (sustrato del producto del gen ERG5) (12%) y el cimosterol (ergosta-8,24-dienol) (5%). No se detecta ninguna traza de colesterol (el límite de detección del método es de aproximadamente 0,5% de los esteroides observables). Igualmente son detectables pequeñas cantidades de lanosterol (únicamente al nivel de los análisis de los esteroides totales).

EJEMPLO 11: Identificación de los esteroides presentes en la cepa WGIF01:

- 15 La cepa WGIF01 (véase el ejemplo 1) se ha cultivado en un volumen de 50ml de medio Kappeli (Kappeli et al., 1985) que contiene 2% de D-glucosa para el análisis cuantitativo y comparativo de los esteroides.

La densidad óptica del cultivo inicial es de 0,1 a 600 nm. Este cultivo se incuba durante 72 horas a una temperatura de 30°C con agitación a 200 revoluciones por minuto. Las células se recuperan a continuación por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos y el residuo celular se analiza por las técnicas presentadas en el ejemplo 5. Los diferentes análisis descritos han permitido identificar los esteroides producidos por esta cepa.

La búsqueda en el cromatograma del ergosta-5,7,22-trienol (ergosterol) o del ergosta-5,7-dienol es negativa (menos de 0,5% del valor obtenido en la BMA64) por HPLC acoplada con espectrometría de masas. Al nivel de los esteroides libres, la cepa acumula para 50% del total de cimosterol (colesta-8,24-dienol), sustrato del producto del gen ERG6, y para 30 y 20% respectivamente, del colesta-5,7,24-trienol y del colesta-5,7,22,24-tetraenol que resultan probablemente de un mecanismo de síntesis idéntico al que lleva al ergosta-5,7-dienol y al ergosta-5,7,22-trienol en la cepa progenitora (véanse las figura 3 y 8). Esto demuestra que la vía de biosíntesis está bloqueada al nivel del *erg6* ya que la enzima ERG6p (S-adenosilmetionina delta24 esterol C-metil transferasa) transforma el colesta-8,24 (25)-dienol en ergosta-8, 24(28)-dienol (véase la figura 2). Esta acumulación indica claramente que la cepa WGIF01 no posee una copia funcional del gen *erg6*. Los resultados indican igualmente que la vía de biosíntesis normal del ergosterol en la levadura, y en particular la esterol 8,7-isomerasa, la esterol 5-desaturasa y la esterol delta-22-desaturasa son capaces de convertirse en sustratos del tipo colesta- con una actividad que sigue siendo importante.

EJEMPLO 12: Construcción de la cepa WGIF02 e identificación de los esteroides presentes en esta cepa:

La cepa WGIF02 ha sido obtenida por transformación de la cepa WGIF01 mediante el plásmido pYES2 que contiene el casete de expresión de la $\Delta 24$ Reductasa (pYES_Delta24, véase el ejemplo 3). Los clones se han elegido sobre un medio desprovisto de uracilo y la presencia y la expresión del cADN de la $\Delta 24$ reductasa se verifican analizando los esteroides de estos transformantes por el procedimiento 1 [véase el ejemplo 5-1].

Se ha seleccionado un clon denominado WGIF02 ya que poseía un perfil esteróico diferente de la cepa WGIF01, además el esterol suplementario tenía un tiempo de retención próximo al del colesterol (véase la figura 7). La cepa WGIF02 se cultiva en un volumen de 50 mL de medio de Kappeli (Kappeli et al., 1985) que contiene 2% de D-glucosa para el análisis cuantitativo y comparativo de los esteroides.

La densidad óptica del cultivo inicial es de 0,1 a 600 nm. Este cultivo se incuba durante 72 horas a una temperatura de 30°C con agitación a 200 revoluciones por minuto.

Las células se recuperan a continuación por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos y el residuo celular se analiza por las técnicas presentadas en el ejemplo 5. Los diferentes análisis descritos han permitido identificar los esteroides producidos por esta cepa.

Los dos perfiles de los extractos esteróicos de la cepa WGIF01 y de la cepa WGIF02 son similares, salvo en la aparición de un nuevo pico identificado por su masa, su tiempo de retención y sus dobles enlaces conjugados como el colesta-5,7,22-trienol (figuras 2, 3 y 7). La presencia de este compuesto indica la presencia esperada de actividad de la 24-25-esterol reductasa sobre el doble enlace en 24(25) del colesta-5, 7, 22, 24 (25)-tetraenol. Además, la cantidad de colesta-5, 7 24-trienol disminuye con la aparición del colesta-5, 7, 22-trienol en la cepa WGIF02 (figuras 7 y 8). La actividad de la enzima se pone de manifiesto por la conversión del colesta-5,7,24-trienol que representa 30% en la cepa WGIF01 y solamente 12% en la WGIF02, encontrándose la diferencia, es decir 18%, íntegramente en forma de colesta-5,7,22-trienol en la cepa WGIF02. Se trata de un resultado inesperado en la medida en que el producto de conversión del colesta-5,7,24 por la delta 24-reductasa es el colesta-5,7, que no está presente en la WGIF02 y por tanto se convierte cuantitativamente en colesta-5,7,22. Esto pone de manifiesto otro resultado

inesperado, a saber: que el colest-5,7 es un sustrato de la estero 22-desaturasa, mientras que el colest-5,7,24 es, según el perfil esteróico de la cepa WGIF01, un mal sustrato.

EJEMPLO 13: Construcción de la cepa WGIF03 e identificación de los esteroides presentes en esta cepa:

5 La cepa WGIF03 se ha obtenido por transformación de la cepa WGIF01 con el plásmido pAG1. Este plásmido lanzadera entre la *E. coli* y la *S. cerevisiae* contiene un casete de expresión para la $\Delta 7$ reductasa cuyo cADN correspondiente se encuentra bajo control del promotor GAL10/CYC1. La cepa WGIF01 ha sido transformada por la técnica del cloruro de litio y los transformantes se han seleccionado en un medio que no contenía adenina. La expresión de la Delta7-reductasa se ha verificado por la aparición en el perfil esteróico de clones adecuados del colest-5,24(25)-dienol. Se ha elegido más especialmente un clon que responde a estos criterios y se ha denominado WGIF03.

10 La cepa WGIF03 se ha cultivado en un volumen de 50 mL de medio de Kappeli (Kappeli et al., 1985) que contiene 2% de D-glucosa para el análisis cuantitativo y comparativo de los esteroides.

15 La densidad óptica del cultivo inicial es de 0,1 a 600 nm. Este cultivo se incuba durante 72 horas a una temperatura de 30°C con agitación a 200 revoluciones por minuto. Las células se recuperan a continuación por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos y el residuo celular se analiza por las técnicas presentadas en el ejemplo 5. Los diferentes análisis descritos han permitido identificar los esteroides producidos por esta cepa.

La expresión de la delta7-estero reductasa en la cepa WGIF01 (para dar la cepa WGIF03), contrariamente a la expresión de la delta24-estero reductasa, lleva a un cambio profundo del perfil esteróico de la cepa, con la desaparición casi total de los colest-5,7, 22, 24-tetraenol, colest-7,24-dienol y colest-8,24-dienol.

20 Esta actividad se señala igualmente por la aparición de un pico mayoritario identificado como el descrito anteriormente para el colest-5, 24-dienol o desmostero. Las cantidades de colest-8, 24-dienol pasan de 12 a 48%. El colest-5, 7, 24-trienol detectado pasa de 30 a 3% y el colest-5, 7, 22,24-tetraenol detectado de 23 a 4%, respectivamente para las cepas WGIF01 y WGIF03. Estas observaciones indican, de forma inesperada, que la estero delta-7-reductasa reduce los colest-5,7-dienoles de forma casi independiente de la naturaleza de las insaturaciones que contiene la cadena lateral de los esteroides. Este resultado se opone al observado con la estero delta-24-reductasa. De forma inesperada, la expresión de la estero delta-7-reductasa lleva igualmente a la acumulación (12%) de una molécula co-migrante con el colest-5,7-dienol. Sin embargo, parece poco probable, aunque no excluido, que esta molécula sea colest-5,7-dienol cuyo nivel teórico debería disminuir y no aumentar en estas condiciones. La aparición de una pequeña cantidad de colest-5,22,24-trienol (8%) es también interesante.

30 Este último estero es el producto esperado de la acción de la estero 22-desaturasa sobre el colest-5,24-dienol, estero mayoritario (60%) en la cepa WGIF03 (resultante de la reducción del colest-5,7,24-trienol por la estero delta 7-reductasa). La pequeña acumulación de colest-5,22,24-trienol indica de forma inesperada que el colest-5,24-dienol no es un buen sustrato para la estero 22-desaturasa. Gracias a los resultados obtenidos en la cepa WGIF02 (véase el ejemplo 12), se puede deducir que la presencia de una insaturación en 24 (colest-5, 24-dienol o colest-5,7,24-trienol) hace que los esteroides sean difícilmente metabolizables por la estero 22-desaturasa. La acción de la enzima ERG6p transformando los colest- insaturados en 24 en ergosta- lleva, por lo tanto, a transformar los malos sustratos del gen ERG5 (22-desaturasa) en buenos sustratos.

EJEMPLO 14: Construcción de la cepa WGIF04 e identificación de los esteroides presentes en esta cepa:

40 La cepa WGIF04 se ha obtenido por transformación de la cepa WGIF02 mediante el plásmido pAG1 por la técnica del cloruro de litio y los transformantes se han seleccionado en un medio que no contenía ni adenina ni uracilo. Los buenos transformantes se han confirmado entonces en base a la detección de acumulación de colesterol. Se ha seleccionado más especialmente un clon que responde a estos criterios y se ha denominado WGIF04. Una muestra de la cepa WGIF04 ha sido depositada ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) Instituto Pasteur, calle Docteur Roux 25, 75724 París Cedex 15, Francia, el 22 de abril de 2.004 con el número de registro I-3203.

45 También se pueden obtener cepas indistinguibles transformando la cepa WGIF03 mediante el pYES_Delta24 y aplicando la misma selección.

50 La cepa WGIF04 se cultiva en un volumen de 50 mL de medio de Kappeli que contiene 2% de D-glucosa para el análisis cuantitativo y comparativo de los esteroides. La densidad óptica del cultivo inicial es de 0,1 a 600 nm. Este cultivo se incuba durante 72 horas a una temperatura de 30°C con agitación a 200 revoluciones por minuto. Las células se recuperan a continuación por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos y el residuo celular se analiza por las técnicas presentadas en el ejemplo 5. Los diferentes análisis descritos han permitido identificar los esteroides producidos por esta cepa.

