

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 537**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

C07K 14/39 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2006 E 06764790 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2035556**

54 Título: **Procedimiento de producción de lipasa, célula de Yarrowia lipolytica transformada apta para producir dicha lipasa y sus aplicaciones**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2015

73 Titular/es:

**LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER (100.0%)
6, AVENUE DE L'EUROPE
78400 CHATOU, FR**

72 Inventor/es:

**LEBLOND, YVES;
MOUZ, NICOLAS;
MARTY, ALAIN y
URIBELARREA, JEAN-LOUIS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 550 537 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

Procedimiento de producción de lipasa, célula de *Yarrowia lipolytica* transformada apta para producir dicha lipasa y sus aplicaciones

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de lipasa que emplea células de levadura *Yarrowia lipolytica* productoras de una lipasa recombinante acidorresistente, permitiendo dicho procedimiento la obtención de una lipasa apta para emplearse como medicamento; la presente invención se refiere igualmente a una cepa de *Yarrowia lipolytica* sobreproductora de lipasa recombinante acidorresistente y a sus aplicaciones.

10 Los alimentos ingeridos diariamente por el hombre están constituidos esencialmente por lípidos, proteínas y azúcares. Todos estos constituyentes experimentan, antes de su absorción, una hidrólisis catalizada por las enzimas del tracto digestivo. Un déficit de alguna de estas enzimas puede conllevar por tanto problemas digestivos y conducir a una desnutrición importante. Es por ejemplo el caso en ciertas situaciones patológicas, como la mucoviscidosis o la insuficiencia pancreática exocrina, a las que está asociado un déficit de lipasa pancreática. Se ha propuesto clásicamente para corregir este déficit administrar por vía oral extractos pancreáticos. Sin embargo, la eficacia de esta terapia está limitada por el hecho de que las enzimas contenidas en estos extractos (lipasas, amilasas y proteasas) se inactivan rápidamente por la acidez del medio gástrico.

15 Se ha propuesto por tanto utilizar preparaciones de lipasas que resistan a las condiciones gástricas, tales como por ejemplo preparaciones de lipasa gástrica de mamíferos producidas por ingeniería genética, como la descrita en la solicitud de patente francesa publicada con el número 2.699.179 a nombre del INSTITUT DE RECHERCHE JOUVENIAL SA o preparaciones de lipasas de microorganismos que posean una actividad correcta en medio ácido [ZENTLER-MONRO *et al.*, Pancreas, 7, 311-319 (1992)].

20 Entre las lipasas de microorganismos activas en medio ácido, se citarán en particular las lipasas fúngicas, tales como las de *Candida ernobii*, [YOSHIDA *et al.*, Biochim. Biophys. Acta; 154, 586-588, (1968)], de *Trichosporon asteroides* [DHARMSTHITI *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 111-116 (1997)], de *Rhizopus javanicus* [(UYTTENBROECK *et al.*, Biol. Chem. Hoppe Seyler, 374, 245-254, (1993)] o de *Yarrowia lipolytica* [HADEBALL, Acta Biotechnol., 2, 159-167 (1991); NOVOTNY *et al.*, J. Basic Microbiol., 28, 221-227 (1988)]. Además de su actividad a pH ácido, estas lipasas presentan las características comunes de ser resistentes, en presencia de su sustrato, a la digestión por proteasas (tripsina, quimotripsina y pepsina) y de ser resistentes a la acción de las sales biliares (su actividad se conserva en presencia de taurocolato de sodio 10 mM).

25 Se ha descrito ya la utilización de *Yarrowia lipolytica* para la producción de un gen de interés. Así, la solicitud EP 1.108.043, a nombre del INRA y del CNRS, describe la utilización de un vector integrativo que comprende un módulo de expresión de un gen de interés y secuencias zeta, correspondientes a las secuencias de LTR del retrotransposón Ylt de *Yarrowia lipolytica*. Dicho vector de expresión permite la integración no homóloga y dispersada de varias copias del inserto de interés en el ADN genómico de una cepa de *Yarrowia lipolytica* desprovista de secuencias zeta. Este sistema se ha usado especialmente para la integración del gen *LIP2* que codifica una lipasa en el ADN de *Yarrowia lipolytica* y ha permitido, en condiciones de cultivo que no se detallan, una secreción de lipasa de 10 a 15 veces superior a la de cepas no transformadas.

30 Otros estudios describen la utilización del mismo vector de expresión que el descrito en la solicitud de patente EP 1.108.043 para la producción de una lipasa recombinante en *Yarrowia lipolytica* (solicitud internacional WO 01/83773; PIGNEDE *et al.*, Journal of Bacteriology, vol. 182, nº 10, pág. 2802-2810 (2000) y PIGNEDE *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, nº 8, p3283-3289 (2000)). Así:

35 - La solicitud internacional WO 01/83773, a nombre de Laboratoires MAYOLY SPINDLER, describe la obtención del clon de *Yarrowia lipolytica* MS4 (CNCM I-2294) que comprende 10 copias del módulo de expresión del gen *LIP2* integradas en su ADN, así como su utilización para la producción de lipasa con un rendimiento del orden de 0,5 g de lipasa por litro de sobrenadante de cultivo, y una actividad catalítica de 12.000 U/ml, medida usando aceite de oliva como sustrato, correspondiendo una unidad a la cantidad de enzima capaz de catalizar la liberación de 1 µmol de ácido graso por minuto, es decir, 200 veces más que la cepa inicial. No obstante, el procedimiento de producción de lipasa descrito en esta solicitud presenta un inconveniente importante, ya que emplea medios de cultivo que contienen bactopectona o bactotripton. Estos productos, que no están caracterizados y que contienen diversos hidrolizados proteicos, se utilizan clásicamente como fuente de nitrógeno y carbono. En consecuencia, el procedimiento descrito en esta solicitud no permite obtener una lipasa directamente utilizable como medicamento.

40 - PIGNEDE *et al.* (Journal of Bacteriology, 2000) han caracterizado más particularmente la lipasa extracelular codificada por el gen *LIP2* de *Yarrowia lipolytica* (cepa PO1d). En este artículo, se han estudiado así:

- 45 • la secreción de la lipasa a partir de diferentes cepas silvestres (PO1d en la que Yltl está ausente y E150 en la que Yltl está presente) y de diferentes cepas recombinantes como JMY184 (PO1d-6-15) y JMY279 (PO1d-6-17), así como
- 50 • la sobreproducción de lipasa especialmente por el transformante JMY184.

Este artículo de PIGNEDE *et al.* compara la producción de lipasa por cepas silvestres, cepas mutantes y cepas recombinantes obtenidas según el procedimiento descrito anteriormente (solicitud internacional WO 01/83773). Las cepas silvestres secretan entre 30 y 50 U de lipasa/ml, mientras que las cepas mutantes obtenidas por la acción de la *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (NNNG) producen 25 veces más lipasa, es decir, 1.200 U/ml en condiciones de cultivo optimizadas que hacen intervenir un medio que contiene peptona (medio de precultivo) y un medio que contiene suero lácteo (medio de fermentación) (véase igualmente DESTAIN *et al.*, 1997). Se obtienen las cepas recombinantes con la ayuda de la construcción que comprende el gen *LIP2* regulado por el promotor POX2 y mediante integración no homóloga, en copias múltiples y de forma dispersada, de este módulo de expresión. PIGNEDE *et al.* han obtenido transformantes estables (por ejemplo, la cepa JMY184) que producen 2.000 U/ml en condiciones no optimizadas, es decir, en medio YPDH (que comprende 10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de bactopectona, 10 g/l de glucosa y 10 g/l de aceite de oliva) correspondientes a aproximadamente 0,5 g de lipasa/l de sobrenadante. De la misma manera que anteriormente, las preparaciones de lipasa descritas por PIGNEDE *et al.* y por DESTAIN *et al.*, son inapropiadas, como tales, para un uso médico y más particularmente para la constitución de lotes clínicos, ya que su producción requiere la utilización de medios de cultivo que contienen peptonas o suero láctico.

