

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 280**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 33/00 (2006.01)

C12P 33/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2010 E 10785033 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2507368**

54 Título: **Producción de esteroides, que no proceden de levaduras, a partir de una levadura**

30 Prioridad:

03.12.2009 EP 09014988

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

09.08.2016

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**HOHMANN, HANS-PETER;
LEHMANN, MARTIN;
MERKAMM, MURIEL y
POMPON, DENIS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 579 280 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

Producción de esteroides, que no proceden de levaduras, a partir de una levadura

5 El presente invento se refiere a la producción de esteroides, inclusive el 7-deshidrocolesterol, el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol y el 25-hidroxi-ergosterol, en una levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*. Él también se refiere a varias enzimas que catalizan la reducción del enlace doble en la posición 24 del zimosterol, del colest-7,24-dienol y del colest-5,7,24-trienol; o a la hidroxilación en la posición 25 del ergosterol, del 7-deshidrocolesterol, del colest-8-enol y del colest-7-enol. Él también se refiere a varios ácidos nucleicos que codifican unas colesterol C25-hidroxilasas y unas esterol Δ 24-reductasas, y a su uso para producir e hidroxilar al 7-deshidrocolesterol o ergosterol. Él también se refiere al uso de las cepas de levaduras producidas de esta manera, y a unos métodos para la producción de estos esteroides, que comprenden las etapas de cultivar una célula de levadura transformada, y cosechar el(los) esterol(es) resultante(s).

15 La ruta de esteroides en levaduras implica muchas etapas. Un diagrama de la ruta de esteroides en levaduras se ha presentado en la Figura 14, y se hace referencia a ella más abajo al exponer el estado de la técnica.

El documento de patente de los EE.UU. US 5.460.949 (de Amoco) enseña un método y una composición para aumentar la acumulación de escualeno y trienol en una levadura. Este método incluye el truncamiento y la sobreexpresión de HMG1 (el gen individual más importante que regula la ruta) en una cepa en la que los genes *ERG5* y *ERG6* han sido desactivados. El *ERG5* y el *ERG6* codifican las dos actividades enzimáticas que distinguen a la biosíntesis del ergosterol, que es el esterol más importante de la levadura y los hongos, con respecto de la biosíntesis del colesterol. Estas cepas acumulan de manera preferida colest-5,7,24-trienol, que es usualmente un compuesto intermedio de la biosíntesis del colesterol.

25 El documento de patente internacional WO03/064650 (Lang y colaboradores) (documento US2006/0240508) divulga un método para la producción de 7-deshidrocolesterol y/o del compuesto intermedio biosintético o de los productos consecutivos en una levadura. En el presente caso, los genes para la C-8 esterol isomerasa, la C-5 esterol desaturasa y la Δ 24-reductasa de un ratón y de un ser humano se expresaron en una cepa de levadura en la que *ERG5* y *ERG6* habían sido desactivados y el gen de HMG1 había sido truncado y sobreexpresado. Estas levaduras fueron capaces de sintetizar el 7-deshidrocolesterol.

35 El documento WO03/064652 (Lang y colaboradores) (documento US2006/0088903) divulga un método para la producción de zimosterol y/o del compuesto intermedio biosintético y/o de los productos consecutivos de éste en una levadura transgénica mediando aumento de la actividad de la lanosterol-C14-desmetilasa (*ERG11*).

40 El documento WO 2005/121315 (de Aventis) enseña unas cepas de levadura que producen colesterol y unas utilidades de éstas. Un gen de la esterol Δ 7-reductasa de *Arabidopsis thaliana* y un gen de la esterol Δ 24-reductasa de un ser humano eran introducidos en varias cepas anfitrionas de levadura en las que el *ERG6* y, en algunos casos, el *ERG5* habían sido desactivados. Las nuevas cepas eran capaces de producir colesterol en mezcla con otros compuestos intermedios.

45 El documento US 6.562.609 (Russell y colaboradores) enseña una colesterol C25-hidroxilasa aislada de un ser humano y de un ratón y los correspondientes genes.

La expresión de una P450 mitocondrial en una levadura y un procedimiento para la producción de la 25-hidroxi-vitamina D3 se conocen a partir del documento US5668000. No se menciona nada acerca de la utilización de la levadura para la preparación de los esteroides específicos del presente invento.

50 El estado anterior de la técnica no menciona nada acerca de la producción de la 25-hidroxi-provitamina D2 y de la 25-hidroxi-provitamina D3 utilizando una levadura transgénica.

De acuerdo con este invento se ha encontrado que la enzima colesterol C25-hidroxilasa (cuyo sustrato es normalmente el colesterol) puede actuar sobre el 7-deshidrocolesterol y el ergosterol para producir el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol y el 25-hidroxi-ergosterol, respectivamente.

60 Así, un aspecto de este invento es la utilización de una colesterol C25-hidroxilasa de un vertebrado para hidroxilar al 7-deshidrocolesterol o ergosterol a fin de producir el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (también citado como la 25-hidroxi-provitamina D3) o el 25-hidroxi-ergosterol (también citado como la 25-hidroxi-provitamina D2), respectivamente.

65 La colesterol C25-hidroxilasa no es una enzima que existe por naturaleza en una levadura; de hecho, una levadura no tiene normalmente la capacidad de hidroxilar a la cadena lateral del 7-deshidrocolesterol, que puede estar presente en una levadura. Sin embargo, de acuerdo con este invento, se puede hacer que una levadura modificada genéticamente convierta al colest-5,7,24-trienol en el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (la 25-hidroxi-provitamina D3) por el procedimiento de:

proveer a la levadura de un ácido nucleico que codifica una colesterol C25-hidroxisilasa y cultivar la levadura en unas condiciones tales que la levadura hidroxile al 7-deshidrocolesterol,

con lo que se produce el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (la 25-hidroxi-provitamina D3).

5 En el procedimiento arriba mencionado se prefiere que la levadura tenga desactivados los genes *ERG5* y *ERG6*, y que ella haya sido provista también de un ácido nucleico que codifica una enzima esteroil Δ 24-reductasa de un vertebrado, que ha sido optimizada para la expresión en levadura.

10 También se ha encontrado de acuerdo con este invento, que una levadura modificada genéticamente puede ser producida y utilizada para convertir al ergosterol en el 25-hidroxi-ergosterol (también citado como la 25-hidroxi-provitamina D2) por el método de:

proveer a la levadura de un ácido nucleico que codifica una colesterol C25-hidroxisilasa y cultivar la levadura en unas condiciones tales que la levadura hidroxile al ergosterol,

con lo que se produce el 25-hidroxi-ergosterol (la 25-hidroxi-provitamina D2).

15 En las siguientes FIGURAS, se utilizan estas abreviaturas

TDH3p es la región promotora de TDH3 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isozima 3 de *S. cerevisiae*);

Ori-pBR es el origen de la replicación de ColE1 de pBR322 para *E. coli*;

bla es el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*;

20 2 μ es el fragmento grande del vector multi-copias 2 μ que lleva el origen de la replicación para *S. cerevisiae*;

PGK1t es la región terminadora de *PGK1* (la 3-fosfoglicerato cinasa de *S. cerevisiae*);

URA3 es el marcador de auxotrofia *URA3* de *S. cerevisiae* para uracilo;

Bam HI, *Eco* RI, *Hin* dIII, *Bgl* II, *Age* I se refieren a los sitios de restricción para las correspondientes enzimas de restricción;

25 La localización de los sitios en el vector se indica entre paréntesis empezando por la posición 1 del sitio único de *Bam* HI.

FIGURA 1: mapa de restricción del plásmido V51TDH-S24R1. S24R-1 es el gen sintético S24R1 que codifica la esteroil Δ 24-reductasa putativa de *Rattus norvegicus*;

30 **FIGURA 2:** mapa de restricción del plásmido V51TDH-S24R2. S24R-2 para el gen sintético S24R2 que codifica la esteroil Δ 24-reductasa putativa de *Danio rerio*.

35 **FIGURA 3:** mapa de restricción del plásmido pFLAde-S24R1. S24R1 para el gen sintético S24R1 que codifica la esteroil Δ 24-reductasa putativa de *R. norvegicus*; ARS-CEN es el origen de replicación autónomamente centromérico para *S. cerevisiae*; ADE2 es para el gen *ADE2* de *S. cerevisiae*.

40 **FIGURA 4:** mapa de restricción del plásmido V51-C25H1. GALp representa la región promotora inducible por galactosa *GAL10-CYC1* (Guarente y colaboradores, 1982); C25H-1 representa el gen sintético C25H1 que codifica la colesterol C25-hidroxisilasa putativa de *Sus scrofa*.

45 **FIGURE 5:** mapa de restricción del plásmido V51-C25H3. GALp representa la región promotora inducible por galactosa *GAL10-CYC1* (Guarente y colaboradores, 1982); C25H-3 representa el gen sintético C25H3 que codifica la colesterol C25-hidroxisilasa putativa de *Canis familiaris*;

Todos los perfiles de HPLC, registrados a UV 282 nm, se realizaron tal como se describirá en el Ejemplo 9 con unos extractos de esteroil, producidos tal como se describirá en el Ejemplo 8. Abreviaturas:

C5,7,22,24 = colestá 5,7,22,24-tetraenol;

C5,7,24= colestá 5,7,24-trienol;

50 C5,7,22= colestá 5,7,22-trienol;

C5,7= colestá 5,7-dienol o 7-deshidrocolesterol;

25OH-C5,7-Ac= acetato de 25-hidroxi 7-deshidrocolesterol;

25OH-E5,7,22-Ac, acetato de 25-hidroxi -ergosterol;

E5,7,22,24, ergosta 5,7,22,24-tetraenol;

55 E5,7,22, ergosta 5,7,22-trienol (ergosterol).

FIGURA 6: Perfiles de elución en HPLC de unos extractos de esteroides procedentes de unas cepas, que expresan una esteroil C-24 esteroil reductasa putativa. Se utilizaron las siguientes cepas:

A: ERT/V51TDH testigo;

60 B: ERT/V51TDH-S24R1;

C: ERT/V51TDH-S24R2;

D: ERT/pFLAde-S24R1.

Figura 7: Perfiles de elución en HPLC de unos extractos de esteroles procedentes de unos mutantes *erg6* que expresan unas colesterol C25 hidroxilasas putativas. Se utilizaron las siguientes cepas:

C: ERT/pFLAde-S24R1/V51;

D: ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H1;

E: ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H3.

Los patrones fueron: A, colestá 5,7-dienol (7-deshidrocolesterol, adquirido de Sigma-Aldrich, St.-Louis, MO 63103, EE.UU.); B, acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (preparado tal como se describirá en el Ejemplo 9).

Figura 8: Espectros de UV de unos picos individuales de unas cepas mutantes *erg6* que expresan unas colesterol C25 hidroxilasas putativas. Los espectros de UV se determinaron en línea entre 205 y 300 nm con el detector PDA durante una HPLC tal como se describirá en el Ejemplo 9 para los siguientes picos:

A: pico patrón de 7-deshidrocolesterol a 11,8 min (Figura 7, perfil A);

B: pico patrón de acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol a 8,5 min (Figura 7, perfil B);

C: pico de ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H1 a 8,5 min (Figura 7, perfil D).

Figura 9: Perfiles de espectrometría de masas de unos picos individuales de unas cepas mutantes *erg6* que expresan unas colesterol C25 hidroxilasas putativas. Los perfiles de fragmentación de masas desde $m/z = 350$ hasta 450 se determinaron en línea con el detector MicroMass ZQ durante una HPLC tal como se describirá en el Ejemplo 9 con los siguientes picos:

A: pico patrón de 7-deshidrocolesterol a 11,8 min (Figura 7, perfil A);

B: pico patrón de acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol a 8,5 min (Figura 7, perfil B);

C: pico de ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H1 a 8,5 min (Figura 7, perfil D).

Figura 10: Perfiles de elución en HPLC de extractos de esteroles procedentes de cepas *ERG6* del tipo silvestre que expresan unas colesterol C25 hidroxilasas putativas. Se utilizaron las siguientes cepas

B: W303/V51;

C: W303/V51-C25H1;

D: W303/V51-C25H3.

Los patrones eran: A, ergosterol (ergosta 5,7,22-trienol) adquirido de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103, EE.UU.