55 El colesterol representa 25% de los esteroides libres de la cepa WGIF04 (véase la figura 9). La formación de colesterol en esta cepa se demuestra independientemente por GC y por HPLC por la co-migración con un patrón auténtico y por confirmación a la vez por GC/MS y por HPLC/MS. El colesterol no es detectable (< 0,5% de los esteroides totales) en todas las cepas que no expresan simultáneamente la delta-7-reductasa y la delta-24-reductasa.

Las cepas que no han sufrido ruptura en el gen *erg6* pueden producir colesterol, sin embargo, éste representa menos de 5% de los esteroides libres totales. Así, se ha podido construir la cepa BMA64-pYES_Delta24-pAG1 obtenida a partir de la BMA64 co-transformada por el pYES_Delta24 y el pAG1. Esta cepa produce colesterol, representando este último cierto % de los esteroides totales.

- 5 La cepa CA10 se ha transformado por el plásmido pYES_Delta24. Esta cepa produce colesterol, representando este último cierto % de los esteroides totales.

Por otro lado, se ha podido demostrar que la formación del colesterol necesita de la inducción de los promotores de la delta-7-reductasa y la delta-24-reductasa (véanse las figuras 4 y 5). Las cepas que contienen los genes no producen colesterol en ausencia de inducción, la figura 5 indica que el nivel máximo de colesterol se alcanza después de aproximadamente 24 horas de inducción. Paralelamente a la formación del colesterol (colesta-5-enol) se observa igualmente la formación de colesta-5,22-dienol. El análisis de la figura 4 y de la figura 5 indica que la formación de este último compuesto se produce más rápidamente después de la inducción que la formación del colesterol y comienza incluso antes que la inducción (véase la figura 5A: m/z = 367). Sin embargo, este compuesto está totalmente ausente si la cepa no contiene los dos plásmidos pAG1 y pYES_Delta24. La formación del 22-desidrocolesterol es por lo tanto un proceso más rápido que el de la formación del colesterol, pero este proceso implica un precursor que desaparece rápidamente después de la inducción, dando lugar a la formación del colesterol. El colesterol se puede formar a partir del colesta-5,24 vía la $\Delta 24$ -reductasa o a partir del colesta-5,7 vía la $\Delta 7$ -reductasa. Por tanto, se ha demostrado que el colesta-5,7-dienol no se puede acumular debido a su conversión inmediata en colesta-5,7,22-trienol. La fuente de colesterol es por lo tanto el colesta-5,24-dienol que está ausente en el momento de la inducción y se acumula aproximadamente a las 4 a 8 horas de inducción antes de disminuir a aproximadamente las 24 horas (figura 5). Esto explica la aparición tardía del colesterol, ya que es necesaria la síntesis previa del colesta-5,24-dienol. Por el contrario, los dos precursores posibles del colesta-5,22-dienol son el colesta-5,7,22-trienol y el colesta-5,22,24-trienol. Este último está ausente al comienzo de la inducción (figura 4) mientras que el primero está presente y luego disminuye rápidamente en paralelo con la estabilización de la formación del colesta-5,22-dienol. Por lo tanto, se puede concluir que la fuente de colesterol es la reducción del 5,24-dienol por la $\Delta 24$ -reductasa, mientras que la formación del colesta-5,22-dienol resulta de la reducción del 5,7,22-trienol por la $\Delta 7$ -reductasa. La formación del colesta-5,22-dienol por acción de la $\Delta 22$ -desaturasa sobre el colesterol no está totalmente excluida, pero parece un proceso minoritario en base a la acumulación preferencial del colesterol en comparación con el colesta-5,22-dienol para tiempos largos (24 horas) de la cinética (figura 4 y 5).

30 **EJEMPLO 15: Optimización de la vía de biosíntesis del colesterol, papel de la $\Delta 22$ -desaturasa:**

Para tiempos de inducción de la cepa WGIF04 del orden de 24 horas, la acumulación del colesta-5,22-dienol representa aproximadamente 50% de la del colesterol a niveles de los esteroides libres (figura 4). La ruptura del gen de la $\Delta 22$ -desaturasa es una opción para optimizar la producción de colesterol. Se puede considerar perfectamente la construcción de una cepa con ruptura doble a nivel de la $\Delta 22$ -desaturasa (gen *erg5*) y del gen *erg6* y que expresa la $\Delta 7$ -reductasa y la $\Delta 24$ -reductasa. Se ha realizado una cepa que contiene el subconjunto: ruptura de la $\Delta 22$ -desaturasa, expresión de la $\Delta 7$ -reductasa y expresión de la $\Delta 24$ -reductasa.

Esta cepa se ha obtenido por transformación de la cepa CA10 mediante el plásmido pYES_Delta24 por la técnica del cloruro de litio y por selección mediante la prototrofia hacia el uracilo. La cepa obtenida se ha denominado CA10/ $\Delta 24$.

40 La cepa CA10 que expresa la $\Delta 24$ -esterol reductasa produce una cantidad relativamente pequeña de colesterol (véanse las figura 6 y 7) y acumula de forma principal el ergosta 5-enol y de forma intermedia el ergosta-5,7-dienol. La acumulación del colesta-5,7-dienol es muy pequeña en tal cepa lo que indica que la ruptura del gen *erg6* es indispensable para la acumulación importante de derivados de la serie colesta-. La actividad de la $\Delta 24$ -reductasa es por tanto, de forma inesperada, poco competitiva con la del producto del gen *erg6*. Se puede concluir por lo tanto de estos resultados que la ruptura simultánea de los genes *erg5* y *erg6* es importante con el fin de optimizar la producción de colesterol.

La ruptura del gen *erg5* en la cepa WGIF04 permitiría al experto aumentar de forma importante la producción de colesterol. La viabilidad de tal cepa se establece por la construcción de las cepas WGIF04 y CA10/ $\Delta 24$ y por el hecho de que esta cepa no es sino una combinación genética evidente que se puede realizar de las dos cepas anteriores. Los datos procedentes de WGIF04 indican la desaparición de colesta 5,24 durante la expresión de la $\Delta 24$ -reductasa (comparando los resultados obtenidos con WGIF03 y los obtenidos con WGIF04). Esto permite predecir una síntesis muy eficaz de colesterol en una cepa con ruptura simultáneamente por los genes *erg5* y *erg6*, y que expresa conjuntamente la $\Delta 7$ -reductasa y la $\Delta 24$ -reductasa, siendo entonces el colesterol el único esteroide terminal.

55 En conclusión, el mínimo requerido para la producción de colesterol con un umbral superior o igual a 20% de los esteroides totales es la ruptura del gen *erg6* y la expresión de la $\Delta 7$ -reductasa y de la $\Delta 24$ -reductasa. La ruptura complementaria de la $\Delta 22$ -desaturasa permitiría mejorar la productividad en colesterol y eliminar la formación parasita del colesta-5,22-dienol como esteroide terminal.

EJEMPLO 16: Marcación isotópica del colesterol y definición de las firmas isotópicas:

El principio de la obtención de un colesterol marcado se describe en la figura 10. Esta manipulación consiste en primer lugar en hacer crecer la levadura sobre glucosa totalmente marcada con ^{13}C durante 72 horas de cultivo a 30°C .

5 A continuación las células se recuperan por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos. El residuo de las células se pone en suspensión en 50 mL de medio de Kappelli reciente que contiene 2% de galactosa no marcado con carbono ^{13}C . Los cultivos se finalizan 2 horas, 4 horas, 8 horas o 24 horas después del paso en galactosa, los esteroides se extraen y luego se analizan (véase el ejemplo 7). El paso de glucosa a galactosa provoca la inducción de los promotores GAL10/CYC1 que controlan a la vez el gen de la $\Delta 7$ -reductasa y el de la $\Delta 24$ -reductasa. Simultáneamente hay cambio de marcación isotópica de la fuente de carbono. Sigue la síntesis *de novo* de intermedios metabólicos y luego de esteroles, incluyendo el colesterol, y que comprende un cambio progresivo de marcación. Este cambio de marcación puede caracterizarse por el perfil de masas de cada esteroles intermedio. En efecto, la incorporación de cada átomo de ^{13}C induce un desplazamiento de la masa en una unidad de masa atómica (UMA). Así, por ejemplo, el colesterol aparece con una masa molar que varía de 386 a 413 dalton según el nivel de marcación. En el análisis por HPLC-masas, utilizando ionización positiva por electropulverización, esta corresponde a m/z (masa/carga) que varía de 369 a 396 (ión $\text{M} + \text{H}^+ - \text{H}_2\text{O}$, es decir $\text{M} + 1 - 18 = 385 - 17 = 369$). Los tiempos de retención de los esteroides por HPLC no dependen de la forma detectable del nivel de marcación, el espectro de masas de un pico de HPLC correspondiente a un esteroles «X» único, corresponde a una distribución de masas que es, por lo tanto, la superposición (la suma) de las distribuciones de masa del esteroles «X» sintetizado a diferentes tiempos después de la marcación. Se trata por lo tanto de un perfil complejo (figura 11) pero perfectamente determinable experimentalmente, que representa una firma isotópica única que depende a la vez:

- 1) del protocolo de marcación y en particular de la duración y las condiciones de cultivo en ^{12}C -glucosa y en ^{13}C -galactosa,
- 2) de la estructura genética precisa de la cepa utilizada, y
- 3) del tiempo preciso de finalización de los cultivos.

Este perfil isotópico tiene varias propiedades únicas:

- 1) se puede modular a voluntad actuando sobre las condiciones de cultivo, la cepa utilizada y el esteroles elegido. Se puede producir por lo tanto un registro de marcadores único.
- 2) Se puede combinar, a saber, que varias firmas isotópicas correspondientes a varios esteroides únicos marcados por perfiles isotópicos ellos mismos modulables, se pueden combinar para formar un "alfabeto molecular".
- 3) es reproducible y fácil de determinar experimentalmente (véanse las figuras 11 y 12) las trazas dobles y triples que indican la reproducibilidad de los perfiles,
- 4) Corresponde a una mezcla molecular marcadora fácil de aislar, estable, incolora e inodora, no volátil, no tóxica y que se puede incorporar a alimentos, medicamentos, aditivos o a otros productos asimilables por el hombre.
- 5) Es infalsificable, salvo que se disponga de las cepas recombinantes específicas y de condiciones muy precisas de marcación, de cultivo y de extracción. Además el conocimiento de la firma isotópica no permite rehacer los parámetros que han permitido producirla.