- Prosiguiendo sus trabajos, el equipo de PIGNEDE (*Applied and Environmental Microbiology*, 2000) ha estudiado cepas de *Yarrowia lipolytica* transformadas por un vector que comprende un módulo de expresión del gen *LIP2*. Los autores han determinado que, para 8 de estos transformantes, el número de copias del módulo de expresión del gen *LIP2* está comprendido entre 6 y 16 (10 copias de media), lo que se traduce en 2 a 15 eventos de integración de dicho módulo en loci diferentes. La cepa JMY184 comprende así 12 copias del módulo de expresión del gen *LIP2*, integradas en 4 loci diferentes. Los autores han estudiado por otro lado más precisamente este transformante JMY184. Confirman que la cepa JMY184 produce 0,5 g de lipasa/l de sobrenadante con una actividad de 1.500 U/ml en medio rico YPDH (que contiene bactopectona) (frente a 50 U/ml para una cepa silvestre PO1d), medida utilizando aceite de oliva como sustrato. Estos valores permiten deducir una actividad específica de aproximadamente 3.000 U/mg de lipasa. Los autores anuncian además que la producción optimizada de lipasa en fermentador por la cepa JMY184 permite obtener preparaciones que tienen una actividad de hasta 10.000 U/ml. No obstante, las condiciones de cultivo que han permitido este resultado no se han divulgado. En este artículo, los autores han estudiado además la estabilidad en cultivo de estos transformantes, y especialmente del clon JMY184, y han mostrado su estabilidad durante 120 generaciones. PIGNEDE *et al.* han considerado que, para optimizar la producción de lipasa, los factores a tener en cuenta son la estabilidad de los transformantes y las condiciones de cultivo.

Por otro lado, han mostrado que existe una fuerte correlación entre el número de copias del gen *LIP2* integradas y la sobreproducción de lipasa.

No obstante, para la producción de lipasa, los únicos medios de cultivo contemplados en este artículo son medios que contienen peptonas, tales como el medio rico YPDH.

Los procedimientos de producción de lipasa de la técnica anterior, aunque permiten obtener rendimientos mejorados de lipasa, no están adaptados a la producción de una lipasa apta para utilizarse con fines médicos.

Efectivamente, los medios de cultivo habitualmente empleados contienen todas mezclas no caracterizadas y/o productos de origen animal, tales como peptonas, triptonas o suero láctico. Existe por tanto la necesidad de desarrollar un sistema que permita la producción de preparaciones de lipasa recombinante adaptada a un uso médico.

Para resolver este problema, los inventores han elaborado un procedimiento de producción de lipasa que responde mejor a estas necesidades que los procedimientos de producción de la técnica anterior. Más precisamente, los inventores han elaborado un procedimiento de producción de lipasa en el que el medio de cultivo empleado está desprovisto de los productos anteriormente citados, es decir, que no contiene ningún producto de origen animal ni ninguna mezcla no caracterizada, tal como peptona, triptona o suero láctico. Los inventores han seleccionado además una nueva cepa de *Yarrowia lipolytica* recombinante productora de la lipasa Lip2 que, asociada a dicho procedimiento, permite además aumentar de manera significativa el rendimiento de la lipasa producida.

La presente invención tiene por tanto como objeto un procedimiento de producción de lipasa que emplea una cepa de *Yarrowia lipolytica* transformada por un vector que comprende un módulo de expresión de una lipasa acidorresistente de levadura, caracterizado porque el medio de cultivo utilizado no contiene productos de origen animal ni mezclas no caracterizadas tales como peptona, triptona o suero láctico.

Más precisamente, la presente invención tiene como objeto un procedimiento de producción de lipasa recombinante que comprende:

a) una etapa de puesta en cultivo de células de *Yarrowia lipolytica* transformadas por un vector de expresión que comprende un módulo de expresión de una lipasa acidorresistente de levadura, en condiciones que permiten la producción de lipasa;

b) una etapa de recuperación, en el transcurso de la cual se recoge, en el sobrenadante de dicho cultivo, la lipasa recombinante así producida por dichas células;

estando caracterizado dicho procedimiento porque la etapa a) de puesta en cultivo se pone en práctica en un medio de cultivo desprovisto de productos de origen animal o de mezclas no caracterizadas constituidas por materiales proteicos de origen animal (suero láctico, por ejemplo) o de sus productos de digestión enzimática (triptona o peptona, por ejemplo),

y porque dicha etapa a) comprende:

a1) el precultivo de las células transformadas de *Yarrowia lipolytica* en un medio que contiene una fuente de carbono de origen glucídico, nitrógeno mineral, preferiblemente sulfato de amonio, y sales minerales, oligoelementos y vitaminas; y

a2) una etapa de fermentación que comprende una fase de crecimiento celular en un medio que contiene como única fuente de carbono una fuente de carbono de origen glucídico, nitrógeno mineral y sales minerales, oligoelementos y vitaminas, y una fase de producción de lipasa en un medio que contiene como única fuente de carbono ácido oleico, nitrógeno mineral y sales minerales, oligoelementos y vitaminas.

La fermentación se emplea ventajosamente con una pO_2 constante comprendida entre 15 y 25 % y un pH preferiblemente inferior a 6,5. La fermentación puede emplearse, por ejemplo, con un caudal de aire de aproximadamente 1 vvm, siendo una unidad vvm 1 volumen de aire por volumen de líquido por minuto (por ejemplo, para un fermentador de 30 l, 1 vvm es igual a 30l/min y para un fermentador de 5 l, 1 vvm es igual a 5 l/min).

Según una disposición ventajosa de este modo de empleo, se realiza la etapa a1) de precultivo hasta alcanzar un valor de DO_{600nm} comprendido entre 3 y 10 para 1 ml, y en la etapa a2) de fermentación, se inicia dicha fase de síntesis de lipasa cuando la DO_{600nm} del cultivo alcanza un valor comprendido entre 60 y 70 para 1 ml.

Según otra disposición ventajosa de este modo de empleo, se inicia la etapa b) cuando la D_{600nm} alcanza un valor comprendido entre 300 y 350 por ml. La etapa b) puede comprender además:

b1) la separación de la lipasa de dicho sobrenadante de cultivo;

b2) la purificación de la lipasa obtenida en b1).

Estas dos etapas se realizan mediante técnicas clásicas en sí conocidas: separación física (filtración, cromatografía, centrifugación) o fisicoquímica (precipitación).

La separación de la lipasa del sobrenadante puede ponerse en práctica por el especialista en la materia, por ejemplo, mediante una técnica elegida entre filtración tangencial en fibra hueca, filtración frontal y centrifugación continua o discontinua.

La purificación de la lipasa consiste especialmente en reducir la biocarga, es decir, la presencia de microorganismos, y puede ponerse en práctica mediante cualquier técnica de purificación adecuada conocida por el especialista en la materia, tal como una técnica elegida entre filtración, precipitación fraccionada, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía por filtración en gel.

Opcionalmente, el procedimiento de producción de lipasa según la invención puede comprender igualmente una etapa de concentración, o enriquecimiento, consistente en el aumento de la concentración de lipasa en la preparación. Puede emplearse una de dichas etapas, por ejemplo, después de la etapa de purificación. Puede tener lugar igualmente de forma simultánea a esta etapa de purificación.

El procedimiento de producción según la invención permite especialmente producir lipasa recombinante en cantidades situadas entre aproximadamente 1 a 3 g de lipasa purificada por litro de sobrenadante de cultivo. De manera particularmente ventajosa, el procedimiento según la invención permite la obtención de una preparación de lipasa recombinante codificada por el gen Lip2 o LIP2 con una actividad catalítica superior a 15.000 U por ml de sobrenadante de cultivo. Preferiblemente, dicha preparación posee una actividad superior a 20.000 U/ml de sobrenadante de cultivo. Estos valores se determinan a pH 6 utilizando trioctanoína como sustrato. Este valor de actividad de la preparación de lipasa reviste un interés muy particular en el marco del desarrollo de productos farmacéuticos. Es efectivamente ahora factible administrar dosis reducidas de lipasa, producida mediante el procedimiento según la invención, manteniendo una eficacia suficiente para obtener el efecto terapéutico deseado, que puede ser por ejemplo la corrección de una malabsorción de grasa ligada a una insuficiencia pancreática asociada a un déficit de lipasa.

El hecho de poder producir a partir de ahora la lipasa Lip2 utilizando cepas de *Yarrowia lipolytica* recombinantes sin recurrir a productos de origen animal, como es el caso con el procedimiento según la invención, constituye una ventaja considerable y facilita en gran medida la utilización de la lipasa con fines médicos.