Figura 11: Espectros de UV de unos picos individuales de cepas *ERG6* de tipo silvestre que expresan unas colesterol C25 hidroxilasas putativas. Los espectros de UV se determinaron en línea entre 205 y 300 nm con el detector PDA durante una HPLC tal como se describirá en el Ejemplo 9 para los siguientes picos:

A: pico patrón de ergosterol a 11,9 min (Figura 10, perfil A);

B: pico de W303/V51-C25H1 a 10,0 min (Figura 10, perfil C);

C: pico de W303/V51-C25H1 a 8,7 min (Figura 10, perfil C).

Figura 12: Perfiles de espectrometría de masas de unos picos individuales de cepas *ERG6* de tipo silvestre que expresan unas colesterol C25 hidroxilasas putativas. Los perfiles de fragmentación de masas desde $m/z = 350$ hasta 450 se determinaron en línea con el detector MicroMass ZQ durante una HPLC tal como se describirá en el Ejemplo 9 con los siguientes picos:

A: pico patrón de ergosterol a 11,9 min (Figura 10, perfil A);

B: pico de W303/V51-C25H1 a 10,0 min (Figura 10, perfil C);

C: pico de W303/V51-C25H1 a 8,7 min (Figura 10, perfil C).

Figura 13: La parte postrera de la ruta biosintética de un esteroles de levadura de tipo silvestre (esteroles de tipo ergosta) en comparación con una levadura en la que el *ERG6* está desactivado (esteroles de tipo colestá). Las enzimas se han resaltado en letra cursiva. Las flechas rellenas representan una reacción enzimática que se encuentra en una levadura de tipo silvestre. Las flechas discontinuas corresponden a las etapas catalizadas por unas actividades heterólogas (una esteroles $\Delta 24$ -reductasa putativa, unas colesterol C25 hidroxilasas putativas), las correspondientes enzimas están subrayadas.

Figura 14: es un diagrama de la ruta de un esteroles de levadura.

Figura 15: es una comparación de la conversión del 7-deshidrocolesterol en el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (HyDHC) por diez diferentes genes de 25-hidroxilasas. Las cepas Ecab HY de *S. cerevisiae* (construcción artificial por integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:26), Ecab opt 2.0 (construcción artificial por integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:25), Ptro opt 2.0 (construcción artificial por integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:19), Ptro HY (construcción artificial por integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:20), ConHyD HY (construcción artificial por integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:31), ConHyD opt 2.0 (construcción artificial por integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:30), Rnor HY (construcción artificial por integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:23), Rnor opt 2.0 (construcción artificial por integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:22), Sscr HY (construcción artificial por integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:28), Sscr opt 2.0 (construcción artificial por integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:27), y Scr Pompon, que contiene la 25-hidroxilasa de cerdo optimizada tal como se describirá en el Ejemplo 2, se cultivaron tal como se describirá en el Ejemplo 20. Los

esteroles se aislaron a partir de los sedimentos de células y el contenido de HyDHC, la proporción de HyDHC referida a los esteroles totales y la conversión de 7-DHC en HyDHC se compararon con los valores obtenidos mediante integración de la 25-hidroxilasa C25H1. Todos los nuevos genes de hidroxilasas se expresaron y los productos génicos de éstos fueron capaces de hidroxilar al 7-DHC para dar el HyDHC.

DEFINICIONES:

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones se utilizan las siguientes definiciones:

El concepto de "levadura" se refiere a *Saccharomyces cerevisiae*, así como a otras levaduras que son apropiadas para la producción a escala comercial, tales como *Schizosaccharomyces* spp., *Pichia* spp, *Klyurveromyces* spp., *Hansenula* spp. y *Yarrowia lipolytica*.

El concepto de "condiciones clásicas" para la hibridación significa en el contexto del presente invento las condiciones que se utilizan generalmente por un experto en la especialidad para detectar unas señales de hibridación específicas, y que se han descrito, por ejemplo, por Sambrook y colaboradores, "Molecular Cloning" [Clonación molecular], segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, Nueva York.

Un ejemplo de una "condición rigurosa de hibridación" es una incubación durante una noche (por ejemplo, durante 15 horas) a 42°C en una solución que comprende: formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón esquilado, seguido por un lavado del soporte de la hibridación en 0,1 x SSC a aproximadamente 65°C.

El concepto de "% de identidad", tal como se conoce en el estado de la técnica, significa el grado del parentesco entre las secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según sea el caso, como se determina mediante la concordancia entre las cadenas de tales secuencias. El concepto de "identidad" se puede determinar fácilmente mediante ciertos métodos conocidos, p.ej., con el programa lógico "BESTFIT (GCG Wisconsin Package, versión 10.2, Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752, EE.UU.) mediando utilización de los siguientes parámetros: una penalización por creación de huecos de 8 y una penalización por extensión de huecos de 2 (parámetros por defecto).

El concepto de una enzima "funcional" significa que, en las condiciones típicas de cultivación de una levadura, la enzima llevará a cabo la actividad deseada dentro de la levadura. Por ejemplo, la expresión de una "colesterol C25-hidroxilasa funcional" significa que en una célula de levadura *in vivo*, la colesterol C25-hidroxilasa convertirá al 7-deshidrocolesterol en el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol.

El concepto de una secuencia de ácido nucleico "funcional" significa que la secuencia de ácido nucleico incluye unas secuencias necesarias (distintas de las que codifican un polipéptido) con el fin de que la levadura exprese el polipéptido en una concentración en la éste que sea funcional. Tales secuencias pueden incluir promotor(es), secuencias de terminación, intensificadores y similares.

Colesterol 25-hidroxilasa

Por lo tanto, un aspecto de este invento es un método para producir el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol o el 25-hidroxi-ergosterol en una célula de levadura que comprende: poner en contacto el 7-deshidrocolesterol o el ergosterol con una colesterol C25-hidroxilasa, y obtener el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol o el 25 hidroxi-ergosterol. De manera preferida, la colesterol C25-hidroxilasa es una enzima con origen en un vertebrado, de manera más preferida una rata, un cerdo, un perro, un caballo, un ser humano, un chimpancé, un *Macaca mulata*, un ratón, un *Gallus gallus*, un *Xenopus laevis*, un *Danio rerio* o un *Ornithorynchus anatinus*. Además, ciertos derivados de estas enzimas naturales, es decir, aquéllos en los que la secuencia de aminoácidos ya no es la misma que la de la enzima natural, pueden ser utilizados siempre y cuando que ellos retengan su capacidad de funcionar. Por ejemplo, este invento abarca la utilización de unas enzimas que comparten por lo menos una identidad de 90 % con una C25-hidroxilasa natural de un vertebrado, y preferiblemente aquéllas que tienen por lo menos una identidad de 95 %, y de manera más preferida por lo menos una identidad de 99 %, con la condición de que la enzima derivada ha de retener su funcionalidad.

De manera similar, los ácidos nucleicos que se pueden utilizar en este invento son los que codifican las secuencias peptídicas más arriba mencionadas, y los que se hibridan en condiciones rigurosas con los que codifican las secuencias peptídicas más arriba mencionadas. Preferiblemente, ellos son aislados. Por añadidura, en algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la enzima C25-hidroxilasa ha sido optimizado en cuanto a codones con el fin de que él sea más apropiado para el entorno de la levadura. En unas formas preferidas de realización, el ácido nucleico es de un cerdo, una rata, un perro, un chimpancé o un caballo, y ha sido optimizado en cuanto a codones para una levadura. Unos ácidos nucleicos particularmente preferidos son aquéllos que han sido optimizados en cuanto a codones de tal manera que ellos sean expresados en un anfitrión de levadura, por lo menos igual de bien que la secuencia de ácido nucleico de referencia "Sscr Pompon SEQ ID NO: 5", y de manera más preferida, la secuencia de ácido nucleico es expresada mejor que la Sscr Pompon".

Los ácidos nucleicos son de manera preferida ADNn.

De manera particularmente preferida, los ácidos nucleicos son los denominados como
 C25 H1 (basado en una hidroxilasa de cerdo; SEQ. ID NO.5),
 5 C25 H3 (basado en una hidroxilasa de perro; SEQ.ID.NO: 8)
 Ecab_HY o Ecab 250H_opt2.0 (basado en una hidroxilasa de caballo; SEQ ID NOS: 25 y 26)
 ConHYD opt 20 (SEQ ID NO:30)
 Rnor HY (basado en una hidroxilasa de rata SEQ ID NO: 23)
 Sscr HY (SEQ ID NO: 28)
 10 Sscr opt 20 (SEQ ID NO: 27)
 Sscr Pompon (SEQ ID NO: 5).

Otro aspecto de este invento es una levadura que es capaz de convertir al 7-deshidrocolesterol o ergosterol en el
 25-hidroxi 7-deshidrocolesterol o 25-hidroxi-ergosterol, respectivamente.

Otro aspecto de este invento es un método para producir el 25-hidroxi 7-deshidrocolesterol en una levadura, que
 comprende permitir la expresión de una colesterol C25-hidroxilasa de un vertebrado en presencia del 7-
 deshidrocolesterol en unas condiciones de cultivación que permitan que tenga lugar la reacción de hidroxilación,
 dando lugar a la producción del 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol. Otro aspecto de este invento es un método para la
 20 producción del 25-hidroxi-ergosterol en una levadura, que comprende permitir la expresión de una colesterol C25-
 hidroxilasa de un vertebrado, en presencia del ergosterol, en unas condiciones de cultivación que permitan que
 tenga lugar la reacción de hidroxilación, dando lugar a la producción del 25-hidroxi-ergosterol.

Se prefiere que en el vector de expresión estén presentes múltiples copias del gen. En unas formas de realización
 preferidas, se utilizan de 2-5 copias.

Los vectores para la clonación de cualquiera de los genes precedentemente mencionados en el anfitrión de levadura
 pueden ser de cualquier tipo conocido que sea apropiado para la clonación, en particular, unos plásmidos y unos
 plásmidos centroméricos que llevan los genes de las C25-hidroxilasas y unas secuencias de expresión y/o
 30 integración asociadas que incluyen unos promotores e intensificadores que se utilizan habitualmente en la técnica, y
 estos vectores constituyen otro aspecto de este invento.

En una levadura que es capaz de producir el 7-deshidrocolesterol, tal como se describe en el documento US
 2006/0240508, se prefiere que los genes *ERG5* y *ERG6* estén desactivados, y que se exprese una esterol Δ 24-
 reductasa que proceda de un vertebrado, tal como los que se describen más abajo. Por añadidura, en ciertas
 35 circunstancias constituye una ventaja sobreexpresar una versión truncada de HMG1 en tal levadura. Tales cepas
 con los genes *ERG5* y *ERG6* desactivados y el gen *HMG1* truncado se han descrito en el estado de la técnica.

El documento WO2007/138894 describe una vitamina D3 hidroxilasa purificada a partir de *Pseudonocardia*
autotrophica, que se utiliza para hidroxilar al 7-deshidrocolesterol para dar el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol. El
 documento no menciona la utilización de la colesterol C25 hidroxilasa o cambiar el bien establecido sistema de
 expresión en bacterias a un sistema basado en una levadura con el fin de expresar la colesterol C25 hidroxilasa o la
 40 producción del 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol y/o del 25-hidroxi-ergosterol dentro de dicha levadura.

El documento WO00/23596 se dirige al aislamiento y a la clonación del ADNc de la colesterol C25-hidroxilasa
 humana.

La 25-hidroxi-provitamina D3 o la 25-hidroxi-provitamina D2 puede ser convertida luego en la 25-hidroxi-vitamina D3,
 el primer metabolito y la forma circulante de la vitamina D3, o D2, respectivamente, utilizando unos conocidos
 50 procesos de irradiación con luz UV. La 25-hidroxi-vitamina D3 desempeña un cometido importante en la formación
 de huesos, y se usa comercialmente como un suplemento vitamínico en piensos para aves de corral y otros
 animales. Ella está disponible comercialmente de la compañía DSM Nutritional Products bajo la marca registrada
 ROVIMIX HY-D®. La 25-hidroxi-vitamina D2 muestra unos efectos comparables a los de la 25-hidroxi-vitamina D3
 en el cuerpo y se puede utilizar de un modo similar al de la utilización de la 25-hidroxi-vitamina D3.