En resumen, se ha inventado un «alfabeto isotópico» infalsificable, de uso general e incorporable en todo tipo de productos, incluidos los consumibles. Las «palabras isotópicas» que se pueden constituir a partir de tal alfabeto tienen un número casi ilimitado sacando provecho a la vez los perfiles de marcación y los diferentes tipos de esteroides. La incorporación de tales firmas en el seno de productos muy variados constituye por lo tanto un método único de marcación infalsificable, contrariamente por ejemplo a las firmas de ADN que pueden reproducirse una vez que se conocen. Por otro lado, la firma se puede leer de forma no destructiva, por ejemplo por ionización láser seguida de análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF o similar).

EJEMPLO 17: Producción de colesterol no animal altamente marcado con ^{13}C :

La utilización de galactosa ^{13}C o de glucosa y de etanol ^{13}C en lugar de las fuentes de carbono no marcado para el cultivo de la cepa WGIF04 en las condiciones descritas anteriormente para los análisis de esteroides permite la síntesis de esteroides y en particular del colesterol muy marcado (comprendiendo al menos 95% de carbono ^{13}C). Igualmente es posible, mediante la misma estrategia, la preparación de esteroides y de colesterol radiactivo por ^{14}C . El procedimiento se puede así incorporar a cepas de levaduras que producen esteroides y principalmente hidrocortisona (véase la solicitud de patente WO 02/061.109) para producir esteroides marcados con ^{13}C o con ^{14}C , por ejemplo para ensayos RIA.

EJEMPLO 18: Construcción de una cepa que produce mayoritariamente colesterol:

La cepa CDR07 Mata se describe en la solicitud de patente publicada con el número WO02.061.109 y ha sido registrada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), calle Docteur Roux 25, 75.724 Paris Cedex 15, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest, en la CNCM el 24 de enero de 2.001 con el número de orden I-2616.

La cepa CDR07 MATa (marcadores pertinentes: *ade2::GAL10/CYC1_p::Δ⁷*; *erg5::PGK1_p::hygro^R*; *ERG6*) se ha cruzado con la cepa WGIF01 descrita en el ejemplo 1 (marcadores pertinentes: *ERG5*; *erg6::TRP1*).

Después de la esporulación del diploide, se determina la composición en esteroides de las esporas para encontrar las esporas que producen desmosterol que es el precursor del colesterol como se ha descrito en el ejemplo 6. Se ha identificado así una spora que produce desmosterol y que posee un gen *TRP1* funcional y que contiene el cADN de la $\Delta 7$ reductasa de la *Arabidopsis thaliana*, así como se ha indicado para el análisis por PCR. Además, esta cepa denominada YIM59, es sensible a la higromicina indicando que el gen *ERG5* es funcional.

Una preparación esteróica, preparada como se ha descrito en los ejemplos 6 a 9, ha demostrado que esta cepa YIM59 produce esteroides que tienen el mismo tiempo de retención que el cimosterol y el demosterol. La cepa YIM59 ha mostrado igualmente auxotrofias para la adenina, la leucina, el uracilo y la histidina. La presencia del desmosterol demuestra que esta cepa expresa la *esterol-reductasa* y que contiene un alelo no funcional *erg6*.

Con el fin de mejorar el nivel de expresión de la DHCR24 humana, se ha modificado la secuencia de nucleótidos del cADN de la DHCR24; con el fin de mejorar la traducción al nivel del ATG iniciador, se ha modificado igualmente el promotor que controla la expresión del DHCR24. El nuevo promotor elegido es el promotor *CYC1* del citocromo *c1* como reemplazo del promotor inducible *GAL1* del plásmido pYES_Delta24 (véase el ejemplo 3).

La secuencia que corresponde al NH₂ terminal de la DHCR24 reductasa en fusión con el promotor *CYC1* se ha modificado como sigue:

```

tagcgtggatggccaggcaactttagtgtgacacatacaggcatatataatgtgtgacgacacatgatcatatggcatg
catgtgctctgtatgtatataaaactctgttttcttttctctaaatattctttccttatacattaggtcctttgtagcataaactacta
tactctatagacacgcaaacacaaaggaattgacaagttgtacaaaaagcaggctaaaaaATGGAACCTGCC
GTGTCGCTGGCCGTGTGCG (SEQ ID N° 7).

```

En minúsculas se encuentra la secuencia de nucleótidos parcial del promotor *CYC1* 1 y luego las secuencias de recombinación *AttB1* a continuación una secuencia AAAA que precede al ATG iniciador. La secuencia de los dos primeros codones ha sido igualmente modificado (secuencia GAA-CCT después del codón iniciador ATG).

El plásmido final que contiene el cADN de la DHCR24 bajo control del promotor *CYC1* así como el origen de replicación de 2μ de la *S. cerevisiae* y el marcador de selección URA3-d se ha denominado pIM331. Su equivalente sin el cADN de la DHCR24 se ha denominado pIM303.

La cepa YIM59 es independientemente transformada por los plásmidos pIM303 y pIM331 y se han seleccionado más especialmente dos transformantes que contienen el plásmido pIM303 (cepa YIM59/pIM303) o pIM331 (cepa YIM59/pIM331). Estas cepas se cultivan en un medio rico reconstituido del tipo Kappelli durante 72 horas a 28°C para alcanzar una absorbancia de 40 a 600 nm. Se realizan extractos esteróicos totales (esteroides esterificados y esteroides libres) de la cepa YIM59/pIM303 (que no contiene el cADN de la DHCR24) y de la cepa YIM59/pIM331 (que contiene el cADN de la DHCR24) en presencia de potasa metanóica (véanse los ejemplos 5 y 6). Estas dos cepas han sido ensayadas en cuanto a su capacidad para producir colesterol. Una parte de los resultados (GC) se presenta en la figura 13. Los tiempos de retención presentados se dan en minutos en los dos cromatogramas.

Se ha podido demostrar así que la cepa que no contiene el vector de expresión de la DHCR24 (cepa YIM59/pIM303) no produce colesterol (parte A) sino principalmente desmosterol (parte A). Por el contrario, la cepa que contiene el cADN de la DHCR24 (cepa YIM59/pIM331) produce un esteroide que tiene el tiempo de retención del colesterol (parte B). Se ha podido demostrar por técnicas de cromatografía en fase gaseosa acoplada con espectrometría de masas por impacto electrónico (como se ha descrito en el ejemplo 6) que este esteroide es el colesterol. Utilizando las áreas de cada uno de los picos de esteroide, se ha podido calcular en 57% de los esteroides la cantidad producida por la cepa YIM59/pIM331.

Depósito de material biológico

Los organismos siguientes se han depositado el 22 de abril de 2.004 ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), calle Docteur Roux 25, 75724 París Cedex 15, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest.

- Cepa WGIF04 registrada con número de registro I-3203.

Todas las publicaciones y patentes citadas se incorporan a la presente solicitud de patente por referencia.

Bibliografía:

- Adams, A.K., y C. Holm. 1996. *Mol Cell Biol.* 16: 4.614-20.
- 5 • Ausubel Fred M., Brent Roger, Kingston Robert E., Moore David D., Seidman J. G., Smith John A., Struhl Kevin (Editores). *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por John Wiley & Sons Inc. Current Protocols Customer Service, 605 Third Avenue, 9th Floor Nueva York, NY 10158 EE.UU. (edición actualizada en Marzo de 2002).
- Baudin-Baillieu, A., E. Guillemet, C. Cullin, y F. Lacroute. 1997. *Yeast.* 13: 353-6.
- 10 • Bonneaud, N., O. Ozier-Kalogeropoulos, G.Y. Li, M. Labouesse, L. Minvielle-Sebastia, y F. Lacroute. 1991. *Yeast.* 7: 609-15.
- Bowman, S. et al.. 1997. *Nature.* 387: 90-3.
- Duport, C., B. Schoepp, E. Chatelain, R. Spagnoli, B. Dumas, y D. Pompon. 2.003. *Eur J Biochem.* 270: 1.502-14.
- Gietz, R.D., R.H. Schiestl, A.R. Willems, y R.A. Woods. 1995. *Yeast.* 11: 355-60.
- 15 • Goffeau, A., et al.. 1996. *Science.* 274: 546.563.-7
- Jensen-Pergakes, K.L., M.A. Kennedy, N.D. Lees, R. Barbuch, C. Koegel, y M. Bard. 1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:1160-7.
- Kaneshiro, E.S., J.A. Rosenfeld, M. Basselin-Eiweida, J.R. Stringer, S.P. Keely, A.G. Smulian, y J.L. Giner. 2002. *Mol Microbiol.* 44: 989-99.
- 20 • Kappeli, O., M. Arreguin, y M. Rieger. 1985. *J Gen Microbiol.* 131: 1411-6.
- Kelly, S.L., D.C. Lamb, B.C. Baldwin, A.J. Corran, y D.E. Kelly. 1997. *J Biol Chem.* 272: 9.986-8.
- Lecain, E., X. Chenivresse, R. Spagnoli, y D. Pompon. 1996. *J Biol Chem.* 271: 10.866-73.
- McCammon, M.T., M.A. Hartmann, C.D. Bottema, y L.W. Parks. 1984. *J Bacteriol.* 157:475-83.
- 25 • Moebius, F.F., B.U. Fitzky, J.N. Lee, Y.K. Paik, y H. Glossmann. 1998. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 1899-902.
- Noda, H., y Y. Koizumi. 2.003. *Insect Biochem Mol Biol.* 33: 649-58.
- Ozier-Kalogeropoulos, O., A. Malpertuy, J. Boyer, F. Tekaia, y B. Dujon. 1998. *Nucleic Acids Res.* 26:5511-24.
- 30 • Skaggs, B.A., J.F. Alexander, C.A. Pierson, K.S. Schweitzer, K.T. Chun, C. Koegel, R. Barbuch, y M. Bard. 1996. *Gene.* 169: 105-9.
- Sturley, S.L. 2000. *Biochim Biophys Acta.* 1529: 155-63.
- Szczebara, F. M., et al.. 2.003. *Nat Biotechnol.* 21: 143-9.
- Tait, E., M.C. Simon, S. King, A.J. Brown, N.A. Gow, y D.J. Shaw. 1997. *Fungal Genet Biol.* 21: 308-14.
- Taton, M., y A. Rahier. 1991. *Biochem Biophys Res Commun.* 181:465-73.
- 35 • Taylor, F.R., y L.W. Parks. 1.978. *J Bacteriol.* 136:531-7.
- Waterham, H.R., J. Koster, G.J. Romeijn, R.C. Hennekam, P. Vreken, H.C. Andersson, D.R. FitzPatrick, R.I. Kelley, y R.J. Wanders. 2001. *Am J Hum Genet.* 69:685-94.
- Wood, V., et al. 2002. *Nature.* 415: 871-80.