El vector de expresión utilizado para obtener las células de *Yarrowia lipolytica* recombinantes utilizadas en el procedimiento de la presente invención es un vector integrativo que posee al menos una copia del gen *LIP2* y elementos de regulación de la expresión. Este vector puede integrarse entonces en ADN plasmídico o en ADN genómico de la levadura. Es un ejemplo de vector integrativo particularmente preferido el vector JMP6 o el vector JMP10 tales como se describen en la solicitud internacional WO01/83773. El vector JMP6 comprende un módulo de expresión del gen *LIP2* que codifica el precursor Lip2p de la lipasa Lip2 de *Yarrowia lipolytica*, en dirección 5' del cual está dispuesto el promotor de acil-CoA oxidasa AC02 de *Yarrowia lipolytica*, denominado POX2. El vector JMP10 comprende igualmente el gen *LIP2*, en dirección 5' del cual se encuentra el promotor de lipasa Lip2 de *Yarrowia lipolytica*. Estos dos promotores son inducibles por triglicéridos y ácidos grasos. En cada uno de estos vectores, el módulo de expresión y el promotor están dispuestos entre secuencias zeta como se describen anteriormente. La integración puede ser orientada, es decir dirigida a los sitios, o bien aleatoria. Así, cuando la cepa de *Yarrowia lipolytica* transformada está desprovista de secuencia zeta (es por ejemplo el caso de la cepa PO1d), la integración del módulo de expresión se dispersa en el ADN genómico de dicha cepa. En contraposición, cuando la cepa de *Yarrowia lipolytica* implica secuencias zeta (es por ejemplo el caso de la cepa E150), la integración está principalmente orientada al nivel de estas secuencias.

Según otro modo de puesta en práctica ventajoso de dicho procedimiento, la cepa transformada de *Yarrowia lipolytica* es preferiblemente la cepa denominada YL-LIP2-6C, depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, el 15 de diciembre de 2005, con el número I-3542. Esta cepa YL-LIP2-6C es genéticamente estable.

En el sentido de la presente invención, las expresiones “estable”, “genéticamente estable”, “estabilidad genética”, así como sus variantes, se utilizan con referencia a la conservación de un mismo número de loci de integración de un ácido nucleico de interés en el ADN del clon considerado, durante al menos 30 generaciones. Este número de 30 generaciones se elige como base de cálculo de la estabilidad genética pues los inventores han comprobado que corresponde al número de duplicaciones de la población celular suficientes para permitir la producción de lipasa utilizando un procedimiento que comprende al menos una etapa de precultivo de células *Yarrowia lipolytica* recombinantes y una etapa de producción de lipasa propiamente dicha en condiciones de fermentación. En el sentido de la presente invención, se define una generación por la duplicación de la población celular, y puede calcularse según la fórmula $Y = X \cdot 2^g$ en que Y es la población celular a tiempo t (por ejemplo, expresada en densidad celular), X es la población de celular inicial a tiempo t_0 y g representa el número de generaciones necesario para que la población celular pase del valor X al valor Y. Preferiblemente, el clon se dice genéticamente estable cuando al menos un 90 % de las colonias analizadas, después de al menos 30 generaciones, contiene el mismo número de loci del gen de interés que el clon de partida. Así, como se deduce por los ejemplos, el clon YL-LIP2-6C se dice estable pues casi el 100 % de las colonias analizadas después de 100 generaciones contienen 6 loci del gen *LIP2* (un locus correspondiente al gen *LIP2* endógeno + 5 loci de integración del módulo de expresión del gen *LIP2*).

Sorprendentemente, cuando el procedimiento según la invención emplea esta cepa particular, los inventores han conseguido producir lipasa recombinante en gran cantidad y tener un mejor control de dicha producción. Los inventores han conseguido efectivamente mejorar el rendimiento de producción de lipasa y han podido obtener especialmente una producción del orden de 1 a 3 g de lipasa pura por litro de sobrenadante de cultivo. Han podido obtener igualmente preparaciones de lipasa que presentan una actividad cercana a 20.000 U/ml.

En el sentido de la presente invención, la actividad de la lipasa corresponde a su actividad enzimática. La actividad catalítica de una disolución de lipasa se expresa en unidades (U) por ml de disolución analizada. La actividad específica se expresa en unidades (U) por mg de proteína (lipasa) purificada. Una unidad corresponde a la cantidad de enzima capaz de catalizar la liberación de 1 μ mol de ácido graso por minuto. La actividad específica de una lipasa varía en función de la naturaleza del triglicérido utilizado como sustrato.

Además de la mejora del rendimiento de producción de la lipasa, los inventores han podido asegurar igualmente una mejor reproducibilidad del procedimiento de producción, mejorar la homogeneidad del producto final y mejorar las condiciones de purificación de la lipasa.

Estas diferentes modificaciones permiten por tanto obtener una lipasa que responde a las condiciones requeridas para el uso médico. Efectivamente, en el marco de su investigación, los inventores han observado ahora que la lipasa Lip2 es activa a valores de pH superiores a 3 y hasta un valor de pH cercano a 8, con una actividad óptima para un pH comprendido entre 5 y 6. En contraposición, se inactiva de manera irreversible en una incubación de 2 horas a pH 3 o pH 8,5. Se ha analizado igualmente la actividad específica de la lipasa Lip2 en función de los diferentes sustratos y los inventores han determinado a pH 4 valores de aproximadamente 10.760 U/mg, aproximadamente 16.920 U/mg y aproximadamente 12.260 U/mg de lipasa purificada, respectivamente, con triglicéridos de cadena corta (tributirina), media (trioctanoína) y larga (aceite de oliva). Por último, los inventores han comprobado sorprendentemente que la lipasa Lip2 es activa en presencia de sales biliares y que esta actividad aumenta con la concentración de sales biliares. Esta actividad en presencia de sales biliares se había observado hasta ahora solamente con la lipasa gástrica y la lipasa pancreática asociada a la colipasa. Así, la utilización de lipasa Lip2 con una actividad específica importante no requiere la presencia de colipasa.

El clon YL-LIP2-6C contiene muchas copias del módulo de expresión de esta lipasa Lip2 que se traducen en 5 eventos de integración del gen *LIP2* en loci diferentes. Cuando se pone en condiciones adaptadas a la producción de lipasa, el clon YL-LIP2-6C produce más lipasa que las cepas transformadas de *Yarrowia lipolytica* de la técnica anterior. La lipasa se produce según un rendimiento superior a 1 g/l de sobrenadante de cultivo, es decir, superior al rendimiento observado con los clones de la técnica anterior descritos anteriormente.

La presente invención tiene igualmente como objeto una preparación de lipasa susceptible de obtenerse mediante el procedimiento según la invención.

Según un modo de realización ventajoso de dicha preparación de lipasa, presenta una actividad al menos igual a 15.000 U/ml, preferiblemente superior a 20.000 U/ml cuando se determina como se indica anteriormente.

La invención tiene además como objeto la utilización de la preparación de lipasa según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una patología asociada a una desregulación de la absorción de grasas (por ejemplo, ácidos grasos de cadenas cortas, medias o largas), especialmente ligado a una insuficiencia pancreática, especialmente exocrina.

La invención tiene igualmente como objeto un medicamento, caracterizado porque comprende una preparación de lipasa tal como se define anteriormente.

La presente invención tiene igualmente como objeto una célula de *Yarrowia lipolytica* transformada por un vector de expresión de una lipasa acidorresistente de levadura, caracterizada porque se trata del clon denominado YL-LIP2-6C, depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, el 15 de diciembre de 2005, con el número I-3542.

La presente invención tiene, además, como objeto la utilización de una célula tal como se define anteriormente para la producción de la lipasa acidorresistente de levadura codificada por el gen Lip2 o LIP2.

Además de las disposiciones precedentes, la invención comprende también otras disposiciones que se deducirán de la descripción siguiente, que se refiere a ejemplos de puesta en práctica del procedimiento objeto de la presente invención así como a los dibujos adjuntos, en los que:

– La figura 1 representa el enfoque global de control de la estabilidad genética del clon YL-LIP2-6C en el transcurso del procedimiento de producción de lipasa.