Esterol- Δ 24-reductasas

De acuerdo con el invento, unos ácidos nucleicos, que codifican una esterol Δ 24-reductasa y que son expresados
 por una levadura, pueden convertir a un sustrato escogido entre el conjunto formado por: lanosterol, dimetil
 zimosterol, metil zimosterol, zimosterol, colest-7,24-dienol o colest-5,7,24-trienol en un producto escogido entre el
 60 conjunto formado por: 3 β -hidroxi-8-lanosta-8-eno, 4,4-dimetil-colest-8-enol, 4 α -metil-colest-8-enol, colest-8-
 enol, latosterol y 7-deshidrocolesterol, con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no ha de ser una
 secuencia de ácido nucleico humana o de un ratón.

La célula de levadura del presente invento es una en la que los *ERG6* y *ERG5* están desactivados. De manera
 preferida, estos ácidos nucleicos son unos ADNn modificados con origen en un vertebrado que han sido optimizados
 65 en cuanto a codones para la célula anfitriona, con la condición de que ellos no han de ser de un ratón ni de un ser

humano. De manera preferida, la esteroil $\Delta 24$ -reductasa es de un cerdo, un perro, un chimpancé, un *Macaca mulata*, un ratón, una rata, un caballo, un *Gallus gallus*, un *Xenopus laevis*, un *Danio rerio* o un *Ornithorynchus anatinus*.

5 En unas formas de realización particularmente preferidas, éstos son unos ADNs de rata (*Rattus norvegicus*) o de pez cebra (*Danio rerio*) y en unas formas de realización más preferidas, ellos han sido optimizados en cuanto a codones para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Unos ácidos nucleicos particularmente preferidos son denominados S24R1 (un gen de rata modificado, nucleótidos 10 hasta 1.563 de la SEQ ID NO:1) y S24R2 (un gen de pez cebra modificado, nucleótidos 10 hasta 1.563 de la SEQ ID NO:3).

10 Otro aspecto de este invento es una secuencia de ácido nucleico de un vertebrado, de manera preferida un ADN, que ha sido optimizada en cuanto a codones, y que codifica una enzima esteroil $\Delta 24$ -reductasa de tal manera que en una célula anfitriona de levadura, la enzima puede convertir:
 al lanosterol en 3 β -hidroxi-8-lanosta-8-eno, o al dimetil zimosterol en el 4,4-dimetil-colesta-8-enol;
 15 al metil zimosterol en el 4 α -metil-colesta-8-enol;
 al zimosterol en el colesta-8-enol;
 al colesta-7,24-dienol en el latosterol; o
 al colesta-5,7,24-trienol en el 7-deshidrocolesterol);
 y el ácido nucleico que codifica la enzima puede hibridarse con S24R1 o S24R2 en condiciones rigurosas, con la condición de que la secuencia de ácido nucleico de un vertebrado no ha de ser una secuencia de ácido nucleico
 20 aislada a partir de un ser humano o de un ratón.

Otro aspecto del invento es un método en el que las enzimas codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos precedentemente mencionadas se utilizan dentro de una célula de levadura tal como se describe aquí. Unas
 25 enzimas preferidas de este invento son las dadas como SEQ ID NO:2 y 4, y las que muestran una identidad de por lo menos 90 %, y de manera preferida una identidad de 95 %, con la SEQ ID NO:2 o 4, y que también pueden convertir
 al lanosterol en el 3 β -hidroxi-8-lanosta-8-eno,
 al dimetil zimosterol en el 4,4-dimetil-colesta-8-enol,
 al metil zimosterol en el 4 α -metil-colesta-8-enol,
 30 al zimosterol en el colesta-8-enol,
 al colesta-7, 24-dienol en el latosterol, o
 al colesta-5,7,24-trienol en el 7-deshidrocolesterol dentro del entorno de una célula de levadura.

Otro aspecto de este invento es la utilización de un anfitrión de levadura, que contiene una secuencia de ácido
 35 nucleico funcional tal como se ha descrito más arriba, y en particular un anfitrión de levadura tal como *S. cerevisiae*, que comprende S24R1, S24R2, o una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con S24R1 o S24R2 en condiciones rigurosas, con la condición de que el ácido nucleico no ha de ser una secuencia de un ser humano ni de un ratón. Los anfitriones de levadura tienen desactivados a los ERG5 y ERG6 y expresan también una esteroil $\Delta 24$ -reductasa; y en una forma de realización particularmente preferida, el anfitrión de levadura sobreexpresa también
 40 una versión truncada del gen HMG1.

Todavía otro aspecto del invento es un método para producir el 3 β -hidroxi-8-lanosta-8-eno, el 4,4-dimetil-colesta-8-enol, el 4 α -metil-colesta-8-enol, el colesta-8-enol, el latosterol o el 7-deshidrocolesterol en una célula de levadura, que comprende poner en contacto al lanosterol, al dimetil zimosterol, al metil zimosterol, al zimosterol, al colesta-
 45 7,24-dienol o al colesta-5,7,24-trienol con una levadura que comprende una secuencia de ácido nucleico que ha sido optimizada en cuanto a codones para la expresión en un anfitrión de levadura, y que codifica una enzima esteroil $\Delta 24$ -reductasa funcional, con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no ha de ser una secuencia de ácido nucleico de un ser humano ni de un ratón, y
 de que la levadura ha de convertir:
 50 al lanosterol en el 3 β -hidroxi-8-lanosta-8-eno,
 al dimetil zimosterol en el 4,4-dimetil-colesta-8-enol,
 al metil zimosterol en el 4 α -metil-colesta-8-enol,
 al zimosterol en el colesta-8-enol,
 al colesta-7, 24-dienol en el lanosterol, o
 55 al colesta-5,7,24-trienol en el 7-deshidrocolesterol. En este método, el ácido nucleico es de manera preferida S24R1, S24R2, o un ácido nucleico que se puede hibridar con S24R1 o S24R2 en condiciones rigurosas, con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no ha de ser una secuencia de ácido nucleico de un ser humano ni de un ratón.

Todavía otro aspecto de esta divulgación incluye unos vectores, incluyendo unos plásmidos, que comprenden una
 60 secuencia de ácido nucleico funcional que ha sido optimizada en cuanto a codones para la expresión en un anfitrión de levadura, y que codifica una enzima esteroil $\Delta 24$ -reductasa funcional, con la condición de que la secuencia de ácido nucleico no ha de ser una secuencia de ácido nucleico de un ser humano ni de un ratón. De manera preferida, el vector contiene los ácidos nucleicos S24R1, S24R2 o un ácido nucleico que se puede hibridar con S24R1 o
 65 S24R2, con la condición de que la secuencia de ácido nucleico de un vertebrado no ha de ser una secuencia de ácido nucleico de un ser humano ni de un ratón. Los vectores pueden contener las secuencias usuales, que se

encuentran habitualmente en plásmidos o en otros vectores que regulan la transcripción, la traducción y/o la integración dentro del cromosoma de la levadura.

Construcciones artificiales de genes

5 Todas las construcciones artificiales de genes de este invento, que codifican una C25-hidroxilasa o una esteroil $\Delta 24$ reductasa, son típicamente una parte de un casete de expresión, que tiene el gen ajeno bajo el control de unos promotores conocidos, que pueden ser regulados utilizando unos métodos clásicos, tales como el promotor de ADH1, el promotor de TEF1, el promotor de GPD (TDH3) de levadura, el promotor de HXT7 de levadura, el promotor de GAL1/10 de levadura, o el promotor de PGK1 de levadura, que controlan al gen de interés. Adicionalmente, el

10 casete de expresión pueden contener unas secuencias situadas corriente arriba o corriente abajo tales como una secuencia terminadora y/o unos elementos reguladores que están engarzados operativamente con la secuencia codificadora para por lo menos uno de los genes que se han descrito más arriba. Los vectores que llevan las construcciones artificiales de genes pueden ser introducidos en la levadura utilizando unos métodos convencionales.

15 Los siguientes ejemplos son solamente ilustrativos y no han de restringir de ningún modo el ámbito del invento.

Ejemplos

Referencias: Las citas completas para las referencias aparecen al final de los Ejemplos.

20

Medios:

Tabla 1: Composición del medio mínimo

Composición	Concentración (peso/volumen)
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato de amonio (Becton Dickinson and Co., Sparks, MD 21152, EE.UU.)	0.17 %
Casaminoácidos (Becton Dickinson and Co., Sparks, MD 21152, EE.UU.)	1 %
Glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103, EE.UU.)	2 %

25

El medio fue esterilizado autoclavando durante 20 minutos a 120 °C antes de su utilización. Se añadieron triptófano, uracilo o adenina (b) estériles hasta llegar a una concentración final de 20 mg/l en caso necesario.

Tabla 2: Composición del medio sintético de Kapelli

Composición	Concentración
H ₃ PO ₄ (85% v/v)	0,33 ml/l
KH ₂ PO ₄	2,85 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,6 g/l
MnSO ₄ x H ₂ O	16 mg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,4 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	15 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	2,8 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	2,5 mg/l
H ₃ BO ₃	7,5 mg/l
Ácido cítrico x H ₂ O	0,5 mg/l
KI	1 mg/l
NiSO ₄ x 7 H ₂ O	2,5 mg/l
Citrato de trisodio x 2 H ₂ O	25 mg/l
Tiamina HCl	2 mg/l
Piridoxina HCl	5 mg/l
Ácido nicotínico	8 mg/l
Biotina	0,05 mg/l
Pantotenato de calcio	10 mg/l
<i>mio</i> -Inositol	80 mg/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	50 mg/l
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	50 mg/l
Casaminoácidos	1% (p/v)
Glucosa o galactosa	2% (p/v)

30

El medio fue esterilizado mediante filtración a través de una unidad de filtración de 0,2 μ m antes de su utilización. Se añadieron triptófano, uracilo o adenina estériles hasta llegar a una concentración de 0,2 mg/ml, en caso necesario.

EJEMPLO 1:
Selección de $\Delta^{24(25)}$ -esterol reductasas procedentes de diferentes organismos
y diseño de genes sintéticos

5 La esterol Δ^{24} -reductasa cataliza una de las últimas etapas de la biosíntesis de colesterol. Ella es una enzima bastante inespecífica que acepta por lo menos al zimosterol y al desmosterol como sustratos. En 2004, el correspondiente gen se identificó en un ser humano (Waterman HR y colaboradores, 2001). Solamente para los productos génicos procedentes de un ser humano y de un ratón se pudo demostrar formalmente la actividad de esterol Δ^{24} -reductasa (Cramer A y colaboradores, 2006; documento WO03/064650). Una función comparable se describió también para el gen homólogo procedente de una rata (Wu C. y colaboradores 2004: Nature 432 (7017):640-5), sin embargo, sin la confirmación de la actividad enzimática del producto génico.

15 En el documento WO03/064650 se muestra que la expresión del gen de la Δ^{24} -reductasa procedente de un ratón en un mutante de *S. cerevisiae* (erg5 erg6) dio por resultado la formación de dos nuevos esteroides (el latosterol y el 7-deshidrocolesterol), la cual no aparece en la cepa anfitriona. La búsqueda en unas bases de datos públicas tales como el GENBANK o el EMBL acerca de unas enzimas que son homólogas a la $\Delta^{24(25)}$ -esterol reductasa humana, se realizó con el programa lógico BLASTp, que está disponible públicamente, utilizado en condiciones clásicas. Entre las secuencias encontradas, la secuencia de *Rattus norvegicus*, que mostró una identidad de aminoácidos de 97 % con la secuencia de aminoácidos de *Homo sapiens* (Tabla 1) y la secuencia de *Danio rerio*, que mostró una identidad de aminoácidos de 79 % con la secuencia humana (Tabla 1), se seleccionaron para las investigaciones posteriores.

20 Tabla 3: Proteínas putativas que son homólogas a la $\Delta^{24(25)}$ -esterol reductasa humana. Los datos numéricos son proporcionados en tantos por ciento de identidad de aminoácidos.