Tabla 1 : Evaluación de las contribuciones espectrales de las insaturaciones de los esteroides (coeficientes de extinción mM-1cm-1)

Insaturación	Longitud de onda (nm)		
	206	235	280
5	3,9	0,0	0,0
5,7	4,0	1,7	11,5
5,7,22	4,8	1,7	11,5
5,22	4,4	0,0	0,0
5,24	6,9	0,0	0,0
5,22,24	8,7	27,0	0,0
5,7,24	7,5	1,7	11,5
5,7,22,24	9,2	29,8	11,5
8,24	6,9	0,0	0,0

LISTADO DE SECUENCIA

- 5 <110> Aventis Pharma S.A.
 <120> Cepas de levadura que producen colesterol y sus aplicaciones
 <130> PRJ02025
 <160> 7
 <170> PatentIn versión 3.1
- 10 <210> 1
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 1
cctagcgacg aaaagcatca ttggagtga taacttgac ttaccattct tagcattttg 60
- 15 **acg 63**
 <210> 2
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <400> 2
gcataagagt gaaacagaat tgagaaaaag acaggcccaa ttcaaattcg ggtcgaaaaa 60
agaaaagg 68
 <210> 3
 <211> 25

ES 2 390 588 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 3
 agggccgaac aaagccccga tcttc 25
 5 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 4
 10 ggcaaaccga ggaactctg 21
 <210> 5
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <400> 5
 tatatagcgg ccgcttgc tgattaatta cccag 36
 <210> 6
 <211> 34
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <400> 6
 tatatagcgg ccgcgagaag tgacgcaagc atca 34
 <210> 7
 <211> 270
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 7
 tagcgtggat ggccaggcaa ctttagtgct gacacatata ggcatatata tatgtgtgcg 60
 acgacacatg atcatatggc atgcatgtgc tctgtatgta tataaaactc ttgttttctt 120
 cttttctcta aatattcttt ccttatacat taggtccttt gtagcataaa ttactatact 180
 tctatagaca cgcaaacaca aaggaattga caagtttgta caaaaagca ggctaaaaaa 240
 tggaacctgc cgtgtcgctg gccgtgtgctg 270

REIVINDICACIONES

1. Cepa de levadura que produce de manera autónoma colesterol.
a partir de una cepa de carbono simple,
5 caracterizada por que expresa las enzimas heterólogas 7-dehidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxisterol Δ24-reductasa, y por que
la enzima esterol 24-C-metiltransferasa se ha inactivado.
2. Cepa de levadura según la reivindicación 1 en la que la enzima C-22 esterol desaturasa se ha inactivado.
3. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada porque la expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxisterol Δ24-reductasa se obtiene por transformación del organismo.
- 10 4. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la desactivación de la enzima esterol 24-C-metiltransferasa se realiza por desactivación génica.
5. Cepa de levadura según la reivindicación 2 caracterizada por que la inactivación de la enzima C-22 esterol desaturasa se realiza por inactivación génica.
- 15 6. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que se elige del género *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*.
7. Cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* caracterizada porque se trata de la cepa WGIF04 depositada ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) el 22 de abril de 2.004 con el número de registro I-3203.
- 20 8. Procedimiento de producción de colesterol de origen no animal que comprende el cultivo de un organismo según una de las reivindicaciones precedentes.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque la etapa de cultivo del organismo es seguida por una etapa de extracción del colesterol.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizada porque la extracción del colesterol se realiza con un disolvente no miscible con el agua.
- 25 11. Procedimiento según la reivindicación 9 ó 10, caracterizado porque se realiza una etapa de saponificación antes de la extracción del colesterol.
12. Procedimiento según la reivindicación 9, 10 u 11, caracterizado porque se realiza una etapa de trituración mecánica de las células antes de la saponificación o la extracción del colesterol.
- 30 13. Utilización de un organismo según una de las reivindicaciones 1 a 7 para la producción de colesterol o de uno de sus intermedios metabólicos o de una mezcla de esteroides marcada con ¹³C o con ¹⁴C.
14. Procedimiento de producción de colesterol o de uno de sus intermedios metabólicos o de una mezcla de esteroides marcada con ¹³C o con ¹⁴C que comprende las etapas siguientes:
- cultivo de un organismo según una de las reivindicaciones 1 a 7 sobre un sustrato marcado con ¹³C o con ¹⁴C, y
 - extracción de dicho colesterol, o de uno de sus intermedios metabólicos o de la mezcla de esteroides.
- 35 15. Procedimiento de fabricación de una mezcla isotópica de colesterol, de intermedios o de metabolitos de colesterol, marcados en diferentes posiciones mediante marcadores isotópicos, que comprende el cultivo de un organismo según una de las reivindicaciones 1 a 7 sobre un sustrato marcado y luego sobre un sustrato no marcado, eligiéndose la duración del cultivo sobre cada uno de estos sustratos con el fin de obtener un perfil isotópico definido.
- 40