– La figura 2 representa la variación de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600} , eje de ordenadas a la izquierda) ($-\blacklozenge-$) y la variación de la tasa de crecimiento (h^{-1} , eje de ordenadas a la derecha ($-\blacksquare-$)) en función del tiempo (horas, eje de abscisas) durante el procedimiento de fermentación. La flecha indica la inducción de la producción de lipasa.

– La figura 3 representa el análisis por transferencia Southern del número de eventos de integración del gen *LIP2* en loci diferentes en el genoma de 23 colonias (carriles 24 a 43) extraídas a tiempo T33, correspondiente al final de la fermentación aproximadamente 100 horas después del inicio de la fermentación. Copias 1 a 6: 6 loci del gen *LIP2* (5 loci para la integración del módulo de expresión del gen *LIP2* + un locus para el gen *LIP2* endógeno). M: marcador de tamaño.

– La figura 4 representa el seguimiento, por PAGE-SDS, de la producción de lipasa recombinante por el clon YL-LIP2-6C durante el procedimiento de producción, de T16 a T33. La flecha indica la inducción de la producción de lipasa (T17, 48 horas de la fermentación). M: escala de peso molecular; los cinco carriles de la parte derecha del gel corresponden a cantidades conocidas (2,5 μ g a 20 μ g) de la lipasa Lip2 purificada.

– La figura 5 representa el análisis, por PAGE-SDS, de la pureza de la lipasa en el sobrenadante a tiempo T33 (final del procedimiento de fermentación). PM: escala de peso molecular; Ref.Lip2 F5: intervalo de lipasa Lip2 de 1 a 10 μ g; sobrenadante de YL-LIP2-6C: volúmenes en μ l del sobrenadante analizado.

– La figura 6 representa el espectro de masas, determinado por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOFF, de la lipasa recombinante producida por el clon YL-LIP2-6C.

45 EJEMPLO 1- MATERIALES Y MÉTODOS

1) Medios utilizados

Las concentraciones finales indicadas son las concentraciones en las disoluciones madre.

ES 2 550 537 T3

Medio básico 02130S no enriquecido

Ingredientes	Concentración final
Glucosa	10 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
Na ₂ HPO ₄	3 g/l
H ₃ BO ₃	0,34 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g/l
C ₅ H ₈ O ₄ NNa (glutamato)	1 g/l
MgSO ₄	0,5 g/l
CaCl ₂	0,023 g/l
MnSO ₄	0,038 g/l
ZnSO ₄	0,04 g/l

El medio 02130S enriquecido comprende además los aditivos siguientes:

Aditivos	Concentración final
Disolución de oligoelementos	1 ml/l
Disolución de vitaminas	1 ml/l

Composición de la disolución de oligoelementos

Ingredientes	Concentración final
CoCl ₂	0,5 g/l
Na ₂ MoO ₄	0,06 g/l
CuSO ₄	0,9 g/l

Composición de la disolución de vitaminas

Ingredientes	Concentración final
D-biotina	0,05 g/l
Pantotenato de calcio	1 g/l
Ácido nicotínico	1 g/l
Mioinositol	25 g/l
Tiamina-HCl	0,25 g/l
Piridoxol-HCl	0,25 g/l
Ácido p-aminobenzoico	0,05 g/l

5 Composición de la disolución de sales minerales

Ingredientes	Concentración final
MgSO ₄	26,76 g/l
CaCl ₂	6,40 g/l
FeSO ₄	5,61 g/l

Ingredientes	Concentración final
CoCl ₂	0,29 g/l
ZnSO ₄	7,72 g/l
Na ₂ MoO ₄	0,09 g/l
H ₃ BO ₃	0,34 g/l
MnCl ₂	0,47 g/l
CuSO ₄	0,61 g/l

Composición de la disolución de FeSO₄

Ingredientes	Concentración final
FeSO ₄	0,9 g/l

Disolución de amoniaco, 14 %

Disolución antiespumante: Struktol 1673 diluido 1/10 (Schill+Seilacher AG, Moorfleeter Str.28, 22113, Hamburgo, Alemania)

5 2) Extracción del ADN genómico y análisis de transferencia Southern

a) Extracción del ADN genómico

Se pone en suspensión el sedimento celular obtenido a partir de un cultivo de 4 ml en 0,5 ml de tampón de sorbitol (sorbitol 0,9 M; Tris-HCl 0,1 M, pH= 8,0; EDTA 0,1 M). Se añaden 50 µl de Zymolase® 20T (6 mg/ml) (Euromedèx, 67458 Mundolsheim cedex, Francia) y 50 µl de 2-mercaptoetanol 0,28 M y se incuba la disolución 1 hora a 37 °C con agitación (180 rpm). Se somete la disolución a centrifugación y se pone en suspensión el sedimento en 0,5 ml de tampón TE (Tris-HCl 50 mM, pH= 8; EDTA 20 mM). Se añaden 50 µl de SDS al 10 %, se mezcla la disolución por inversiones y se incuba durante 20 min a 65 °C. Se añaden 0,2 ml de acetato de potasio 5 M y después se mezcla la disolución, se mantiene en hielo durante 30 min y después se centrifuga durante 5 min.

Se transfiere el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml y después se añaden 0,8 ml de etanol al 100 %, previamente enfriados en hielo. Se mezcla la disolución por inversiones y después se centrifuga. Después de la eliminación del sobrenadante, se añaden 0,4 ml de tampón TE que contiene ARNasa A 100 µg/ml (Invitrogen, EE.UU.) y se incuba la disolución durante 1 hora a 37 °C. Después de añadir 1 ml de etanol al 100 %, previamente enfriado en hielo, se mezcla delicadamente la disolución hasta la precipitación del ADN y después se centrifuga. Se elimina el sobrenadante, se seca entonces el sedimento de ADN al aire, después se pone en suspensión en 100 µl de agua estéril y después se incuba una noche a 4 °C.

b) Digestión por la enzima HindIII

Se mide la concentración de ADN genómico mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) y a 280 nm (A₂₈₀). Se mezcla 1 µg del ADN genómico con agua estéril hasta un volumen final de 42,5 µl. Se añaden 5 µl de tampón (5X) y 2,5 µl de HindIII (50 u/µl) (Invitrogen, EE.UU.) y se incuba la disolución a 37 °C durante 4 horas.

c) Análisis de transferencia Southern

Se efectúan las transferencias de tipo transferencia Southern siguiendo los procedimientos del kit "DIG High Prime DNA Labeling and Detection" de la compañía Roche Diagnostic.

d) Procedimiento de marcaje de la sonda

Se obtiene la sonda correspondiente a la totalidad del gen que codifica la lipasa Lip2 por PCR efectuada en ADN genómico con la ayuda de la enzima ADN polimerasa Phusion (Finzyme) y los dos cebadores siguientes:

Cebador codificante: 5'-GTGTACACCTCTACCGAGACCTCT-3' (SEQ ID NO: 1)

Cebador anticodificante: 5'-TTAGATACCACAGACACCCTCGGT-3' (SEQ ID NO: 2)

Después de la reacción de PCR, se purifica la sonda sobre gel con la ayuda de kit "Nucleospin Extract II" (Macherey Nagel). Se marca a continuación la sonda marcada en frío (digoxigenina) con la ayuda del kit "DIG high prime DNA labeling" de Roche.

e) Separación sobre gel, transferencia del ADN y detección de la señal

Se mezclan 2 µg del ADN digerido por HindIII con tampón de carga y después se depositan sobre un gel de agarosa al 0,8 %. Se efectúa la migración a 50 V durante 2 h 30 min y se transfiere entonces el ADN a membrana Hybond+ (Amersham Bioscience). Se detecta el número de loci del gen *Lip2* en el ADN genómico gracias a la hibridación sobre las membranas de la sonda marcada, seguido de visualización por exposición a rayos X.

3) Determinación de la concentración proteica

Se determina la concentración proteica mediante el método de Bradford. Se cuantifican las proteínas con la ayuda del método de Bradford directamente en el sobrenadante del cultivo de fermentación. Se compara la cantidad de proteínas así determinada con las cantidades conocidas de lipasa *Lip2* purificada. Se mezclan 20 µl de muestras de patrones, a las diluciones apropiadas, en tubos con 1 ml de reactivo diluido (5 veces) que contiene colorante. Se determina entonces la DO₅₉₅ respecto a la DO₅₉₅ obtenida por el control (colorante diluido solo).