25

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Danio rerio</i>
<i>Homo sapiens</i>	100 %	97 %	79 %
<i>Pan troglodytes</i>	99 %	97 %	79 %
<i>Macaca mulata</i>	99 %	97 %	79 %
<i>Mus musculus</i>	96 %	99 %	79 %
<i>Rattus norvegicus</i>	97%	100 %	79 %
<i>Bos taurus</i>	96 %	96 %	79 %
<i>Canis familiaris</i>	96 %	96 %	79 %
<i>Equus caballus</i>	95 %	95 %	79 %
<i>Gallus gallus</i>	79 %	79 %	78 %
<i>Danio rerio</i>	79 %	79 %	100 %
<i>Xenopus laevis</i>	77 %	77 %	79 %

30 Para cada ADNc se diseñó un gen sintético para la expresión en *S. cerevisiae*. Por lo general, para esta finalidad es posible utilizar la secuencia original de ADNc. En algunos casos, es ventajoso intentar adaptar el perfil de uso de codones del ADNc original al uso de codones del nuevo anfitrión utilizando las tablas de uso de codones de las diferentes especies de acuerdo con el Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). Esto se puede realizar manualmente o con la ayuda de un programa de ordenador. En nuestro caso, se utilizó un programa de ordenador, cuyo algoritmo de cálculo implica un generador de secuencias que permite la generación de unas secuencias de ADN con una modulación del sesgo de codones definida por el usuario. También se pueden introducir algunas restricciones en el algoritmo para evitar o alternativamente para favorecer, a deseo, la presencia de unos sitios específicos de restricción. Una parte de la generación de secuencias es dirigida por un generador de números aleatorios que da como resultado usualmente diferentes secuencias de ADN por cada ensayo. No fue posible para el usuario del programa recuperar la semilla utilizada y de esta manera reproducir los resultados. Por lo tanto, las secuencias recodificadas no pueden ser predichas, y se puede considerar que llevan una signatura única y original.

40 La selección entre unas versiones de la secuencia de ADN generadas alternativamente era finalmente dependiente del usuario (mediante inspección visual). La versión seleccionada de las secuencias de ADN se utilizó para la síntesis del gen por un proveedor de servicios (p.ej., GeneCust Europe, 30b rue Dominique Lang, 3505 Dudelange, Luxemburgo). Se añadieron tres residuos adicionales de adenina situados corriente arriba del codón de iniciación ATG y se añadió un segundo codón de interrupción corriente abajo del marco abierto de lectura con el fin de optimizar la iniciación y la terminación de la traducción. Para una clonación conveniente de los genes sintéticos dentro de unos vectores de expresión de levadura, se añadieron unos sitios de corte por restricción con *Bam* HI y *Eco* RI corriente arriba y corriente abajo de las secuencias, respectivamente. Como se ha explicado más arriba, el gen de la esterol Δ^{24} -reductasa de una rata (número de entrada en el GenBank AY92220 (secuencia de ADNc) y AAX29968 (secuencia de aminoácidos) se recodificó por el método descrito más arriba. El nuevo gen sintético se denominó S24R1. Su secuencia se reproduce más abajo.

SEQ.ID.NO:1:

```

1      GGATCCAAAA TGGAACCAGC TGTTTCTTTA GCTGTTTGTG CTTTATTATT TTTATTATGG
61     GTAAGAGTCA AAGGTCTTGA ATTTGTCTTA ATTCATCAAA GGTGGGTGTT TGTCTGTTTA
121    TTTTATTAC  CATTATCTTT AATCTTTGAT ATCTATTATT ATGTTAGAGC TTGGGTGTT
181    TTTAAATTAT CTCTGCTCC  AAGACTACAT GAACAAAGAG TTCAAGATAT CCAAAAAACA
241    GTTAGAGAAT  GGAAAGAACA AGGTTCTAAA ACTTTTATGT GTACCGGTCG GCCTGGGTGG
301    CTCACTGTGT CATTAAAGGT  TGGTAAATAT AAAAAAATC ATAAAAATAT CATGATCAAT
361    TTAATGGATA TCTTAGAAGT  TGATACTAAA AAACAAATCG TCAGGGTGA  ACCTCTGTGTC
421    TCTATGGGGC AAGTCACTGC  ATTATTAAT  TCTATTGGTT GGACGCTTCC TGTCTCCCA
481    GAGTTAGACG ATCTTACTGT  TGGTGGTTTA ATCATGGGTA CTGGTATCGA ATCTTCATCT
541    CATAAATATG GTCTTTTTTCA ACATATTTGT ACCGCTTATG AACTAATCCT GGCTGATGGC
601    TCATTTGTGC GTTGTACCCC  TTCGAAAAC  TCCGATCTAT TTTATGCAGT CCCATGGAGT
661    TGTGTFACTT TAGGTTTTTT  AGTTGTGCT  GAAATCAGAA TCATCCAGC  AAAAAAGTAT
721    GTCAGCTAC  GATTTGAACC TGTTAGAGGT CTGGAAGCAA TCTGTGAAA  GTTTACACAT
781    GAATCTCAA  GATTAGAAA  TCATTTTGT  GAAGGGCTC  TCTATAGTCT GGATGAGGCG
841    GTGATTATGA CGGGGTGAT  GACGGACGAC GTTGAGCCAT CTAAATTA  TTCTATCGGT
901    TCTTATTATA AACCATGGTT  TTTTAAACAT GTTGAAAT  ATTTAAAAAC TAATAGGGAA
961    GGATTAGAAT  ACATTCATT  AAGACATTAT TATCATAGAC ATACTAGGTC TATCTTTTGG
1021   GAATTACAAG  ATATCATCCC ATTTGGTAAT AATCCAATCT TTAGATATTT ATTTGGTTGG
1081   ATGGTCCAC  CAAAAATCTC TTTATTA  TTAACTCAAG GTGAACTTT  ACGAAAGCTA
1141   TATGAGCAAC ACCACGTCGT  TCAAGATATG TTAGTTCCAA TGAAATGTTT ATCTCAAGCA
1201   TTACATACCT TCCAAAATGA  TATCCATGTT TATCCAATCT GGTATGTCC  ATTTATCTTA
1261   CCATCTCAAC CTGGTCTGGT  CCACCCTAAA GGTGACGAAG CTGAACTTTA TGTGATATC
1321   GGTGCCTATG GTGAGCCAAG  AGTTAAACAT TTTGAAGCTA GATCATGTAT GAGACAATTA
1381   GAAAAATTTG TTAGATCAGT  TCATGGTTTT CAAATGCTAT ATGCAGATTG TTACATGAAC
1441   AGAGAAGAAT TTTGGGAAAT  GTTCGATGGT TCTTTATATC ATAAATTAAG AAAACAATTA
1501   GGTGTCAAG  ATGCTTTTCC AGAAGTTTAT GATAAAATCT GTAAAGCTGC TAGACACTAA
1561   TGAGAATTC

```

5

La correspondiente secuencia de aminoácidos es:

SEQ.ID.NO:2

```

1      MEPÄVSLAVC ALLFLLWVRV KGLEFVLIHQ RWVFVCLFLL PLSLIFDIYY YVRAWVVKL
61     SSAPRLHEQR VQDIQKQVRE WKEQGSKTFM CTGRPGWLTV SLRVGKYKKT HKNIMINLMD
121    ILEVDTKKQI VRVEPLVSMG QVTALLNSIG WTLVLPELD DLTVGGLIMG TGISSSHKY
181    GLFQHICTAY ELILADGSFV RCTPSENSDL FYAVPWSCGT LGFLVAAEIR IIPAKKYVKL
241    RFEPVRGLEA ICEKFTHESQ RLENHFVEGL LYSLDEAVIM TGVMTDDVEP SKLNSIGSYY
301    KPWFVKHVEN YLKTNREGLE YIPLRHYYHR HTRSIFWELQ DIIPFGNNPI FRYLFGWMVP
361    PKISLLKLTQ GETLRKLYEQ HHVVQDMLVP MKCLSQUALHT FQNDIHVYPI WLCPFILPSQ
421    PGLVHPKGDE AELYVDIGAY GEPRVKHFEA RSCMRQLEKF VRSVHGFQML YADCYMNREE
481    FWEMFDGSLY HKLRKQLGCQ DAFPEVYDKI CKAARH

```

- 10 El gen de la esteroil $\Delta 24$ -reductasa de *D. rerio* (la secuencia de ADN está disponible con el número de acceso al GenBank NM_001008645 y la secuencia de aminoácidos con el número de acceso al GenBank NP_001008645) se recodificó con el método descrito más arriba. El nuevo gen sintético se denominó S24R2. Su secuencia se da seguidamente:

SEQ ID NO:3

1 GGATCCAAAA TGGACCCTTT GCTTTACCTT GGAGGCCTAG CGGTCCTCTT CCTTATTTGG
 61 ATTAAGGTAA AAGGTTTAGA ATATGTTATT ATCCATCAAA GATGGATCTT TGTTTGTTTA
 121 TTTTATTAC CATTATCTGT CGTCTTCGAT GTTTATTATC ATTTAAGAGC TTGGATCATC
 181 TTTAAAATGT GTTCTGCTCC AAAACAACAT GATCAAAGAG TTAGGGATAT TCAAAGGCAA
 241 GTCCGTGAAT GCGGGAAGGA TGGGGGTAAG AAATACATGT GCACCGGTAG GCCAGGTTGG
 301 CTGACTGTTT CTTAAGAGT CGGTAAATAT AAAAAAATC ATAAAAATAT CATGATCAAT
 361 ATGATGGATA TCTTAGAAGT TGATACCAAA AGAAAAGTTG TGAGAGTAGA ACCATTAGCT
 421 AATATGGGTC AAGTTACTGC TTTATTAAAT TCTATCGGTT GGACATTACC TGTCTTACCA
 481 GAACTTGATG ACTTAACTGT TGGTGGTTA GTCATGGGCA CTGGTATTGA ATCTTCTTCT
 541 CATATCTATG GTTATTTTCA ACATATCTGT GTTGCATTTG AATTAGTTTT AGCTGATGGT
 601 TCTTTAGTTA GGTGTACAGA AAAGGAAAAC TCTGATTTAT TTTATGCTGT CCCATGGAGC
 661 TGTGGTACCT TAGGTTTTCT AGTCGCGGCT GAAATTCGTA TTATTCCTGC TCAAAAATGG
 721 GTCAAATTAC ATTATGAACC TGTCAGGGGA TTAGACGCTA TTTGCAAAA ATTTGCTGAA
 781 GAGTCTGCTA ATAAAGAAAA TCAATTTGTT GAAGGATTAC AATATTCTAG AGATGAAGCT
 841 GTTATTATGA CGGGTGTAAT GACGGATCAT GCAGAACCCG ATAAAACATA TTGTATTGGG
 901 TATTATTATA AACCTTGGTT CTTTAGACAT GTTGAATCTT TTTTAAAACA AAATAGAGTT
 961 GCTGTTGAAT ATATCCCATT AAGACATTAT TATCATAGAC ATACTAGATC AATCTTTTGG
 1021 GAACTGCAAG ACATCATTCC ATTTGGCAAT AATCCACTTT TTAGGTACGT TTTTGGATGG
 1081 ATGGTGCCAC CAAAAATCTC TTTATTAAAA TTAACAAG GTGAAACTAT CAGAAAATTA
 1141 TATGAACAAC ATCATGTTGT TCAAGATATG TTAGTTCCAA TGAAAGATAT CAAAGCTGCT
 1201 ATCCAAAGAT TTCATGAAGA TATTATGTC TATCCATTAT GGCTTTGTCC ATTTTATTA
 1261 CCAAATCAAC CTGGAATGGT GCATCCGAAA GGGGATGAGG ACGAGTTATA TGTGGATATT
 1321 GGGGCTACG GCGAACCCAA AGTAAAACAT TTCGAAGCAA CTTCTTCTAC TAGACAATTA
 1381 GAAAAATTTG TCCGTGATGT CCATGTTTTT CAAATGCTCT ACGCAGATGT CTATATGGAG
 1441 AGAAAAGAAT TTTGGGAAAT GTTCGACGGT ACTTTATATC ATAAATTAAG AGAAGAAGCTG
 1501 GGCTGTAAGG ATGCCTTTCC CGAAGTGTTT GACAAAATCT GTAAAAGTGC ACGTCATTAA
 1561 TGAGAATTC

5

La correspondiente secuencia de aminoácidos es:

SEQ. ID.No:4

1 MDPLLYLGGL AVFLIWIKV KGLEYVIIHQ RWIFVCLFLL PLSVVFVYVY HLRRAWIIFKM
 61 CSAPKQHDQR VRDIQRQVRE WRKDGKRYM CTGRPGWLTV SLRVGKYKKT HKNIMINMMD
 121 ILEVDTKRKV VRVEPLANMG QVTALLNSIG WTLPLVPELD DLTVGGLVMG TGISSSHIY
 181 GLFQHCIVAF ELVLADGSLV RCTEKENS DL FYAVPWSCGT LGFLVAAEIR IIPAQKWKVL
 241 HYEPVRGLDA ICKKFAEESA NKENQFVEGL QYSRDEAVIM TGVMTDHAEP DKTNCIGYYY
 301 KPWFRRHVES FLQQRVAVE YIPLRHYHR HTRSIFWELQ DIIPFGNNPL FRYVFGWMP
 361 PKISLLKLTQ GETIRKLYEQ HHVVQDMLVP MKDIKAAIQR FHEDIHVYPL WLCPFLLPNQ
 421 PGMVHPKGD ELYVDIGAY GEPKVKHFEA TSSTRQLEKF VRDVHGFQML YADVYMERKE
 481 FWEMFDGTLY HKLREELGCK DAFPEVFDKI CKSARH

10

EJEMPLO 2

Selección de las secuencias de aminoácidos que son homólogas a la secuencia de aminoácidos de la colesterol C25-hidroxilasa de *Homo sapiens* y cálculo de unas secuencias de ADN alternativas, optimizadas para la expresión en *S. cerevisiae*

15

La actividad de la colesterol C25-hidroxilasa se ha mostrado para unos productos génicos de *H. sapiens* y *M. musculus* (Lund y colaboradores, 1998; US6562609). La búsqueda en unas bases de datos públicas tales como el GENBANK o el EMBL acerca de unas enzimas que son homólogas a la colesterol C25-hidroxilasa humana se realizó con el programa lógico disponible públicamente BLASTp utilizado en condiciones clásicas. Entre las secuencias encontradas, la secuencia de *S. scrofa*, que muestra una identidad de aminoácidos de 82 % con la secuencia de aminoácidos de *H. sapiens* (Tabla 2) y de 79 % con la secuencia de *M. musculus*, y la secuencia de *C. familiaris*, que muestra una identidad de aminoácidos de 70 % con la secuencia de un ser humano y con la de un ratón (Tabla 4), se seleccionaron para realizar unas investigaciones posteriores.

20

Tabla 4: Identidad de aminoácidos entre diferentes colesterol C25-hidroxilasas putativas.

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Canis familiaris</i>
<i>Homo sapiens</i>	100 %	78 %	82 %	70 %
<i>Pan troglodytes</i>	99 %	78 %	82 %	70 %
<i>Macaca mulata</i>	94 %	77 %	82 %	70 %
<i>Mus musculus</i>	78 %	100 %	79 %	70 %
<i>Rattus norvegicus</i>	80 %	86 %	79 %	72 %
<i>Bos taurus</i>	84 %	79 %	86 %	70 %
<i>Equus caballus</i>	83 %	79 %	83 %	73 %
<i>Gallus gallus</i>	61 %	58 %	59 %	57 %
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	63 %	62 %	61 %	58 %

El gen de la colesterol C25-hidroxilasa de un cerdo (la secuencia de ADN es accesible con el número de acceso al GenBank AY974088 y la secuencia de aminoácidos lo es con el número de acceso al GenBank Q4G1G8) se recodificó reemplazando veinticinco codones que corresponden a unos codones que son raramente utilizados por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por unos codones que son frecuentemente utilizados en una levaduras (Zhang y colaboradores, 1991). El nuevo gen sintético se denominó C25H1. Su secuencia se da seguidamente:

SEQ.ID.NO:5

```

1      GGATCCAAAA TGAGCGGCCA CAACAACCTCC GAGCTTTTCG TCCTTTGCAG CTCCAGCCAG
61     CTGTTCCCTGC AGCCCCTTTG GGACCACCTG AAGACCTGGG AGACCCTTAT CCTGTCGCC
121    TTCTTCCCAG TCTTCTTCTC CATCACCACC TACTTGGGCT TCTGCCTGCC CTTCTGTGGTA
181    CTGGATGTCT TATGCCCATG GGTGCCCGCA CTGAGGCGTT ACAAGATCCA CCCAGACTTC
241    TCGCCATCGG TGTGGCAGCT GCTGCCCTGC CTGGGGCTGA CACTTTACCA GCATGTGGTG
301    TTCGTGTTCC CAATGACTCT GTTGCACTGG GCAGCAAGCC CAGTCTTCT GCCCCAGAA
361    GCCCCGAGC TGCTTCAGCT GGTGCGTCAC ATCGTGCTGT GCCTGCTGCT TTTCGACACC
421    GAATTTTTC TCTGGCATGT GCTGCATCAC AAAGTGCCTT GGCTGTACAG GACCTCCAC
481    AAGATGCACC ACCAGAATC GTCCCTCGTT GCACTGGCCA CACAGTACAT GAGTGTCCGG
541    GAGCTACTTT CTTTGGGTGT CTTTGACATG GTGAACATCA TGCTGCTTAG GTGCCACCCA
601    CTTACCGTCC TGATCTTCCA CGTGATCAAC ATCTGGCTGT CGGTGGAGGA CCACTCCGGC
661    TATGACTTCC CCTGGTCCGC TCACAGACTA GTACCTTTCG GGTGGTATGG GGGCGTGACA
721    CACCACGACC TACATCACTC CCAGTTTAAAC TGCAACTTCG CCCCTTACTT CACACACTGG
781    GACAAAATAC TGGGAACACT GAGGTCTGCT CATGCCAAGT AATGAGAATT C

```

La correspondiente secuencia de aminoácidos es:

SEQ.ID.No:6

```

1      MSGHNNSELF VLCSSSQFL QPLWDHLKTW ETLILSPFFP VFFSITTYLG FCLPFVVLVDV
61     LCPWVPALRR YKIHPDFSPS VWQLLPLGL TLYQHVVVFV PMTLLHWAAS PVLLPPEAPE
121    LLQLVRHIVL CLLFDTEFF IWHVLHKKVP WLYRTFHKMH HQNSSSFALA TQYMSVGELL
181    SLGVFDMVNI MLLRCHPLTV LIFHVINIWL SVEDHSGYDF PWSAHLRVPF GWYGGVTHHD
241    LHHSQFNCNE APYFTHWDKI LGTLRSAHAK

```

Una secuencia alternativa de aminoácidos de una esterol C25-reductasa putativa de un cerdo procedente de la base de datos GENBANK, que muestra cuatro diferencias con la secuencia utilizada, también está a disposición, pero no se utilizó ulteriormente en los experimentos:

SEQ ID NO:7

```

1      MSGHNNSELL VLCSSQFL QPLWDHLKTW ETLIQSPFFP VFFSITTYLG FCLPFVVLVDV
61     LCPWVPALRR YKIHPDFSPS VWQLLPLGL TLYQHVVVFV PMTLLHWAAS PVLLPPEAPE
21     LLQLVRHIVL CLLFDTEFF IWHVLHKKVP WLYRTFHKMH HQNSSSFALA TQYMSVGELL
181    SLGVFDMVNI MLLRCHPLTV LIFHVINIWL SVEDHSGYDF PWSTHRLVVPF GWYGGVTHHD
241    LHHSQFNCNE APYFTHWDKI LGTLRSAHAK

```

El gen procedente de *Canis familiaris* (la secuencia de nucleótidos accesible con el número de acceso al GenBank XM_546596.2 y la secuencia de aminoácidos con el número de acceso al GenBank XP_543596.1), se recodificó con el método de ajuste que se ha descrito en el Ejemplo 1. El nuevo gen sintético se denominó C25H3, y su secuencia de ADN se da seguidamente:

SEQ ID. NO. 8:

```

1      GGATCCAAAA TGCTTCACA TAATCTCTCT GGCCTTTAG CCTTAGGACC ACCTGGTCAA
61     CTATTATTAC AACCTTTATG GGACCAAGTT AGGGCAAGGG CAGCATTAGC GCAATCGCCT
121    CCCTTTGCAG TCCTTTTTTC TATCACTGCT TATTAGGTT GTTGTTTACC ATTTGTTTTA
181    TTAGATTTAT TATGTCCAAG AGTTAGAGCA TTAAGGAGAT ATAAAGTCCA TCCCATTGTT
241    GGACCATCTG CAAGGCAATT ATTAGGTTGT TTAGGTAGGA CTGTCTGTCA ACATGTAGCT
301    TTATTATTAC CAGCTTCTTT ATTACATTGT GCCAGGGGTC CCGCTCCATG GCCGAGAGAA
361    GCACCAGAAT TATTACAATT AGCTAGACAT GTTTtaggTT GTTTATTATT ATTTGATGCT
421    GAAGTTTTTG CTTGGCACGT TTTACATCAT AGACTTCCAT GGCTTTATAG AACTTTTCAT
481    AAATTACATC ATCAACATGC TGCTTCATTT GCTTTAGCTA CTCAATATAT GGGTGCTTGG
541    GAGTTATTAT CTTTAGGTTT TTTTCATGTT TTAATGTTG TTTTATTACA ATGTCATCCA
601    TTATCTGTTT TAGCTTTTCA TTTATTAAT ATCTGGCTAT CTGTTGAAGA TCATTCAGGT
661    TATGATTTCC CATGGTCGAC CCATCGATTA GTCCCTTTG GTTGGTACGG TGGAGTTGCT
721    CATCATGATT TACATCATTC ACAATTTAAT TGTAATTTT CACCATATT TACTCATTGG
781    GACAGAATTT TGGGTACCTT AAGGTCTGCA CCAGCCAAAT AATGAGAATT C
    
```

La correspondiente secuencia de aminoácidos es:

5 SEQ.ID NO:9:

```

1      MSSHNSSGPL ALGPPGQLLL QPLWDQVRAR AALAQSPPEA VLFSITAYLG CCLPFVLLDL
61     LCPRVRALRR YKVHPDCGPS ARQLLGCLGR TVCQHVALLL PASLLHCARG PAPWPPEAPE
121    LLQLARHVLG CLLLFDAEVF AWHVLHHRVP WLYRIFHKLH HQHAASFALA TQYMGAWELL
181    SLGFFHVLNV VLLQCHPLSV LAFHLLNIWL SVEDHSGYDF PWSTHRLVPE GWYGGVAHHD
241    LHHSQFNCNF APYFTHWDRI LGTLRSAPAK
    
```

Ejemplo 3

Construcción del plásmido de expresión V51TDH-S24R1

10 Se construyeron unos vectores de expresión utilizando la tecnología clásica de biología molecular que se ha descrito por Sambrook y colaboradores (1989) y las enzimas de restricción de ADN y de modificación se utilizaron tal como lo recomienda el proveedor (New England Biolabs, Ipswich, MA 01938-2723, EE.UU.).

15 El vector de expresión constitutivo de múltiples copias básico V51TDH se derivó del vector V51 reemplazando el promotor *GAL10-CYC1* inducible por galactosa por el promotor del gen *TDH3* expresado constitutivamente (el gen YGR192C procedente de la anotación sistemática de genes en la base de datos del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica la isozima 3 de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). El V51 lleva el origen de la replicación ColE1 y el gen *bla* (de resistencia a la ampicilina) para el mantenimiento en *Escherichia coli*, el origen 2 μ y el gen *URA3* para el mantenimiento en levadura, el promotor híbrido *GAL10-CYC1* y las regiones terminadoras de *PGK1*, separadas por un sitio de clonación múltiple (MCS, acrónimo del inglés "multiple cloning site"), (pYeDP1/8-2, Cullin y Pompon, 1988). La región promotora de *TDH3* se amplificó mediante una PCR en el ADN genómico procedente de la cepa de levadura W303-1B (Thomas y Rothstein, 1989) y se preparó de acuerdo con Hoffman y Winston (1987) utilizando los siguientes cebadores:

25 PTDHAge 5'-CACCGGTGCCATTTCAAAGAATACGTA-3' (SEQ.ID.NO:10)
 PTDHBam 5'-TGGATCCTTATGTGTGTTTATTTCGAAAC-3' (SEQ.ID. NO:11)

30 El producto de amplificación por PCR se digirió por *Age* I y *Bam* HI y se utilizó para reemplazar al fragmento *Age* I-*Bam* HI con una longitud de 617 pb procedente de V51 que lleva el promotor *GAL10-CYC1*. El vector V51TDH resultante es un vector lanzadera de *E. coli/S. cerevisiae* de múltiples copias, que es útil para la expresión constitutiva de un gen de interés en una levadura por inserción en el MCS que está localizado entre el promotor de *TDH3* (*TDH3p*) y las regiones terminadoras de *PGK1* (*PGK1t*).