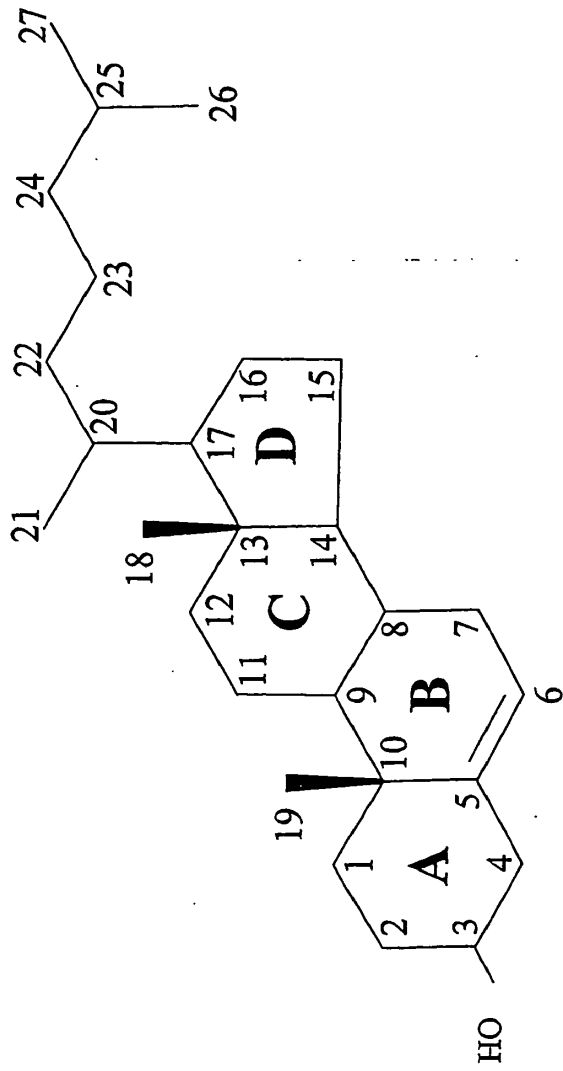


FIG. 1

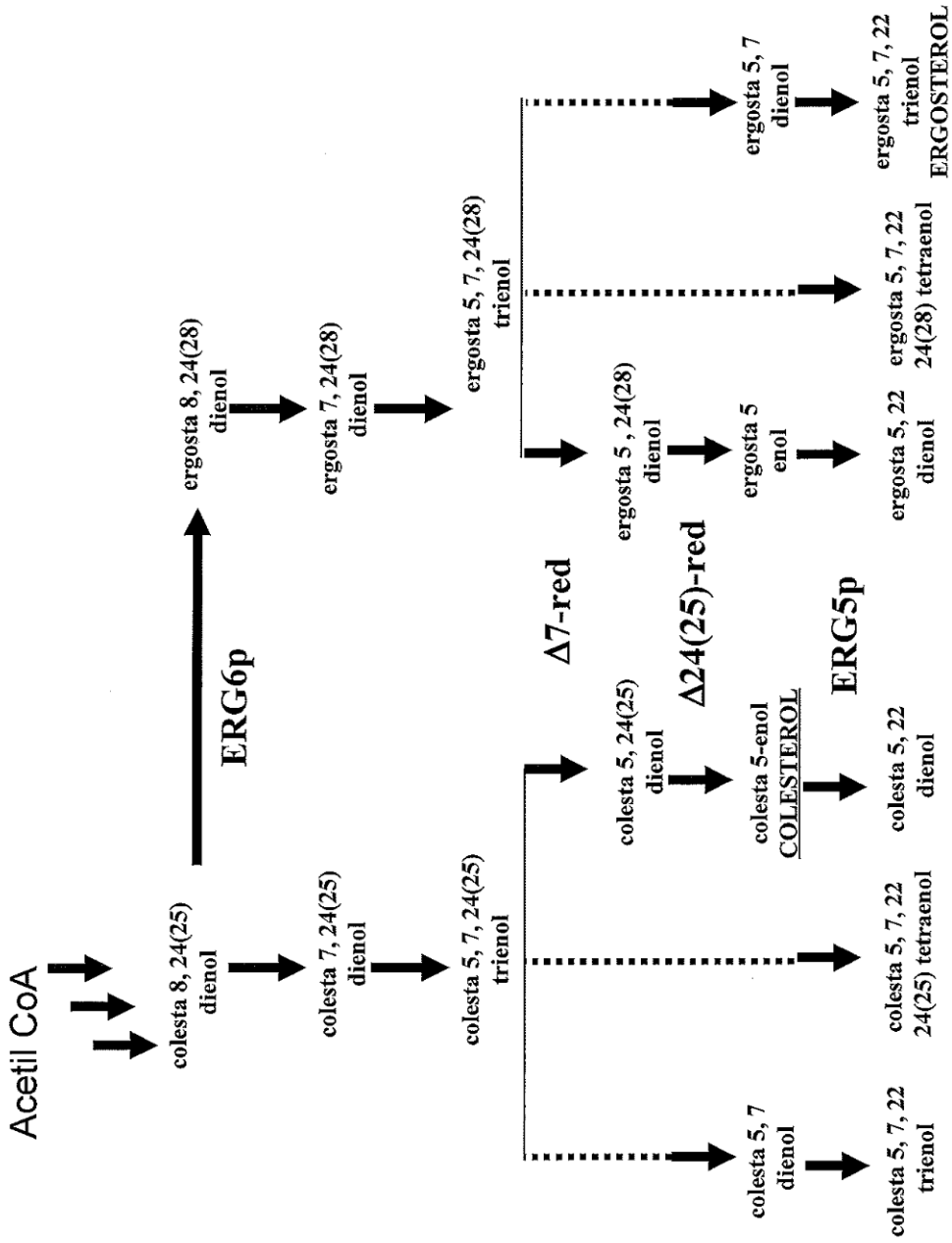
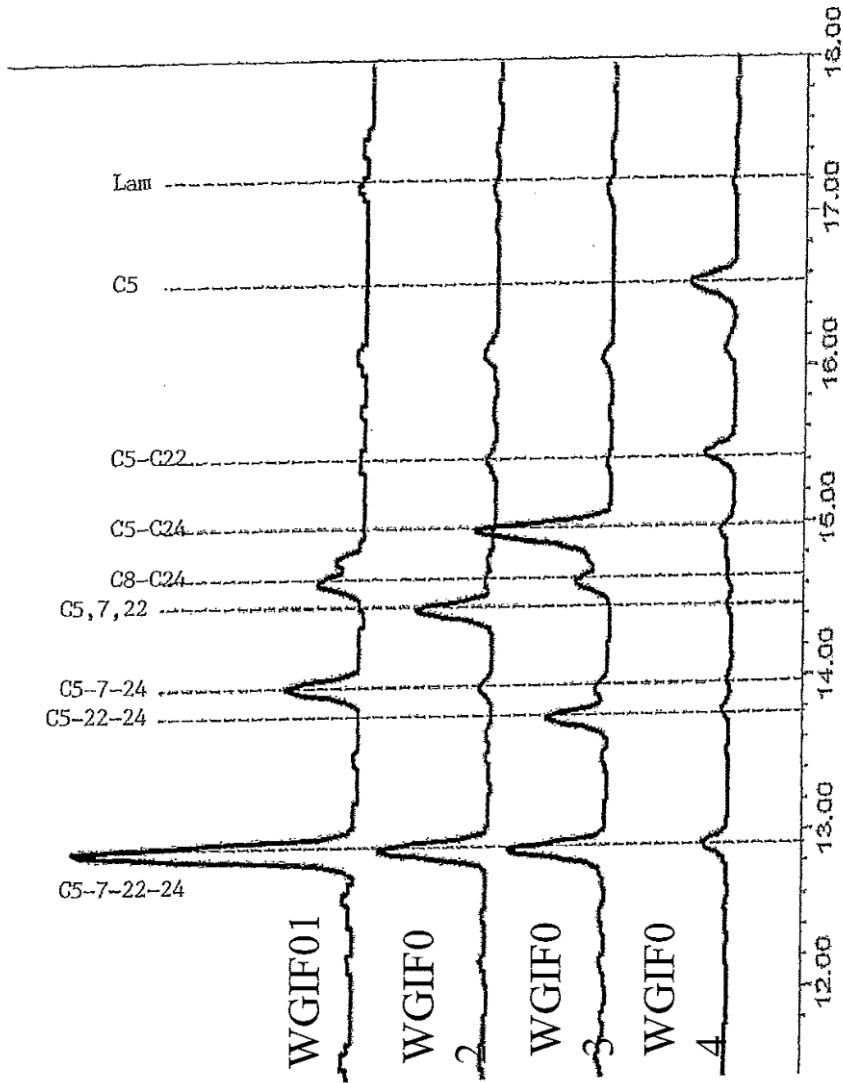


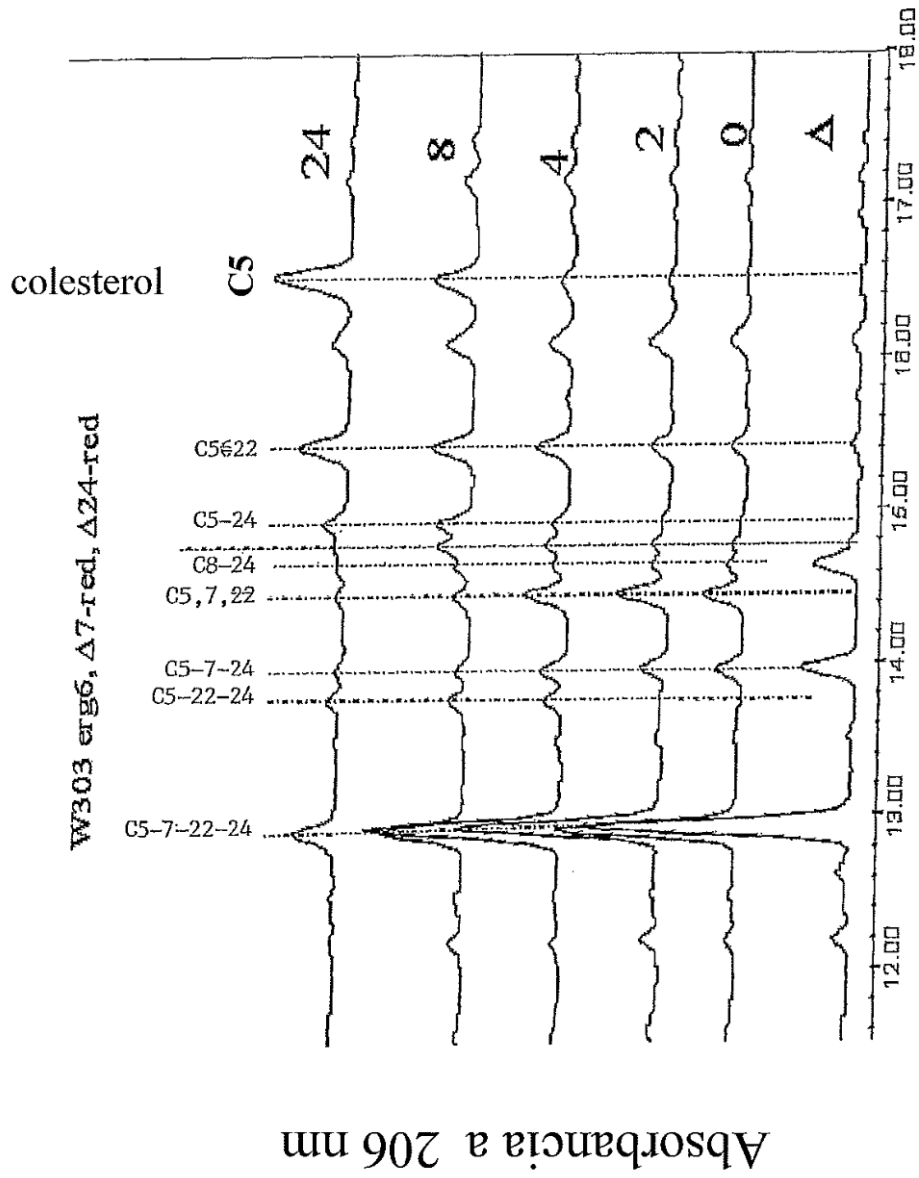
FIG. 2



Absorbancia a 206 nm

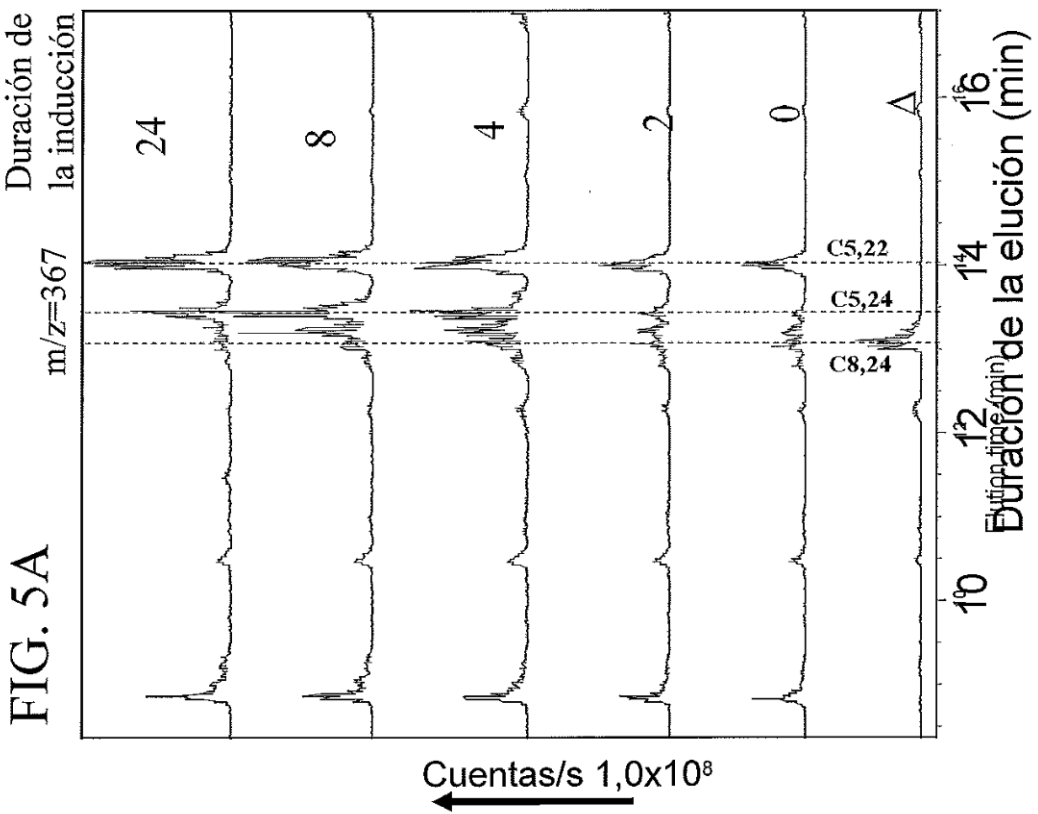
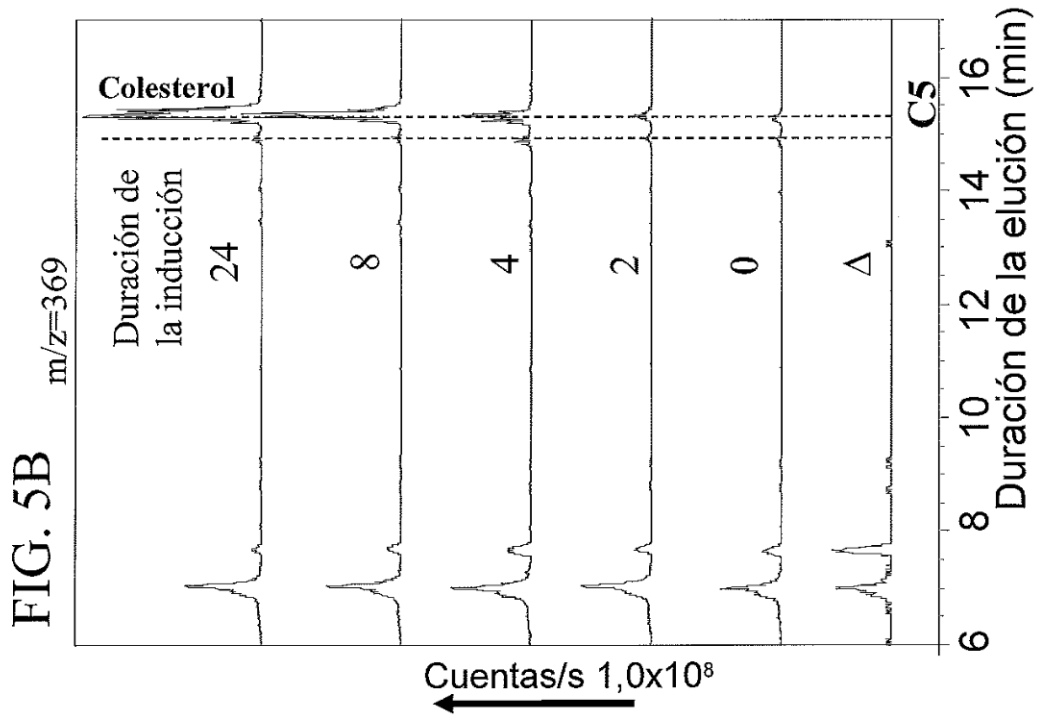
Duración de la elución (min)