4) Medida de la actividad específica de la lipasa recombinante

Se mide potenciométricamente la actividad de la lipasa a 37 °C con la ayuda de un dispositivo pH-estado (RADIOMETER). El sustrato utilizado es trioctanoína. Se pone en emulsión sustrato 10 mM en 15 ml de tampón de reacción que contiene Tris-HCl 1 mM (pH 5,5), NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM y taurodesoxicolato de sodio (SIGMA) 4 mM. Se define una unidad de actividad específica como 1 µmol de ácido graso liberado por min y por mg de proteína.

4) Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS)

Se cargan 12 µl de una muestra que comprende un 25 % de una mezcla que contiene SDS y agentes reductores sobre un gel de bis-tris al 4-12 % (Biorad). Se efectúa la migración durante 45 min a 160 V.

Se analiza a continuación el gel por coloración con azul de Coomassie.

5) Determinación por espectrometría de masas de tipo “desorción-ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF: Matrix-assisted Desorption Ionization-Time of Flight) de la masa molecular de la lipasa *Lip2* producida por el clon YL-LIP2-6C

Se efectúa un análisis de espectrometría de masas de tipo desorción/ionización láser utilizando un espectrómetro de masas “Voyager Elite XL time of flight” de la compañía Perseptive Biosystems (Framingham, MA) empleado con un láser de nitrógeno que emite a 337 nm. Se obtiene el espectro de masas en modo positivo utilizando un modo de extracción lineal y retardado con un potencial de aceleración de 25 kV, una tensión de rejilla de 0,3 %, una tensión de guía iónica de 0,3 % y un tiempo de retardo de 1000 ns para la proteína *Lip2*. Cada espectro es el resultado de la media de 100 impulsos láser. Se mezcla el material a analizar con un volumen igual de una disolución saturada de ácido sinapínico (Fluka) preparado en una disolución al 50 % (v/v) de acetonitrilo/ácido trifluoroacético acuosa. Se depositan alícuotas de 2 µl de esta mezcla sobre la placa de muestra de acero inoxidable y se secan al aire antes de efectuar el análisis. Se efectúa la calibración externa con la ayuda de α -quimotripsinógeno A (Sigma). Los valores expresados son medias y corresponden al ión $[M+H]^+$.

EJEMPLO 2- Construcción del vector de expresión y obtención del clon YL-LIP2-6C

Se obtiene la cepa YL-LIP2-6C mediante transformación de una cepa de *Yarrowia lipolytica* PO1d desprovista de secuencias zeta por un vector de expresión denominado JMP6, descrito en la solicitud EP 1.108.043, y que comprende el gen *LIP2* que codifica el precursor *Lip2p* de la lipasa *Lip2* de *Yarrowia lipolytica*, en dirección 5' del cual se encuentra el promotor ACO2. Dicho módulo está flanqueado por las secuencias zeta, como se describe anteriormente. La construcción del vector JMP6 y la transformación de la cepa PO1d se realizan según el mismo modo de operación que en la solicitud EP1108043. Esta cepa YL-LIP2-6C, que comprende 5 loci diferentes de integración del módulo de expresión del gen *LIP2*, se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, con el número I-3542, el 15 de diciembre de 2005.

EJEMPLO 3- Producción de lipasa con la cepa YL-LIP2-6C y verificación de la estabilidad genética de YL-LIP2-6C

Se emplea la cepa YL-LIP2-6C en un procedimiento de producción de lipasa que comprende una etapa de precultivo y una etapa de fermentación adaptada a la producción de lipasa. Se ilustra en la figura 1 el enfoque global de este procedimiento. Se analizó a continuación la lipasa así producida en términos de actividad y calidad. Por otro lado, se analizó la estabilidad genética de YL-LIP2-6C mediante la determinación del número de loci del módulo de expresión del gen *LIP2*.

1) Procedimiento de producciónPrecultivos y fermentación

ES 2 550 537 T3

5 Se descongela un vial de disolución madre del clon YL-LIP2-6C en glicerol y se ponen en cultivo 5 μ l en 25 ml de medio 02130S enriquecido que contiene disolución de vitaminas al 1 \square (v/v) y disolución de oligoelementos al 1 \square (v/v) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se incuba el cultivo a 28 $^{\circ}$ C durante 36 horas con agitación (180 rpm). Se siembra el precultivo de 25 ml resultante (precultivo 1) en 200 ml de medio 02130S enriquecido en un matraz Erlenmeyer de 2 l y se incuba después el cultivo durante 36 horas a 28 $^{\circ}$ C con agitación (180 10 rpm). Se siembra el precultivo 2 así obtenido (225 ml) en medio 02130S enriquecido en un fermentador.

10 Al tiempo T_0 del procedimiento de fermentación, se añaden 2 ml de la disolución de FeSO_4 al cultivo. Cada 6 a 9 horas, se añaden 2 a 3 ml de la disolución de vitaminas al cultivo de fermentación y, después de 34 horas de fermentación (a T_{12}), se inicia el aporte de glucosa. Se aumenta progresivamente la alimentación de glucosa durante 14 horas, después se interrumpe a T_{17} (correspondiente a 48 horas de fermentación) y se inicia entonces la inducción por ácido oleico. Se aumenta progresivamente la alimentación de ácido oleico durante las 54 horas siguientes y después se alcanza a T_{33} (102 horas de fermentación) una DO_{600} de 340 y se detiene el procedimiento de fermentación. Se centrifuga el cultivo final de 3 l (14.000 rpm). Se recupera el sobrenadante y se conserva a -20 $^{\circ}$ C.

15 Monitorización de los cultivos

20 En el transcurso de la fermentación, se supervisan la temperatura, presión parcial de oxígeno y pH y se mantienen a 28 $^{\circ}$ C, 20 % y 6,2, respectivamente. Cada 3 horas aproximadamente, se extrae una muestra de cultivo y se mide la DO_{600} con el fin de seguir la evolución de la tasa de crecimiento. Se indican los resultados en la Figura 2. Se centrifugan dos extractos de 1 ml de estas muestras durante 5 min a 14.000 rpm y se conservan los sedimentos y sobrenadantes a -20 $^{\circ}$ C. La Tabla I muestra la monitorización del procedimiento de fermentación.

T	Tiempo de fermentación/ horas	DO600	Tasa de crecimiento h ⁻¹	Vitaminas añadidas, 2 ml cada 12 h	Agitación (rpm)	PO ₂ (%)	pH	Otras acciones y observaciones	Temp.(°C)
T0	0,00	0,28			300	98	6,21		28
T1	3,00	0,3	0,02299762	2 mL	300	98	6,47	2 ml de FeSO4	28
T2	6,00	0,32	0,02151284		300	98	6,51		28
T3	9,00	0,34	0,02020821		300	98	6,53		28
T4	12,00	0,4	0,05417298	2 mL	300	100	6,57		28
T5	15,00	0,5	0,07438118		300	98	6,2	ajuste del pH con ácido ortofosfórico	28
T6	18,00	0,62	0,07170379		300	97	6,2		28
T7	21,00	0,92	0,1315514	2 mL	300	92,7	6,19		28
T8	24,00	1,54	0,17172134		300	80,9	6,2		28
T9	27,00	2,36	0,14229307		300	61,4	6,19		28
T10	30,00	3,99	0,1750432	2 mL	300	20	6,19		28
T11	31,00	4,67	0,15736784		331	20	6,2	Problema con la alimentación de glucosa	28
T12	34,00	9,97	0,25280717		392	20,6	6,2	Inicio de alimentación de glucosa	28
T13	36,00	11,96	0,09099358	2 mL	378	17,6	6,2		28
T14	39,00	21,5	0,19549506		401	19,7	6,23		28
T15	42,00	37,2	0,18275194		424	18,9	6,2		28
T16	45,00	61	0,16485503		445	20	6,2		28
T17	48,00	70	0,04587379	2 mL	470	20	6,4	Inducción con ácido oleico	28
T18	51,00	89	0,08004704		366	20	6,38		28
T19	54,00	93,86	0,01772265		409	20,3	6,17		28
T20	57,00	85	-0,03305102		535	19,5	6,19		28
T21	60,00	95	0,03707521	3 mL	615	20,2	6,21		28
T22	63,00	105	0,03336115		563	21,5	6,2		28
T23	66,00	129	0,06861735		583	20,4	6,2		28
T24	69,00	159	0,06969727		580	21,2	6,18		28
T25	72,00	178	0,03762645	3 mL	563	19	6,18		28
T26	75,00	210	0,05510799		565	19,5	6,2		28
T27	78,00	216	0,00939029		589	20	6,2		28
T28	80,00	235	0,04215355		590	20	6,2		28
T29	83,50	240	0,00601526	3 mL	610	20	6,2		28
T30	90,50	280	0,02202153		640	21	6,2		28
T31	94,00	310	0,02906077		687	19,5	6,19		28
T32	99,00	342	0,01964769		691	20	6,19		28
T33	100	340	-0,00586512		680	20	6,2		28

Tabla I: Monitorización del procedimiento de fermentación

Purificación de la lipasa

Opcionalmente, se realiza una etapa suplementaria de purificación de la lipasa.