35 El vector V51TDH-S24R1 para la expresión constitutiva del gen sintético S24R1 (véase el Ejemplo 1) se construyó insertando el producto de restricción *Bam* HI-*Eco* RI con una longitud de 1564 pb del gen sintético S24R1 en el vector V51TDH cortado por restricción con *Bam* HI y *Eco* RI. El mapa de restricción del vector de expresión constitutivo V51TDH-S24R1 se da en la Figura 1.

Ejemplo 4

Construcción del plásmido de expresión V51TDH-S24R2

40 El vector V51TDH-S24R2 para la expresión constitutiva de S24R2 (véase el Ejemplo 1) se construyó básicamente tal como ya se ha descrito en el Ejemplo 3. El producto de restricción *Bam* HI-*Eco* RI que tiene una longitud de 1.564 pb del gen sintético S24R2 se ligó dentro del vector V51TDH cortado por restricción con *Bam* HI y *Eco* RI. El mapa de restricción de V51TDH-S24R2 se da en la Figura 2.

Ejemplo 5
Construcción del plásmido de expresión centromérico pFLAde-S24R1

- 5 El vector pFLAde-S24R1 centromérico para la expresión constitutiva del gen S24R1 (véase el Ejemplo 1) se construyó por inserción del casete de expresión *TDH3p-S24R1-PGK1t* de V51TDH-S24R1 (descrito en el Ejemplo 3) en el vector lanzadera pFLAde *E. coli/S. cerevisiae* vacío, que lleva un centrómero de levadura y una secuencia de replicación autónoma (ARS CEN) y el marcador de selección *ADE2*. El vector pFLAde se construyó reemplazando el fragmento de *Bgl* II de 1,1 kb de pFL38 (Bonneaud y colaboradores, 1991) que codifica el gen *URA3* por un fragmento de *Bam* HI con una longitud de 2,7 kb que codifica el gen *ADE2* obtenido mediante una amplificación por PCR en un ADN genómico de levadura utilizando los siguientes cebadores:
- 10 ADE2-1 5'-CGGATCCACTAGTAACGCCGTATCGTGATTAACG-3', (SEQ ID NO:12)
ADE2-2 5'-AGGATCCTCCTGACGTAGCTATCCTCGGTTCTG-3'. (SEQ.ID NO:13)
- 15 El casete de expresión *TDH3p-S24R1-PGK1t* se amplificó mediante una PCR utilizando la polimerasa de ADN PrimeSTAR HS (Takara, Otsu, Shiga, Japón) en condiciones clásicas y los siguientes cebadores:
TDH 5'-AGGCGCGCCACCGGTGCCATTTCAAAGAA-3' (SEQ. ID NO:14)
PGK 5'-AGGCGCGCCCAAGCTTTAACGAACGCAGA-3'. (SEQ.ID.NO:15)
- 20 El producto de amplificación se clonó dentro de pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, EE.UU.). El casete *TDH3p-S24R1-PGK1t* era aislado a partir del vector posterior mediante corte por restricción con *Sac* I y *Pst* I, y se ligó dentro del vector pFLAde que había sido cortado por las mismas enzimas de restricción. El mapa de restricción del resultante vector centromérico de expresión pFLAde-S24R1 se da en la Figura 3.

- 25 **Ejemplo 6**
Construcción del vector de expresión V51-C25H1
- El plásmido V51-C25H1 para la expresión inducible por galactosa de C25H1 (véase el Ejemplo 2) se construyó insertando el fragmento de *Bam* HI-*Eco* RI con una longitud de 826 pb procedente de C25H1 en V51, que había sido digerido con *Bam* HI y *Eco* RI. El plásmido de expresión resultante V51-C25H1 codifica el gen sintético C25H1 bajo el control del promotor híbrido *GAL10-CYC1* que es inducible por galactosa (Guarente y colaboradores, 1982) y del terminador *PGK1*. El mapa de restricción de V51-C25H1 se da en la Figura 4.
- 30

- 35 **Ejemplo 7**
Construcción del vector de expresión V51-C25H3
- El vector V51-C25H3 para la expresión inducible por galactosa del gen sintético C25H3 (véase el Ejemplo 2) se construyó tal como ya se ha descrito en el Ejemplo 6 insertando el fragmento de *Bam* HI-*Eco* RI del gen sintético C25H3 que tiene una longitud de 826 pb dentro de V51 digerido con *Bam* HI y *Eco* RI. El plásmido de expresión resultante V51-C25H3 codifica el gen sintético C25H3 bajo el control del promotor híbrido *GAL10-CYC1*, que es inducible por galactosa, y del terminador *PGK1*. El mapa de restricción de V51-C25H3 se da en la Figura 5.
- 40

Ejemplo 8
Transformación de cepas de levadura y extracción de esteroides

- 45 La cepa W303-1B (MAT α ; *ura3-52*; *trp1-1*; *leu2-3,112*; *his3-11*; *ade2-1*; *can1-100*; Thomas y Rothstein, 1989) y su mutante de *erg6* ERT (MAT α ; *erg6::TRP1*; *ura3-52*; *trp1-1*; *leu2-3,112*; *his3-11*; *ade2-1*; *can1-100*) se transformaron con los diferentes plásmidos de expresión que se han descrito más arriba. La desactivación de *ERG6* de la cepa ERT se obtuvo insertando el gen funcional *TRP1* en *ERG6*. El gen de *TRP1* de pFL45 (Bonneaud y colaboradores, 1991) se amplificó por PCR utilizando el cebador *TRP1* bordeado por las secuencias de *ERG6*. Las secuencias de los cebadores son las siguientes:
- 50 ERGTRP-1:
5'-CATAAGATGAGTGAAACAGAATTGAGAAAAAGACAGGCCCAATCAAATTCG
GGTCGAAAAAGAAAAG-3', (SEQ.ID.NO:16)
- ERGTRP-2:
5'-CTAGCGACGAAAAGCATCATTGGAGTGAATAACTTGGACTTACCATTCTTAG
CATTTTGAC-3'. (SEQ.ID.NO:17)
- 55 El resultante producto de la PCR se utilizó para convertir a la cepa W303-1B utilizando la técnica de litio-PEG tal como se ha descrito por Gietz y colaboradores (1995). Los transformantes se seleccionaron en un medio definido sin triptófano, y su composición de esteroides se verificó mediante una HPLC (Lecain y colaboradores, 1996) confirmándose la ausencia de ergosterol y la presencia de unos esteroides inusuales con el conocido efecto de una desactivación de *ERG6*. Un transformante *rg6::TRP1* se mantuvo para realizar unos estudios ulteriores y se denominó ERT.
- 60

Además del ERT, también la cepa del tipo silvestre de *S. cerevisiae* BY4742 (genotipo MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0; Brachmann y colaboradores, 1998) se utilizó como anfitrión para los plásmidos construidos.

5 La transformación de BY4742, W303-1B y ERT se realizó por el método de litio-PEG tal como se ha descrito por Gietz y colaboradores (1995). Los transformantes se seleccionaron en un medio mínimo definido (véase la **Tabla 1**) sin uracilo ni adenina, dependiendo del marcador de selección que está presente en el vector. Se analizaron por lo menos dos transformantes independientes de cada transformación. Para el análisis de los esteroides, los transformantes se cultivaron en un medio sintético (descrito en la **Tabla 2**) hasta que alcanzaron la fase estacionaria.

10 Las células de levadura se recuperaron por centrifugación a partir del medio de cultivación y se lavaron con un volumen igual de agua desionizada. Las células se resuspendieron en 100 μ l de agua en un tubo Eppendorf con una capacidad de 2 ml y se rompieron arremolinando intensamente (durante 5 min) en presencia de 0,1 g de perlas de vidrio (de 0,5 mm). Se añadieron 2 ml de 1,2-dicloroetano a las células resuspendidas y la mezcla se arremolinó intensamente durante 5 minutos. Después de haber centrifugado durante 5 minutos a 10.000 rpm, la fase de disolvente se transfirió al tubo de vidrio. La extracción se realizó dos veces. La fase orgánica agrupada se evaporó bajo nitrógeno. Como la última etapa, el extracto seco se resuspendió en 100 μ l de acetonitrilo para un análisis por HPLC.

Ejemplo 9

20 **Análisis de los esteroides mediante una cromatografía de fase líquida de alto rendimiento (HPLC) con una detección por espectrometría de rayos UV y de masas**

Una parte alícuota, usualmente 30 μ l, del extracto de esteroides preparado tal como se ha descrito en el Ejemplo 8 se analizó mediante una HPLC de fase inversa vigilada mediante una detección por espectrometría de rayos UV y de masas. Una HPLC "Waters Alliance HT 2790" se acopló con un detector de rayos UV de matriz de fotodiodos del tipo "Waters PDA 996" y con el detector de masas "Waters MicroMass ZQ" (Waters, Milford, MA01757, EE.UU.). La separación se realizó en una columna XTerra RP18 3.5 μ m 4.6 x 100 mm (Waters, Milford, MA01757, EE.UU.) a 60°C con un gradiente lineal de 0,03 % (v/v) de agua/acetonitrilo que contenía ácido fórmico. La muestra se inyectó, después de haber estabilizado la columna, con un tampón que contenía 80 % del tampón A (agua con 0,03 % de ácido fórmico) y 20 % del tampón B (acetonitrilo con 0,03 % de ácido fórmico). Durante los primeros 5 minutos, la composición de tampones se cambió gradualmente desde 80 % del tampón A y 20 % del tampón B hasta 25 % del tampón A y 75 % del tampón B. En los siguientes 15 minutos, la composición de tampones se cambió gradualmente desde 25 % del tampón A y 75 % del tampón B hasta 12,5 % del tampón A y 87,5 %. En el último minuto del protocolo de separación se alcanzaron 100 % del tampón B. Este valor se mantuvo durante 2 minutos para permitir la regeneración de la columna.

La cromatografía se vigiló entre 205 y 300 nm con un detector de matriz de fotodiodos. El detector de masas permitió la detección mediante una pulverización eléctrica positiva de m/z desde 350 hasta 450 con una sensibilidad sede 1 unidad de m/z.

40 Los esteroides se identificaron basándose en su comportamiento cromatográfico, sus espectros de absorción de rayos UV y sus perfiles de fragmentación de masas en comparación con unos patrones (véase la **Tabla 5**). El patrón de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (puesto a disposición por DSM) se acetiló para dar el acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (25OH-7DHC-Ac.) con anhídrido de ácido acético, en presencia de piridina, de acuerdo con Seçen y Kalpar (1999). 0,5 mg del 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol seco se resuspendieron en 1 ml de una mezcla de anhídrido de ácido acético / una solución de piridina (50/50 v/v) y se calentó a 55°C durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con 4 ml de agua. 0,5 ml de la mezcla de reacción diluida se extrajeron con 1,2-dicloroetano tal como se ha descrito en el Ejemplo 8, antes de un análisis por HPLC.

50 Analizado en las condiciones que se describieron más arriba, el patrón de 25OH-7DHC-Ac mostró un desplazamiento en el tiempo de retención (RT 8,5 min) en comparación con el patrón de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol no acetilado (RT, 6,9 min) debido a la más alta hidrofobicidad del compuesto acetilado. El perfil de fragmentación de masas del patrón de 25OH-7DHC-Ac era similar al perfil del patrón de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol no acetilado. Una señal de m/z correspondiente a la forma acetilada no se detectó nunca, probablemente debido a la desacetilación que aparece durante la detección en el detector de masas.