FIG. 3



Duración de la elución (min)

FIG. 4



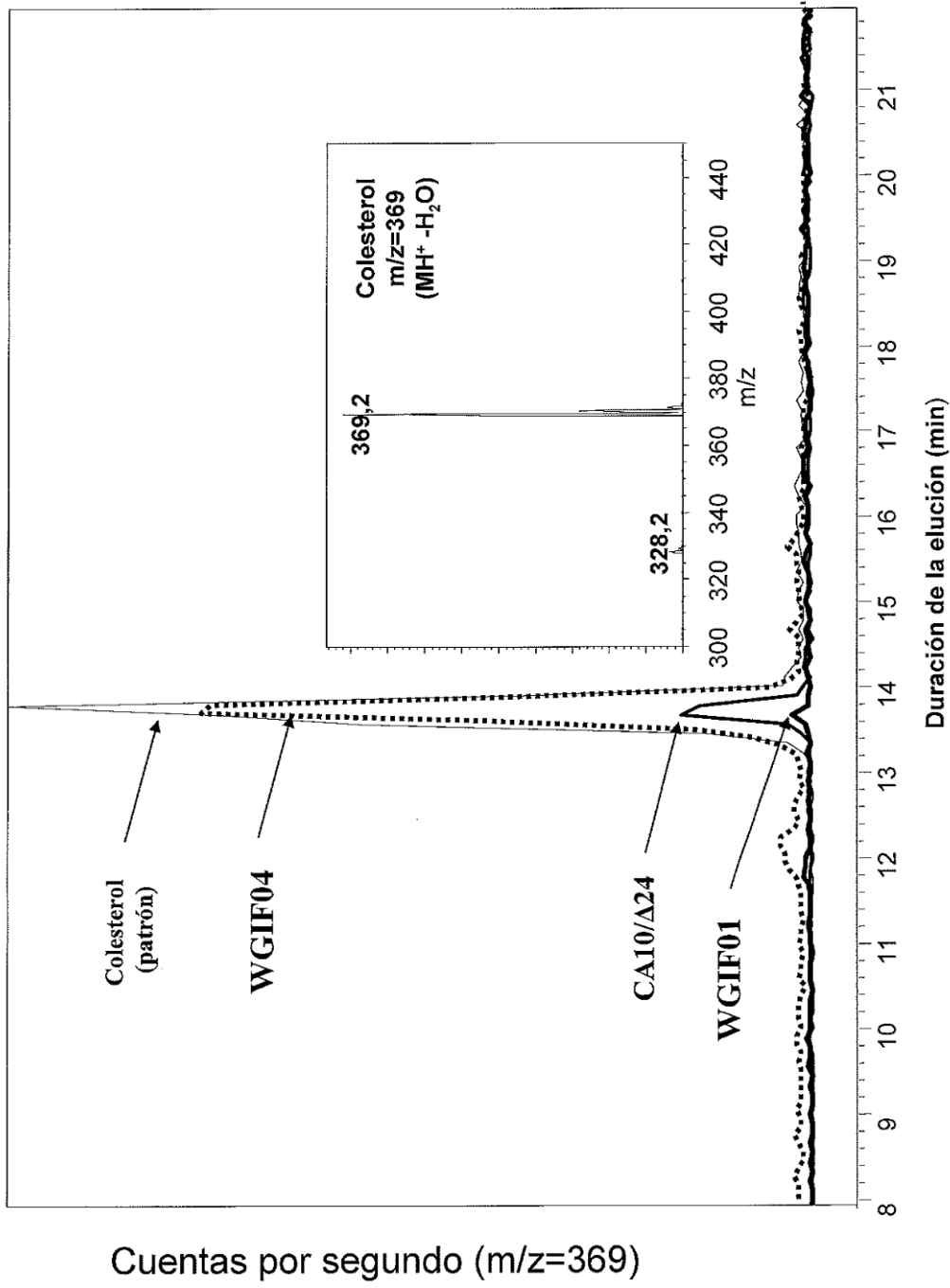


FIG. 6

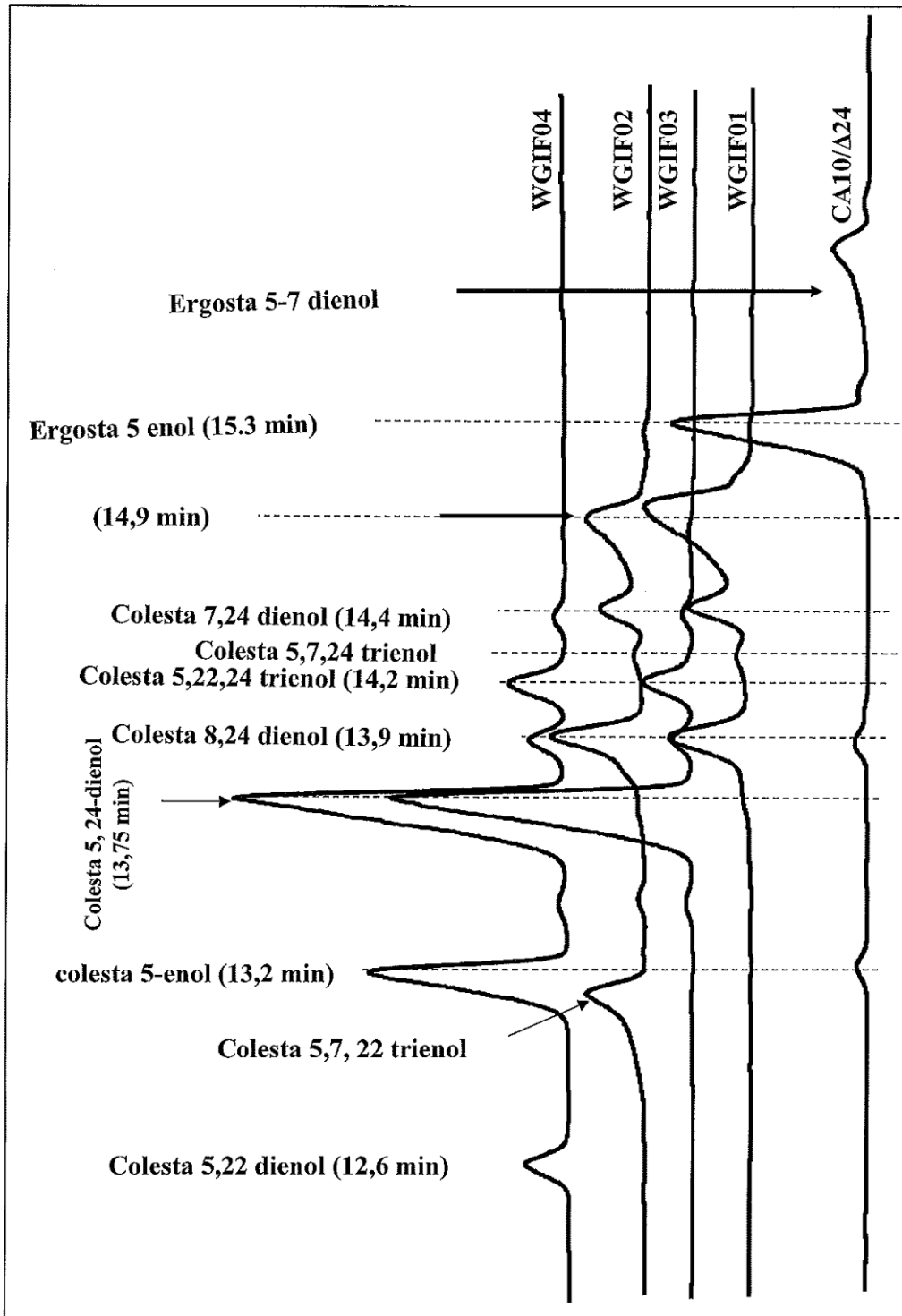
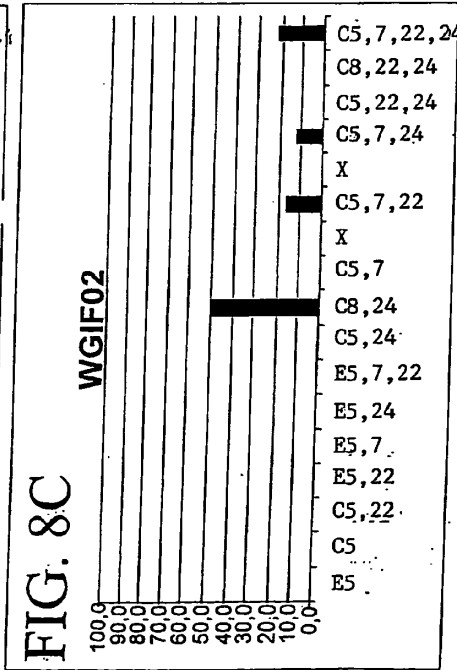
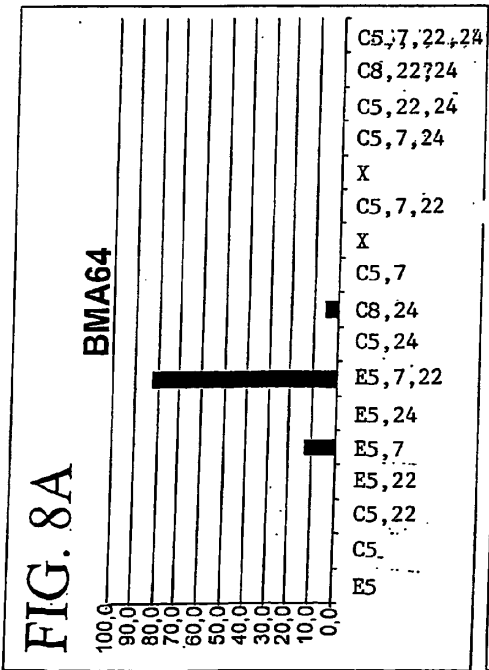