- 5 Se separa la lipasa del cultivo con la ayuda de un dispositivo de microfiltración tangencial sobre membrana cerámica (piloto X6 de PALL) que permite la retención de levaduras de tamaño superior al umbral de corte (0,1 µm). Se recupera el permeado que contiene la lipasa en primer lugar en modo de concentración, y después en modo de diafiltración. Se ponen en práctica estas etapas siguiendo las recomendaciones del fabricante con las modificaciones apropiadas. La concentración de microorganismos contenidos en el permeado se reduce a continuación por filtración (0,2 µm) (Millipore) de forma que se obtenga una biocarga inferior a 10 ufc/ml. con la ayuda de un dispositivo Profux
- 10 M12 (Millipore), se concentra la disolución de lipasa hasta un volumen de aproximadamente 5 litros y se somete a

una ultrafiltración tangencial utilizando una membrana Pellicon estándar Biomax de 10 kDa con el fin de eliminar los contaminantes de bajo peso molecular. Se elimina el ultrafiltrado que no contiene lipasa. La disolución de lipasa se purifica entonces otra vez por eliminación de microorganismos, como se indica anteriormente, de forma que se obtenga una biocarga inferior a 5 ufc/ml. La lipasa así purificada puede experimentar además una liofilización.

5 **3) Caracterización de la lipasa recombinante producida por YL-LIP2-6C**

a) Control de la producción de lipasa por la cepa YL-LIP2-6C en el transcurso del procedimiento de fermentación

10 En cada punto de medida, se somete una muestra de cultivo a centrifugación y se analiza el sobrenadante por PAGE-SDS. Se mezclan 75 µl del sobrenadante con 75 µl de agua y después se cargan 5 µl sobre un gel de 26 pocillos. Se analizan igualmente muestras que contienen cantidades conocidas de lipasa Lip2. Se ilustran los resultados en la figura 4. Comparando la cantidad de lipasa obtenida al final de la fermentación (T33) con el gradiente de cantidades conocidas de lipasa Lip2, la concentración de lipasa obtenida después de 100 horas de fermentación puede estimarse en 1,5 g/l.

15 Por otro lado, los inventores han empleado el procedimiento de producción de lipasa según la invención para un volumen final de aproximadamente 35 l, lo que ha permitido la obtención de lipasa según un rendimiento situado entre 1 y 3 g por litro de sobrenadante de cultivo.

b) Determinación de la concentración proteica y estimación del rendimiento de producción de lipasa recombinante

20 Se determina la concentración proteica en el sobrenadante de cultivo como se indica en el ejemplo 1 (método de Bradford). Se efectúan 7 medidas independientes y la concentración de proteínas en el sobrenadante es de 2,3 g/l. Se estima la pureza de la proteína Lip2 en el sobrenadante por PAGE-SDS. Se ilustran los resultados en la figura 5. Se estima el nivel de pureza en aproximadamente un 70 %. El rendimiento resultante de la producción de lipasa de la etapa de fermentación con el clon YL-LIP2-6C es por tanto de 1,6 g/l.

c) Medida de la actividad específica de la lipasa recombinante producida por YL-LIP2-6C

25 Se mide la actividad específica de la lipasa producida por el clon YL-LIP2-6C como se indica en el ejemplo 1. Se diluye la muestra correspondiente al sobrenadante de la fermentación 100 veces en un tampón que contiene Na₂HPO₄ 50 mM, KH₂PO₄ 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0. La actividad catalítica determinada a 37 °C con trioctanoína en 3 experimentos independientes es de 21.883,33 U/ml del sobrenadante (Tabla II)

	Actividad lipásica (U/ml)				
	Ensayos			Media	DE
Muestra	20.800,00	22.750,00	22.100,00	21833,33	992,89

30 **Tabla II: Medida de la actividad de muestras del sobrenadante de fermentación**

De acuerdo con la concentración estimada de lipasa Lip2 en el sobrenadante (véase anteriormente), la actividad específica de la lipasa es de 13.675 U/mg, comparable a la actividad específica de la lipasa producida para estudios clínicos. La actividad específica de la lipasa producida por el clon YL-LIP2-6C es acorde a las condiciones requeridas para los lotes clínicos.

35 d) Masa molecular de la lipasa recombinante

Se realiza el análisis del espectro de masas (véase el ejemplo 1) sobre el sobrenadante de cultivo de fermentación después de centrifugación sin purificación. Se ilustra el resultado en la figura 6. El pico principal observado revela una masa molecular de 37.648 Da. La lipasa Lip2 producida por YL-LIP2-6C tiene una masa molecular correcta pues el valor observado es acorde a las condiciones requeridas para los lotes clínicos, es decir, 37500 ± 1000 Da.

40 Este ejemplo ilustra la selección de un clon estable, YL-LIP2-6C (en este caso particular, el 100 % de los clones analizados después de 30 generaciones presentan el mismo número de loci del gen Lip2 que el clon inicial). Además, la estabilidad genética de dicho clon no está afectada por las condiciones de cultivo empleadas para la producción de lipasa (durante los precultivos; justo antes de la fermentación; justo antes de la inducción por ácido oleico de la producción de lipasa; final de la fermentación).

45 **3) Estabilidad genética del clon YL-LIP2-6C**

Se analiza la estabilidad genética del clon YL-LIP2-6C en el transcurso del procedimiento de producción de lipasa, que comprende una etapa de precultivo y una etapa de fermentación, determinando el número de eventos de

integración del módulo de expresión del gen *LIP2* en loci diferentes en el ADN de *Yarrowia lipolytica*, en las colonias seleccionadas a T0, T17 y T33.

a) Selección de colonias

5 Se diluyen en un primer momento una muestra de precultivo 2 (T0, inicio de la fermentación), una muestra del cultivo en condiciones de fermentación a T17 (justo antes de la inducción) y a T33 (final de la fermentación) hasta alcanzar una $DO_{600} = 1$, y después se diluyen a 1/1000. Se extienden 10 μ l de cada una de estas disoluciones diluidas sobre 3 placas de cultivo sobre medio YPD. Se incuban a continuación las placas a 28 °C durante 48 horas y después se conservan a 4 °C hasta la selección de colonias para análisis del número de loci.

10 Se siembran 20 colonias derivadas de la muestra extraída en el punto de partida de la fermentación (T0), 20 colonias derivadas de la muestra extraída justo antes de la inducción (T17) y 100 colonias derivadas de la muestra extraída al final de la fermentación (T33) separadamente en 4 ml de medio 02130S enriquecido y después se ponen en cultivo durante 72 horas. A continuación, se constituyen reservas en glicerol al 30 % en previsión de la extracción de ADN y del análisis por transferencia Southern (Materiales y métodos).