Tabla 5: Propiedades cromatográficas, espectrales y de fragmentación de masas de los diferentes esteroides

Compuestos	Nombre usual	Abreviatura	Tiempo de retención	Absorción max. de rayos UV	m/z
Ergosta 5,7,22-trienol	Ergosterol	E5,7,22	11,9 min	282 nm	379
Ergosta 5,7,22,24-tetraenol	/	E5,7,22,24	10,0 min	233 nm	377
Colesta 5,7,22,24-tetraenol	/	C5,7,22,24	9,2 min	233 nm	363
Colesta 5,7,24-trienol	/	C5,7,24	10,3 min	282 nm	365
Colesta 5,7,22-trienol	/	C5,7,22	10,8 min	282 nm	365
Colesta 5,7-dienol	7-deshidrocolesterol (7-DHC)	C5,7	11,8min	282 nm	367
Acetato de 25-hidroxi-colesta-5,7-dienol	25OH-7DHC-Ac	25OH-C5,7-Ac	8,5 min	282 nm	365-383
Acetato de 25-hidroxi-ergosterol	25OH-ergosterol-Ac	25OH-E5,7,22-Ac	8,7 min	282 nm	377-395

Ejemplo 10**Expresión del gen S24R1 procedente del plásmido V51TDH-S24R1 en la cepa ERT de *S. cerevisiae* deficiente en *ERG6***

5

El plásmido V51TDH-S24R1 (véase el Ejemplo 3) y el vector vacío V51TDH como testigo se transformaron dentro de la cepa ERT mediante la técnica de litio-PEG (Gietz y colaboradores, 1995). Los transformantes se seleccionaron en un medio mínimo definido sin uracilo. Cuatro transformantes independientes procedentes de cada transformación se analizaron en cuanto a la existencia del plásmido. Uno de los transformantes confirmados se escogió aleatoriamente, se denominó respectivamente ERT/V51TDH y ERT/V51TDH-S24R1 y se utilizó para unos análisis posteriores.

10

15

Las cepas se cultivaron hasta la fase estacionaria en 2 % (p/v) del medio de Kapelli con glucosa (véase la **Tabla 2**), todos los esteroides se extrajeron tal como se ha descrito en el Ejemplo 8 y se analizaron mediante una HPLC con detecciones por espectrometría de rayos UV y de masas, tal como se ha descrito en el Ejemplo 9. Los esteroides más importantes se identificaron por sus propiedades de tiempo de retención, de masas y espectrales utilizando los respectivos patrones (véase la **Tabla 5**).

20

Los perfiles de elución en HPLC (detección con rayos UV a 282 nm) se muestran en la **Figura 6**. El colestano-5,7,22,24-tetraenol (RT 9,2 min, m/z = 363, UV max 233 nm) era el principal esteroide encontrado en la cepa testigo ERT/V51TDH *erg6*, correspondientemente a un 70 % de la señal de UV a 282 nm. Un 7 % de los esteroides totales identificados a 282 nm se identificaron como el colestano-5,7,24-trienol (RT 10,3 min, m/z = 365, UV max 282 nm; **Figura 6-A**).

25

30

El perfil de esteroides de la cepa ERT/V51TDH-S24R1 (**Figura 6-B**) que expresa el gen S24R1 reveló la presencia de dos esteroides que no habían sido detectados en la cepa testigo ERT/V51TDH, a saber el colestano 5,7,22-trienol (RT 10,8 min, m/z = 365, UV max 282 nm), el principal esteroide de esta cepa (60 % de la señal de rayos UV a 282 nm), y el colestano 5,7-dienol, también denominado 7-deshidrocolesterol (RT 11,8, m/z = 367, UV max 282 nm). La presencia del colestano-5,7-dienol y del colestano-5,7,22-trienol generados por reducción del enlace Δ^{24-25} del colestano 5,7,24-trienol y del colestano 5,7,22,24-tetraenol confirmó la actividad de esteroide Δ^{24} -reductasa del gen S24R1 (véase la **Figura 13**).

Ejemplo 11**Expresión del gen S24R2 procedente del plásmido V51TDH-S24R2 en la cepa ERT de *S. cerevisiae***

35

El plásmido V51TDH-S24R2 (Ejemplo 3), que expresaba constitutivamente el S24R2, se transformó dentro de la cepa ERT utilizando el protocolo con litio-PEG (Gietz y colaboradores, 1995). Los transformantes se seleccionaron en un medio mínimo sin uracilo. Se analizaron cuatro transformantes independientes y mostraron las mismas propiedades. Uno de ellos se denominó ERT/V51TDH-S24R2 y se utilizó para el análisis posterior.

40

45

La cepa era cultivada hasta que ella alcanzó la fase estacionaria en el medio de Kapelli con 2 % de glucosa (véase la **Tabla 2**) y los esteroides se extrajeron y se analizaron tal como se ha descrito en los Ejemplos 8, 9 y 10. De nuevo, el colestano 5,7,22,24-tetraenol (RT 9,2 min, m/z = 363, UV max 233 nm) y el colestano 5,7,24-trienol (RT 10,3 min, m/z = 365, UV max 282 nm) eran los principales esteroides encontrados en la cepa testigo ERT/V51TDH (**Figura 6-A**), mientras que el principal esteroide detectado en la cepa ERT/V51TDH-S24R2, que expresa el S24R2, fue el colestano 5,7,22-trienol (RT 10,8 min, m/z = 365, UV max 282 nm) con un 70 % de la señal de rayos UV a 282 nm (**Figura 6-C**). El colestano 5,7-dienol (7-deshidrocolesterol; RT 11,8, m/z = 367, UV max 282 nm) se encontró en las concentraciones más bajas (13 % de la señal de rayos UV). Estos resultados confirman la actividad de esteroide Δ^{24} -reductasa del gen S24R2.

50

Ejemplo 12
Expresión del gen S24R1 procedente del plásmido centromérico pFLAde-S24R1
en la cepa ERT de *S. cerevisiae*

5 El plásmido centromérico pFLAde-S24R1 (Ejemplo 5) para la expresión constitutiva del gen S24R1 se transformó dentro de la cepa ERT utilizando el método con litio-PEG (Gietz y colaboradores, 1995). Los transformantes se seleccionaron en un medio definido sin adenina. Cuatro transformantes independientes se analizaron en cuanto a la aparición del plásmido pFLAde-S24R1 y a su patrón de esteroides. Uno de ellos se escogió aleatoriamente, se denominó ERT/pFLAde-S24R1 y se utilizó para la ilustración ulterior de los resultados.

10 El ERT/pFLAde-S24R1 se cultivó en el medio de Kapelli con 2 % de glucosa (véase la **Tabla 2**) hasta que alcanzó la fase estacionaria. Los esteroides se extrajeron y se analizaron tal como se ha descrito en los Ejemplos 8 y 9. El nuevo esteroide principal en ERT/pFLAde-S24R1, que no estaba presente en el testigo, fue el colestano 5,7,22-trienol (RT 10,8 min, m/z = 365, UV max 282 nm) con 60 % de la señal de rayos UV a 282 nm (**Figura 6-D**). También se detectó una cantidad más pequeña (7 % de la señal de rayos UV) de 7-deshidrocolesterol (RT 11,8, m/z = 367, UV max 282 nm). Aparte de estos nuevos esteroides, el colestano 5,7,22,24-tetraenol (RT 9,2 min, m/z = 363, UV max 233 nm) y el colestano 5,7,24 (RT 10,3 min, m/z = 365, UV max 282 nm), que también están presentes en la cepa testigo ERT (**Figura 6-A**), se encontraron también en ERT/pFLAde-S24R1. Estos resultados confirman la actividad de esteroide Δ 24-reductasa del gen S24R1, expresado a partir del plásmido centromérico pFLAde-S24R1.

Ejemplo 13
Producción de acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol por expresión concomitante
de los genes S24R1 y C25H1 en la cepa ERT de *S. cerevisiae*

25 El plásmido V51-C25H1 (Ejemplo 6) para la expresión inducible por galactosa del gen C25H1 y el plásmido V51 como testigo se transformaron dentro de la cepa ERT/pFLAde-S24R1 (descrita en el Ejemplo 12) con el método de litio-PEG (Gietz y colaboradores, 1995). El V51-C25H1 y el pFLAde-S24R1 son unos plásmidos compatibles. Sus diferentes orígenes, el 2 μ y un ARS-CEN, permiten su aparición simultánea en una levadura. Los transformantes se seleccionaron en un medio mínimo sin uracilo ni adenina. Cuatro transformantes independientes procedentes de cada transformación se analizaron y mostraron las mismas propiedades. Un transformante procedente de cada transformación se escogió aleatoriamente, se denominó ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H1 y ERT/pFLAde-S24R1/V51, respectivamente, y se utilizó para el análisis ulterior.

35 Las cepas se cultivaron en el medio de Kapelli con 2 % de galactosa (véase la **Tabla 2**) hasta que ellos alcanzaron la fase estacionaria. Los esteroides se extrajeron y se analizaron por HPLC con detección por espectrometría de rayos UV y de masas tal como se ha descrito en los Ejemplos 8 y 9 en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo 10. Tal como se encontró para la cepa testigo ERT/pFLAde-S24R1/V51 (**Figura 7-C**), el principal esteroide en ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H1 (**Figura 7-D**) era el colestano 5,7,22-trienol (RT 10,8 min, m/z = 365, UV max 282 nm), generado por reducción del esteroide final colestano 5,7,22,24-tetraenol por la esteroide Δ 24-reductasa. Un nuevo compuesto, que no estaba presente en la cepa testigo, se observó en la cepa ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H1 (**Figura 7-D**), que era eluido al mismo tiempo que el acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (25OH-7DHC-Ac) preparado, inyectado como un patrón (RT 8,5 min, **Figura 7-B**). Este compuesto mostró también un perfil de absorción de rayos UV (**Figura 8-C**) idéntico al del acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol preparado (**Figura 8-B**), con el pico doble situado aproximadamente a 282 nm, que es específico para los enlaces dobles conjugados Δ 5- Δ 7 tal como se ha observado también para el patrón de 7-deshidrocolesterol (**Figura 8-A**). El nuevo compuesto mostró, por lo tanto, un perfil de fragmentación de masas (**Figura 9-C**) idéntico al del acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (**Figura 9-B**), tal como se determinó por un análisis de espectrometría de masas en línea (realizado tal como se ha descrito en el Ejemplo 9).

50 En el caso de los 3 β -hidroxiesteroides, el análisis por pulverización electrónica produce una señal principal con un peso molecular de menos diecisiete (protonación (+1) y deshidratación en la posición C3 (-18)). La señal principal para el 7-deshidrocolesterol (**Figura 9-A**) es con la masa m/z de 367 (384 (el 7-deshidrocolesterol PM) + 1 (protonación) - 18 (deshidratación del 3 β -hidroxiesteroide)). La señal observada para el acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol con la masa m/z de 383 corresponde a la hidroxilación adicional en la posición C-25 (367 + 16 = 383). La señal principal con la masa m/z de 365 corresponde a la deshidratación en la posición C25 (383 - 18 = 365) que aparece para una fracción de las moléculas durante la detección dentro del detector de masas. Estos diferentes resultados (el mismo tiempo de retención, el mismo perfil de UV, y la misma fragmentación de masas que el acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol utilizado como patrón) demostraron que el nuevo compuesto producido en la cepa ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H1 era el acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol.

60

Ejemplo 14**Producción de acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol mediante expresión concomitante de S24R1 y C25H3 en la cepa ERT de *S. cerevisiae***

5 El V51-C25H3 (Ejemplo 7), construido para la expresión inducible por galactosa del gen C25H3, se transformó dentro de la cepa ERT/pFLAde-S24R1 (véase el Ejemplo 13) por el método de litio-PEG (Gietz y colaboradores, 1995). Los transformantes se seleccionaron en un medio mínimo sin uracilo ni adenina. Cuatro transformantes independientes se analizaron para confirmar la aparición de ambos plásmidos. Uno de ellos se escogió aleatoriamente, se denominó ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H3 y se utilizó para estudios posteriores.

10 El ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H3 era cultivado en el medio de Kapelli con 2 % de galactosa (véase la **Tabla 2**) hasta llegar a la fase estacionaria. A partir de las células cosechadas, los esteroides se extrajeron y se analizaron mediante una HPLC con detecciones por espectrometría de rayos UV y de masas, tal como se ha descrito en los Ejemplos 8 y 9, en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo 10. Tal como se encontró en la cepa testigo ERT/pFLAde-S24R1/V51 (**Figura 7-C**), el principal esteroide en ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H3 (**Figura 7-E**) era el colestano 5,7,22-trienol (RT 10,8 min, m/z = 365, UV max 282 nm), el producto de reducción del esteroide final colestano 5,7,22,24-tetraenol con la esteroide Δ 24-reductasa, tal como ya se ha descrito en el Ejemplo 13.