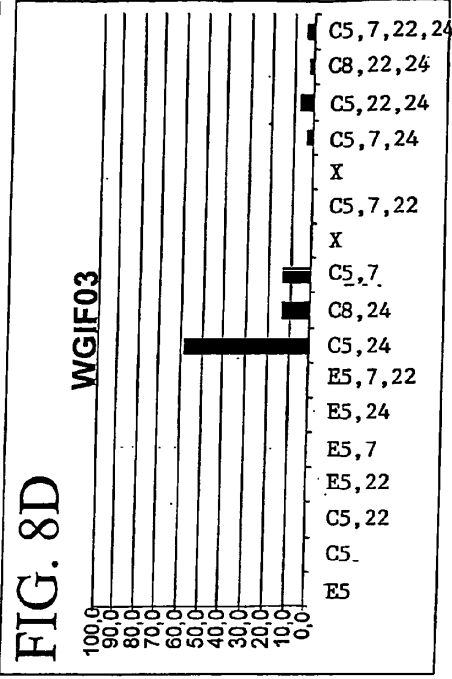
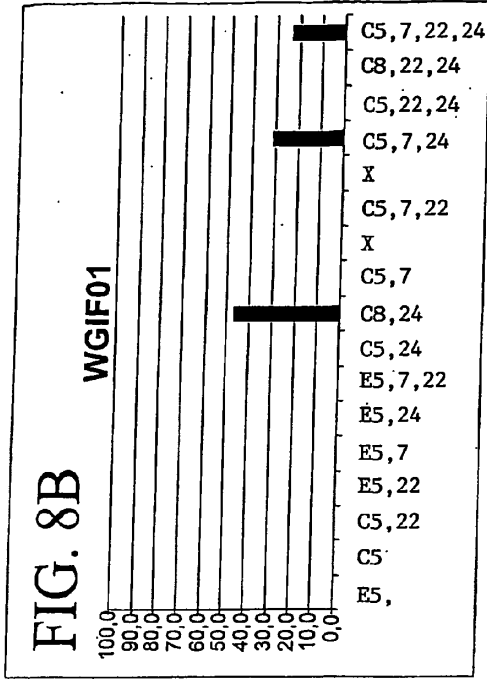


FIG. 7



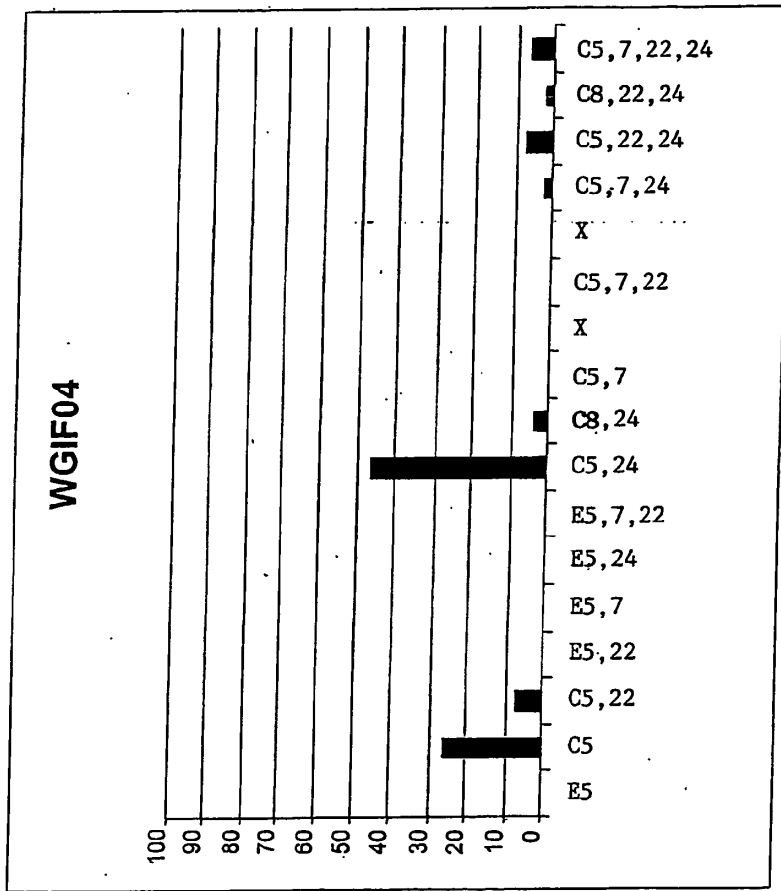


FIG. 9

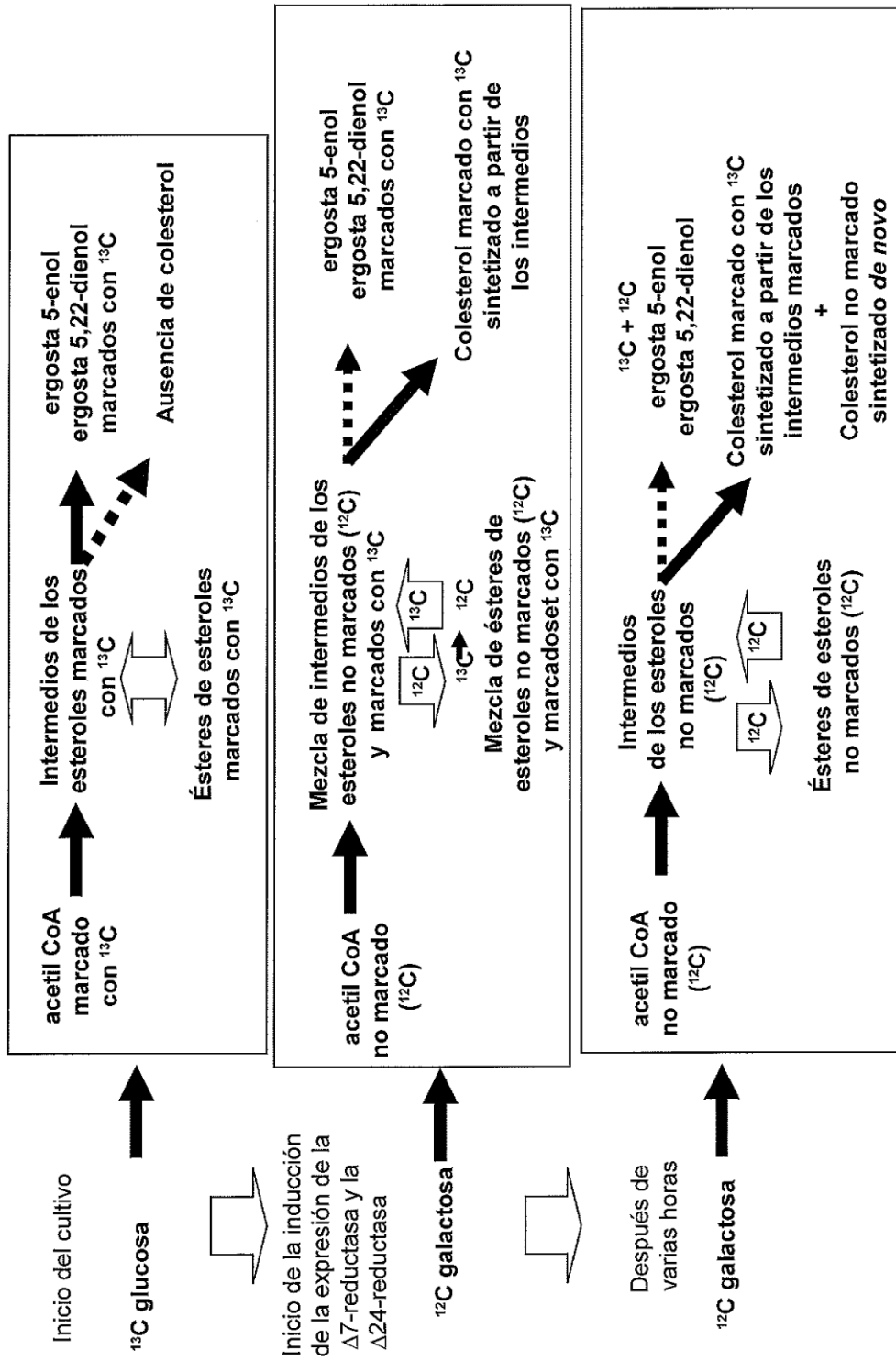
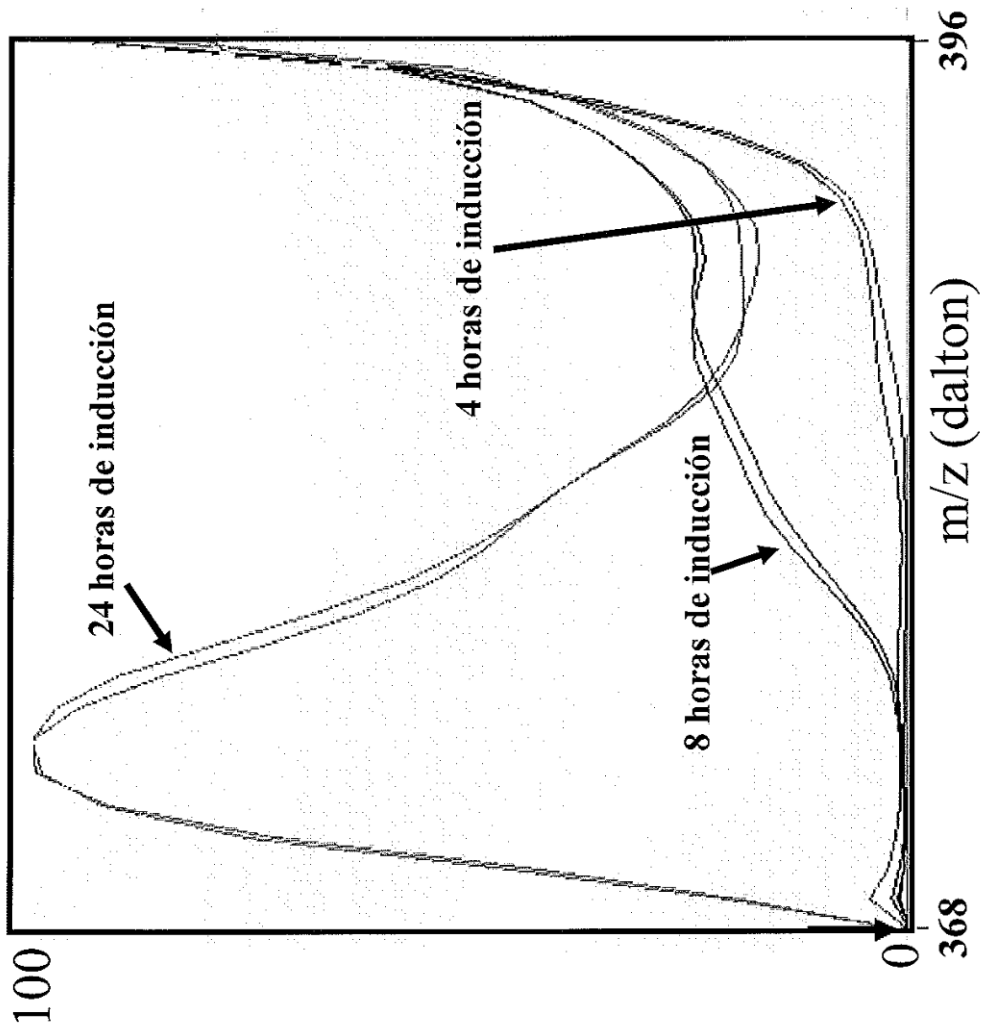