15 c) Determinación del número de eventos de integración del gen *LIP2* en loci diferentes para 140 colonias derivadas de la cepa YL-LIP2-6C

20 Se ilustran en la figura 3 los resultados del análisis por transferencia Southern del número de eventos de integración en loci diferentes del gen *LIP2* en 20 colonias extraídas a tiempo T0 (inicio de la fermentación), 20 colonias extraídas a tiempo T17 (48 horas de fermentación) y 100 colonias extraídas a tiempo T33 (100 horas de fermentación). Estos resultados muestran que todas las colonias analizadas contienen 6 loci del gen *LIP2*. En la medida en que la cepa silvestre contiene una copia del gen *LIP2* endógeno, la cepa YL-LIP2-6C contiene por tanto 5 loci de integraciones del módulo de expresión del gen *LIP2*. El clon YL-LIP2-6C es por tanto 100 % estable durante un procedimiento de fermentación de 100 horas.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER
LEBLOND, Yves
5 MOUZ, Nicolas
- <120> Procedimiento de producción de lipasa, célula de *Yarrowia lipolytica* transformada apta para producir dicha lipasa y sus aplicaciones
- 10 <130> F269Cas39PCT
<160> 2
<170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
<211> 24
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- 20 <220>
<223> amorce sens
<400> 1
- 25 ggttacacct ctaccgagac ctct 24
<210> 2
<211> 24
<212> ADN
30 <213> secuencia artificial
<220>
<223> amorce antisens
- 35 <400> 2
ttagatacca cagacaccct cggt 24
- 40

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de lipasa recombinante que comprende:
 - a) una etapa en el transcurso de la cual se procede a la puesta en cultivo de células de *Yarrowia lipolytica* transformadas por un vector de expresión que comprende un módulo de expresión de una lipasa acidorresistente de levadura, y
 - b) una etapa en el transcurso de la cual se recoge, en el sobrenadante de dicho cultivo, la lipasa recombinante producida por dichas células;

estando caracterizado dicho procedimiento porque la etapa a) de puesta en cultivo se pone en práctica en un medio de cultivo desprovisto de productos de origen animal o de mezclas no caracterizadas constituidas por materiales proteicos de origen animal o de sus productos de digestión enzimática,

y porque dicha etapa a) comprende:

 - a1) el precultivo de las células transformadas de *Yarrowia lipolytica* en un medio que contiene una fuente de carbono de origen glucídico, nitrógeno mineral y sales minerales, oligoelementos y vitaminas; y
 - a2) una etapa de fermentación que comprende una fase de crecimiento celular en un medio que contiene como única fuente de carbono una fuente de carbono de origen glucídico, nitrógeno mineral y sales minerales, oligoelementos y vitaminas, y una fase de producción de lipasa en un medio que contiene como única fuente de carbono ácido oleico, nitrógeno mineral y sales minerales, oligoelementos y vitaminas.
2. Procedimiento de producción de lipasa recombinante según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha fuente de nitrógeno es sulfato de amonio.
3. Procedimiento de producción según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la fermentación se pone en práctica ventajosamente con una pO_2 constante comprendida entre 15 y 25 % y un pH preferiblemente inferior a 6,5.
4. Procedimiento de producción según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, caracterizado porque la etapa a1) de precultivo se realiza hasta alcanzar un valor de DO_{600nm} comprendido entre 3 y 10 para 1 ml, y porque en la etapa a2) de fermentación dicha fase de producción de lipasa se inicia cuando la DO_{600nm} del cultivo alcanza un valor comprendido entre 60 y 80 para 1 ml.
5. Procedimiento de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la etapa b) en el transcurso de la cual se recoge la lipasa se realiza cuando la DO_{600nm} alcanza un valor comprendido entre 300 y 350 para 1 ml.
6. Procedimiento de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la etapa b) comprende:
 - b1) la separación de la lipasa de dicho sobrenadante de cultivo, y
 - b2) la purificación de la lipasa obtenida en b1).
7. Procedimiento de producción según la reivindicación 6, caracterizado porque dicha separación se efectúa mediante una técnica elegida entre filtración tangencial en fibra hueca, filtración frontal y centrifugación continua o discontinua, y dicha purificación se efectúa mediante una técnica elegida entre filtración, precipitación fraccionada, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía por filtración en gel.
8. Procedimiento de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la etapa a) consiste en la puesta en cultivo del clon denominado YL-LIP2-6C, depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, con el número I-3542, el 15 de diciembre de 2005.
9. Preparación de la lipasa recombinante acidorresistente de levadura codificada por el gen Lip2 o LIP2, caracterizada porque es susceptible de obtenerse mediante un procedimiento según la reivindicación 8, porque tiene una actividad catalítica a pH 6 de al menos 15.000 unidades por ml de sobrenadante de cultivo, preferiblemente superior a 20.000 unidades por ml de sobrenadante de cultivo, correspondiendo una unidad a la cantidad de enzima capaz de catalizar la liberación de 1 μ mol de ácido graso por minuto cuando el sustrato utilizado es trioctanoína, y porque la concentración de dicha lipasa en dicha preparación es superior a 1 g de lipasa por litro.
10. Utilización de una preparación de lipasa según la reivindicación 9 para la obtención de un medicamento destinado al tratamiento de un síndrome de malabsorción de grasas, ligado a una insuficiencia pancreática.
11. Preparación de lipasa según la reivindicación 9 para utilización como medicamento.

12. Célula de *Yarrowia lipolytica* transformada por un vector que comprende un módulo de expresión de una lipasa extracelular acidorresistente de levadura, caracterizada porque se trata del clon denominado YL-LIP2-6C, depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.) con el número I-3542, el 15 de diciembre de 2005.
- 5
13. Utilización de la célula según la reivindicación 12 para la producción de la lipasa acidorresistente de levadura codificada por el gen Lip2 o LIP2.