FIG. 10



Fracción de colesterol (%)
de la marcación máxima

FIG. 11

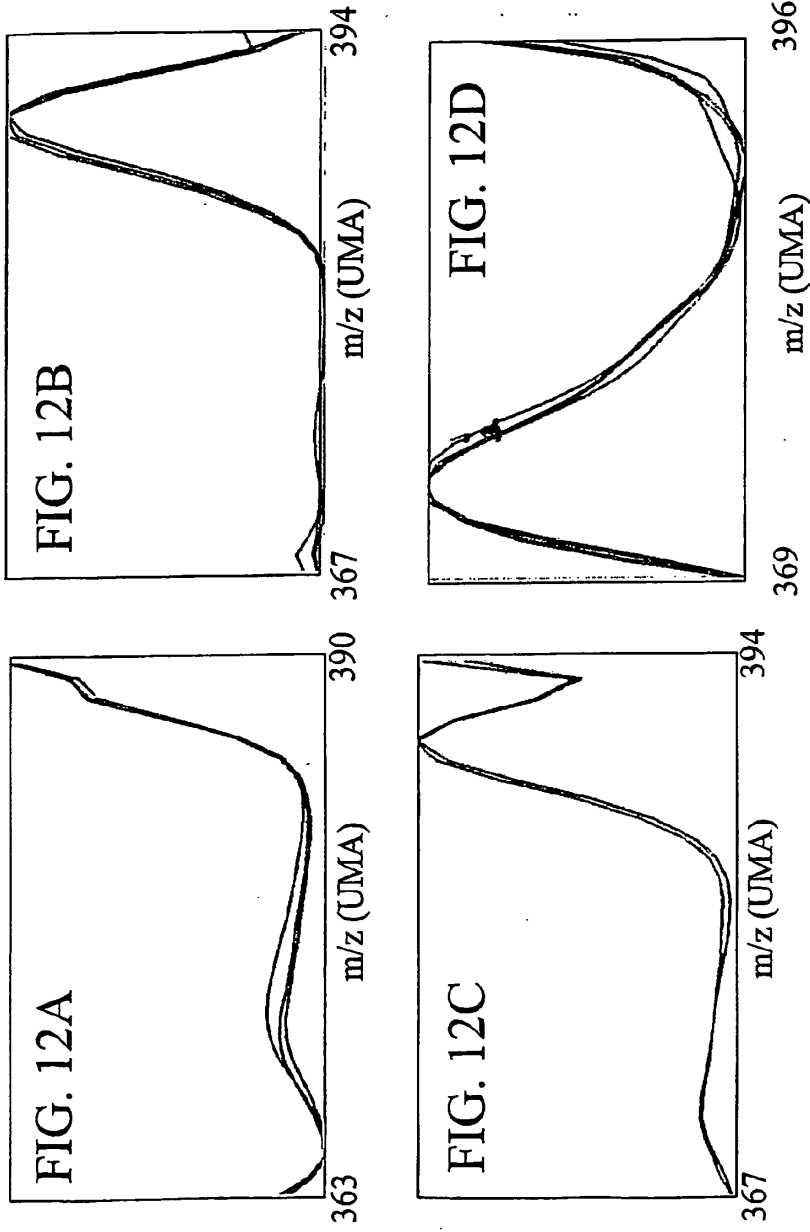


FIG. 12

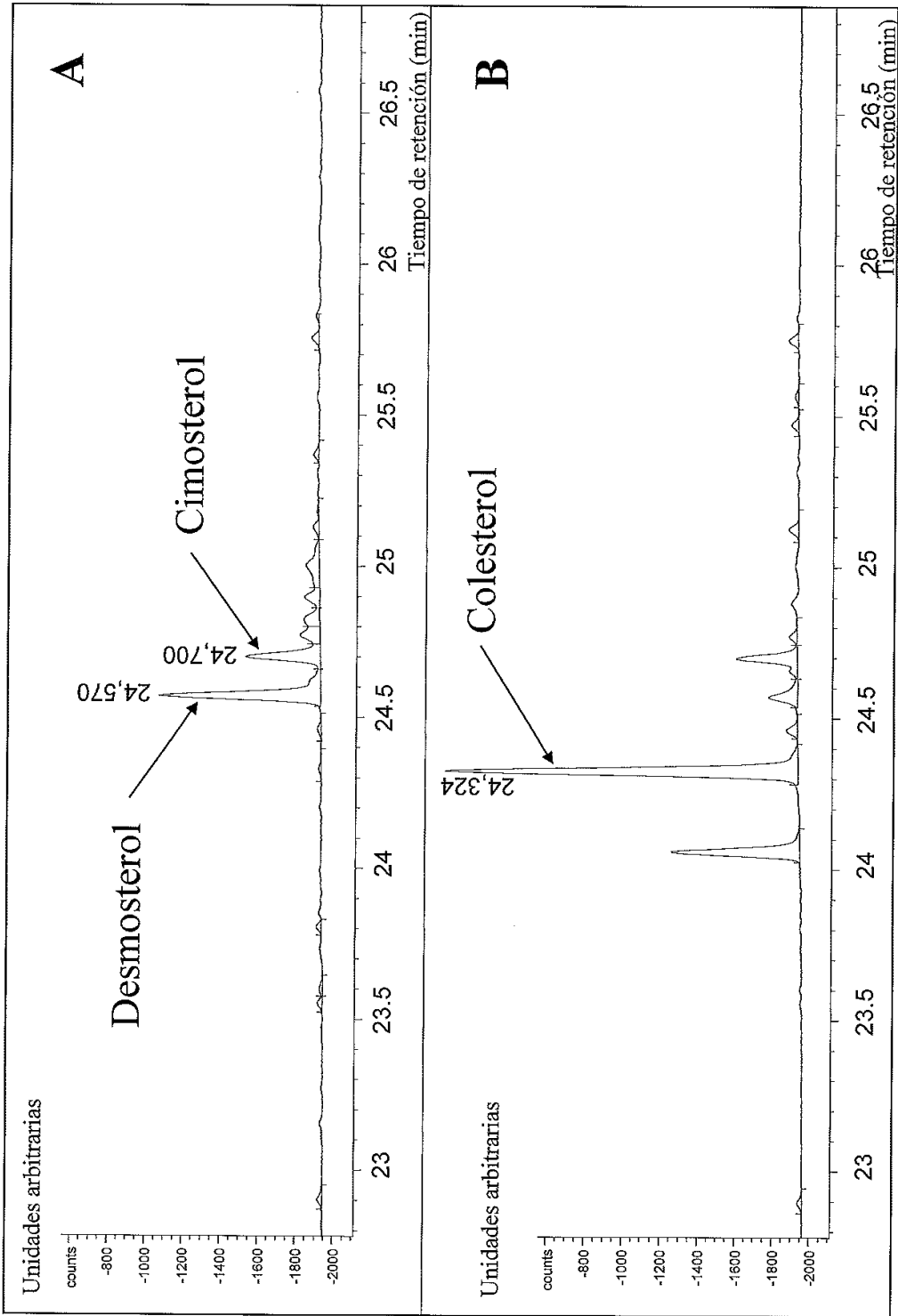


FIG. 13