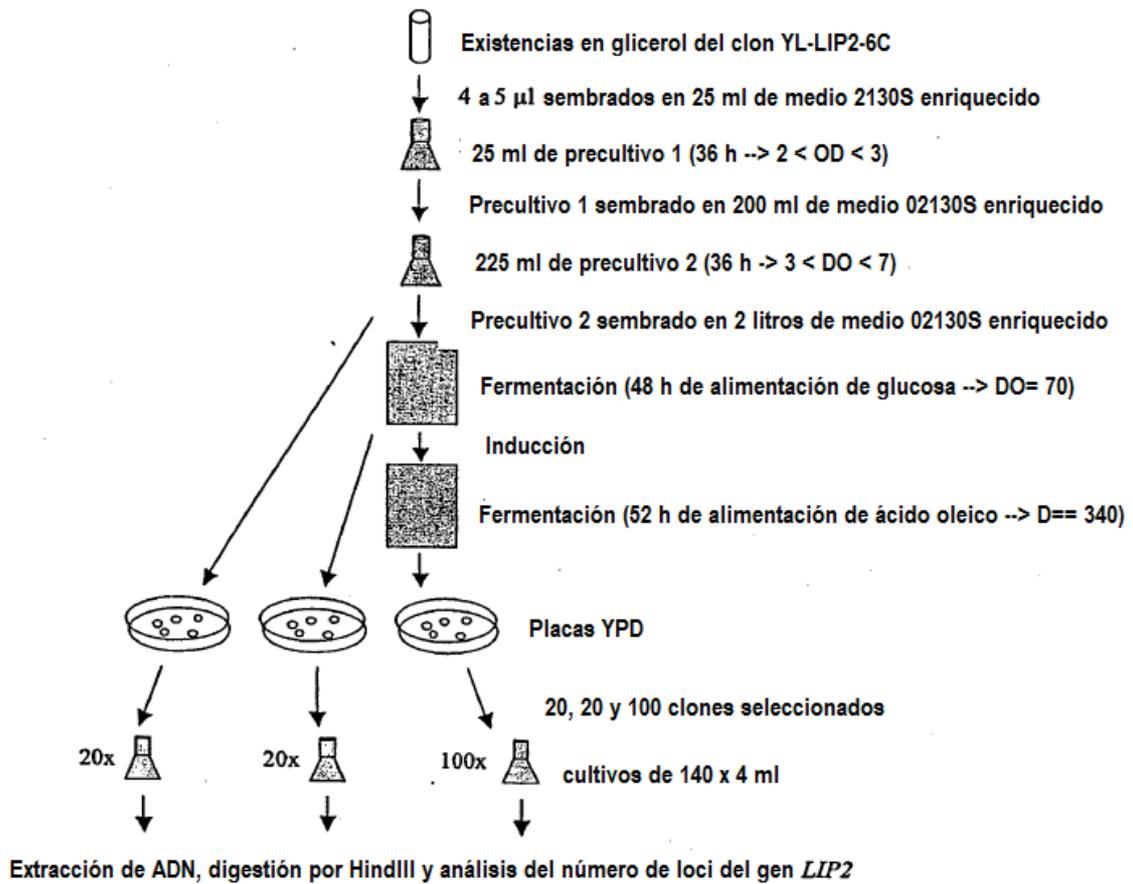


Figura 1

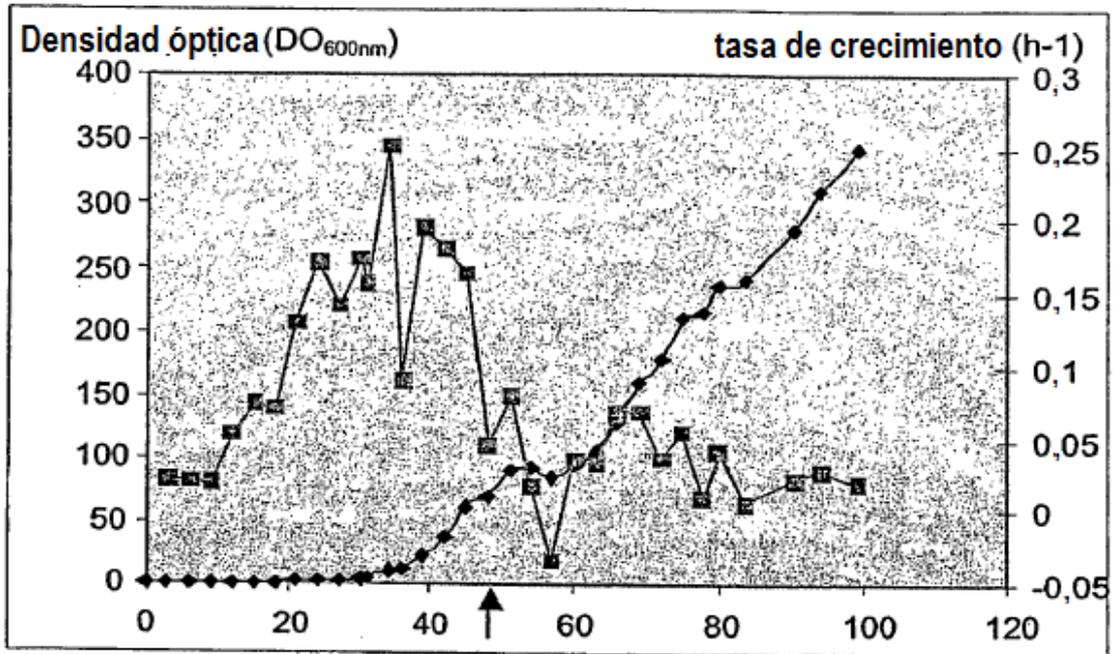


Figura 2

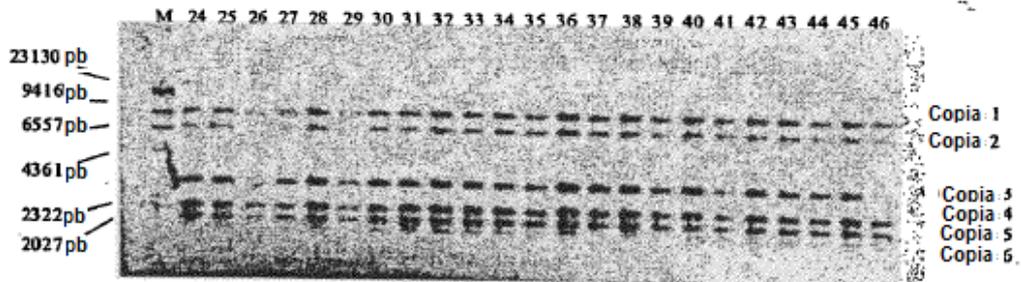


Figura 3

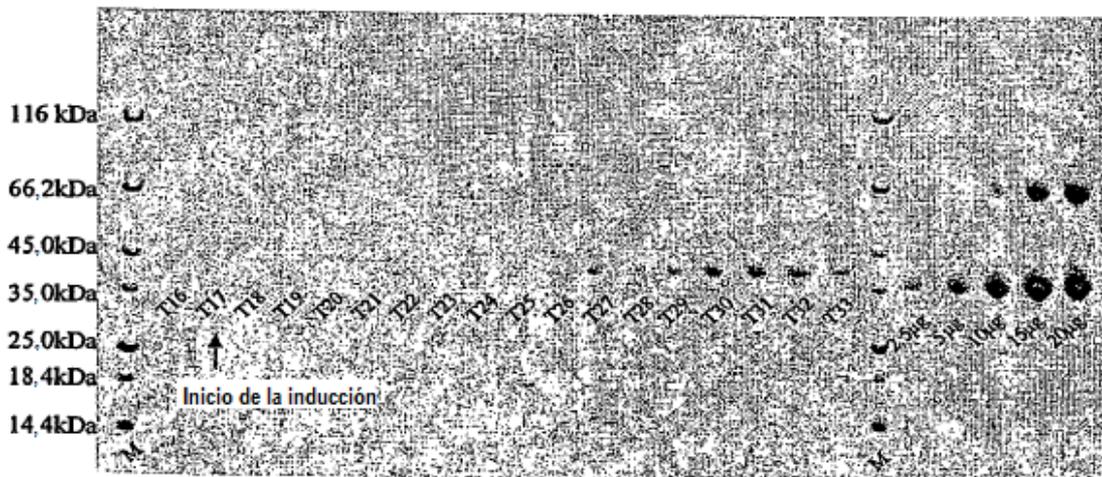


Figura 4

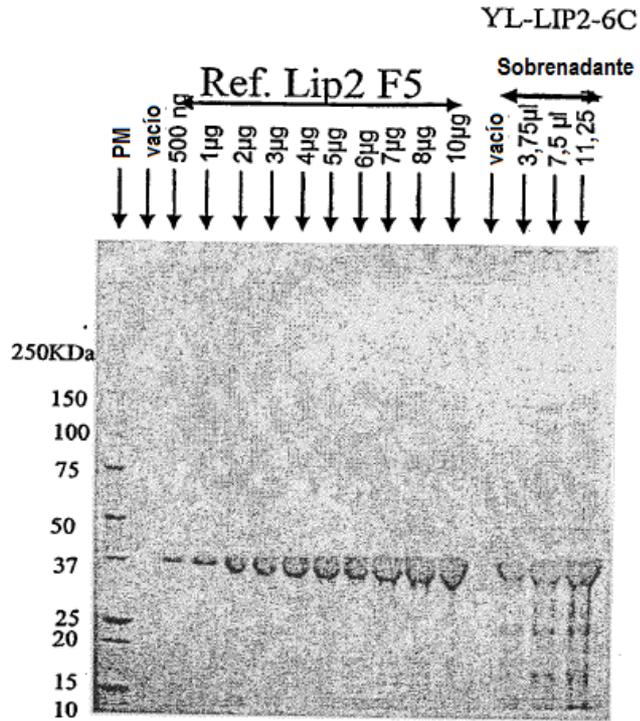


Figura 5

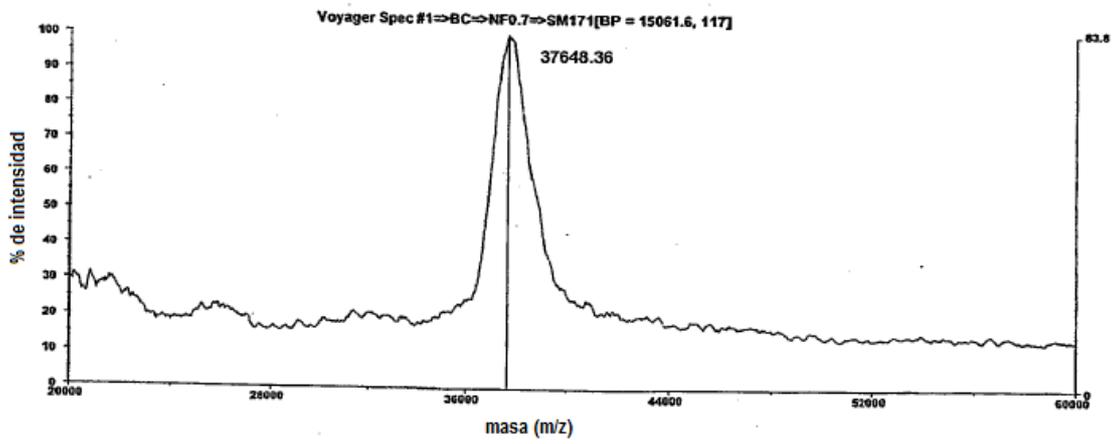


Figura 6