20 Un compuesto, que no estaba presente en la cepa parental, se encontró en ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H3 (**Figura 7-E**) eluyéndose al mismo tiempo que el acetato de 25-hidroxi 7-deshidrocolesterol (RT 8,5 min, **Figura 7-B**). Al igual que en el caso del ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H1 (descrito en el Ejemplo 13), este compuesto mostró un idéntico perfil de absorción de rayos UV (**Figura 8**) y un idéntico perfil de fragmentación de masas (**Figura 9**) que el acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol. Estos resultados (el tiempo de retención, el perfil de UV y la fragmentación de masas son comparables a los del acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol) demuestran que el nuevo compuesto producido en ERT/pFLAde-S24R1/V51-C25H3 es, como en el Ejemplo 13, el acetato de 25-hidroxi 7-deshidrocolesterol.

Ejemplo 15**Producción de acetato de 25-hidroxi-ergosterol mediante expresión de C25H1 en las cepas W303-1B y BY4742 de *S. cerevisiae***

30 El plásmido V51-C25H1 (Ejemplo 6) construido para la expresión inducible por galactosa del gen C25H1, y el vector vacío V51 como testigo, se transformaron dentro de la cepa W303-1b (como se ha descrito en el Ejemplo 8) por el método de litio-PEG (Gietz y colaboradores, 1995). Los transformantes se seleccionaron en un medio mínimo sin uracilo. Cuatro transformantes independientes para cada transformación se analizaron en cuanto a la aparición del plásmido. Un transformante positivo para cada transformación se escogió aleatoriamente, se denominó W303/V51-C25H1 y W303/V51, respectivamente, y se utilizó para estudios posteriores.

40 Las cepas se cultivaron en el medio de Kapelli con 2 % de galactosa (véase la **Tabla 2**) hasta que alcanzaron la fase estacionaria. Los esteroides se extrajeron a partir de las células cosechadas y se analizaron mediante HPLC con detecciones por espectrometría de rayos UV y de masas, tal como se ha descrito en los Ejemplos 8 y 9, en las condiciones que se describieron en el Ejemplo 10. Los perfiles de elución en HPLC (detección con rayos UV a 282 nm) se muestran en la **Figura 10**. La señal principal observada para las dos cepas W303/V51-C25H1 (**Figura 10-C**) y W303/V51 (**Figura 10-B**) correspondía al ergosterol (ergosta 5,7,22-trieno), el principal esteroide de unas cepas de *S. cerevisiae* de tipo silvestre, tal como se ha demostrado mediante comparación con el tiempo de retención (**Figura 10-A**), el espectro de rayos UV (**Figura 11-A**) y el perfil de fragmentación de masas (**Figura 12-A**) del ergosterol (RT 11,9 min, m/z = 379, UV max 282 nm).

50 Una señal secundaria a los 10 min para la cepa W303/V51-C25H1 (**Figura 10-C**) se observó solamente como una señal traza para la cepa testigo W303/V51 (**Figura 10-B**). El perfil de rayos UV para este pico determinado por medio de una detección por PDA en línea (**Figura 11-B**) mostró una absorción máxima a 233 nm, que es específica para los enlaces dobles conjugados Δ 22 y Δ 24, además de los enlaces dobles conjugados Δ 5 y Δ 7, que son caracterizados por el pico doble situado en alrededor de 282 nm. Probablemente, esta señal correspondía al ergosta 5,7,22,24-tetraenol, uno de los últimos compuestos intermedios de la ruta de biosíntesis del ergosterol sin la reducción de Δ 24 por Erg4p (véase la **Figura 13**). La masa m/z de 377 detectada mediante una espectrometría de masas en línea (**Figura 12-B**) era compatible con la estructura del ergosta-tetraenol.

60 Una tercera señal a 8,7 min observada en un extracto de esteroides de la cepa W303/V51-C25H1 (**Figura 10-C**) mediante una HPLC estaba completamente ausente en W303/V51 (**Figura 10-B**). El perfil de rayos UV determinado de este pico (**Figura 11-C**) mostró el típico pico doble con un valor máximo a 282 nm, que es específico para los enlaces dobles conjugados Δ 5 y Δ 7. La fragmentación de masas (**Figura 12-C**) mostró una señal principal a m/z = 377 y una señal secundaria a m/z = 395, que son compatibles con una forma hidroxilada del ergosterol (379 + 16 = 395) y con su forma deshidratada (395 - 18 = 377). El perfil de fragmentación (**Figura 12-C**) era idéntico al del acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (**Figura 9-B**) exceptuando que todas las masas se aumentaron en 12 unidades de masa, correspondiendo a la diferencia de masas entre el 7-deshidrocolesterol (m/z = 367) y el ergosterol (m/z = 379). La diferencia de los tiempos de retención, de 3,2 min, entre este nuevo compuesto (RT 8,7

min) y el ergosterol (RT 11,9 min) era idéntica a la diferencia de los tiempos de retención entre el acetato de 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (RT 8,5 min) y el 7-deshidrocolesterol (RT 11,8).

5 Todas estas propiedades (el perfil de rayos UV, la fragmentación de masas, el tiempo de retención) son compatibles con la conclusión de que este nuevo compuesto producido por la expresión de C25H1 en W303/V51-C25H1 era el acetato de 25-hidroxi-ergosterol.

10 La transformación de V51-C25H1 y del vector vacío V51 como testigo dentro de la cepa BY4742 de *S. cerevisiae* condujo a unos resultados (**Figura 10**) comparables con los que se obtuvieron para las cepas W303/V51-C25H1 y W303/V51. La señal adicional a 8,7 min era observada de nuevo mediante una HPLC (detección por rayos UV) para el transformante V51-C25H1. El compuesto mostró el mismo perfil de rayos UV (**Figura 11**) y el mismo perfil de fragmentación de masas (**Figura 12**) que el compuesto detectado en W303/C25H1 lo que indica manifiestamente que este compuesto es también el acetato de 25-hidroxi-ergosterol.

15 **Ejemplo 16**
Producción de acetato de 25-hidroxi-ergosterol mediante expresión del gen C25H3
en la cepa W303-1B de *S. cerevisiae*

20 El plásmido V51-C25H3 (Ejemplo 7) construido para la expresión inducible por galactosa del gen sintético C25H3 se transformó dentro de la cepa W303-1B (tal como se ha descrito en el Ejemplo 8) utilizando el método de litio-PEG (Gietz y colaboradores, 1995). Los transformantes se seleccionaron en un medio mínimo sin uracilo. Cuatro transformantes independientes se analizaron en cuanto a la aparición del V51-C25H3. Un transformante positivo se denominó W303/V51-C25H3 y se utilizó para las investigaciones ulteriores de los esteroides producidos.

25 Las cepas se cultivaron en el medio de Kapelli con 2 % de galactosa (véase la **Tabla 2**) hasta que alcanzaron la fase estacionaria. Los esteroides se extrajeron a partir de las células cosechadas y se analizaron mediante HPLC con detecciones por espectrometría de rayos UV y de masas, tal como se ha descrito en los Ejemplos 8 y 9, en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo 10.

30 El análisis de los extractos de esteroides mediante HPLC (detección con rayos UV a 282 nm), tal como se presenta en la **Figura 10-D**, mostró que el modelo de esteroides de la cepa W303/V51-C25H3 era muy parecido al modelo de esteroides de la cepa W303/V51-C25H1 (Ejemplo 15), con un nuevo compuesto (RT 8,7 min) producido además del ergosterol (RT 11,9 min) y del ergosta 5,7,22,24-tetraenol (RT 10,0 min). Una detección con PDA de rayos UV en línea (**Figura 11**) y una espectrometría de masas (**Figura 12**) mostraron que el nuevo compuesto tenía las mismas propiedades que el compuesto producido por W303/V51-C25H1, por ejemplo el perfil de rayos UV específico para el enlace doble conjugado de $\Delta^5-\Delta^7$, una fragmentación de masas con una señal principal a $m/z = 377$ y una señal menor a $m/z = 395$, y un retraso del tiempo de retención en la HPLC que era compatible con un esteroide hidroxilado en la posición 25. Todas estas características (el perfil de rayos UV, la fragmentación de masas y el tiempo de retención) indican manifiestamente que este nuevo compuesto es el acetato de 25-hidroxi-ergosterol resultante a partir de la expresión de C25H3.

40 **Ejemplo 17**
Introducción de C25H1 y C25H3 dentro de la cepa de levadura que produce
principalmente colest-5,7,24-trienol

45 El plásmido V51-C25H1 (Ejemplo 6) y el plásmido V51-CH25H3 (Ejemplo 7) para la expresión de los genes inducibles por galactosa C25H1 y C25H3, y el plásmido V51 como testigo, se transformaron dentro de la cepa ERT erg5 erg6 (descrita en el Ejemplo 12; el ERG5 se desactivó mediante integración del gen URA3) con el método de litio-PEG (Gietz y colaboradores, 1995). Los transformantes se seleccionaron en un medio mínimo sin uracilo ni adenina. Cuatro transformantes independientes procedentes de cada transformación se analizaron y mostraron las mismas propiedades. Un transformante de cada transformación se escogió aleatoriamente, se denominó ERT erg5 erg6/V51-C25H1, ERT erg5 erg6/V51-C25H3 y ERT erg5 erg6/V51, respectivamente, y se utilizó para el análisis ulterior.

55 Las cepas se cultivaron en el medio de Kapelli con 2 % de galactosa (véase la **Tabla 2**) hasta que alcanzaron la fase estacionaria. Los esteroides se extrajeron y se analizaron por HPLC con detección por espectrometría de rayos UV y de masas, tal como se ha descrito en los Ejemplos 8 y 9, en las condiciones que se describieron en el Ejemplo 10. No se detectó ninguna diferencia en el modelo de los esteroides entre las tres cepas, lo que demuestra que las dos hidroxilasas no eran activas sobre el colest-5,7,24-trienol.

60

Ejemplo 18
Selección de genes adicionales de colesterol 25-hidroxilasas

5 Además de los genes seleccionados putativos de las colesterol 25-hidroxilasas procedentes de *S. scrofa* y *C. familiaris* (*Canis lupus*), los genes homólogos procedentes de *R. norvegicus* (SEQ.ID.NO:21, número de acceso al banco de genes NP_001020586, XP_220063), de *P. troglodytes* (SEQ.ID.NO:18, número de acceso al banco de genes XP_507901) y de *E. caballus* (SEQ.ID.NO:24, número de acceso al banco de genes XP_001503057) se investigaron más detalladamente.

10 Dos diferentes genes optimizados en cuanto a codones para la expresión en *S. cerevisiae* para cada una de las 25-hidroxilasas seleccionadas se calcularon (SEQ.ID.NOS:19, 20, 22, 23, 25, 26). Todos los genes que terminan con el sufijo "_opt" eran optimizados en cuanto a codones por la compañía DNA 2.0 (Menlo Park, CA, EE.UU.) utilizando un algoritmo de propietario. Todos los genes con el sufijo "_HY" se generaron situando siempre el codón más común para cada aminoácido en cada posición en la que aparece el aminoácido en la secuencia. Las típicas tablas de uso de codones para la levadura están a disposición públicamente y constituyen también una parte de la serie de programas Lasergene.

15 Dos nuevos genes optimizados para la 25-hidroxilasa procedente de *S. scrofa* (véase el Ejemplo 2) se calcularon también utilizando los mismos métodos que se han descrito más arriba (SEQ.ID.NO:27, 28).

20 Utilizando la alineación de secuencias de aminoácidos que se calculó con el conocido algoritmo ClustalW como entrada, se determinó una secuencia de aminoácidos de consenso simplemente seleccionando la posición de aminoácidos más abundante para cada posición. Si no se pudiese determinar "un aminoácido más abundante", el aminoácido para la respectiva posición se escogió arbitrariamente. Esta secuencia de aminoácidos ConHyD (SEQ.ID.NO:29) se tradujo de retorno también para dar dos diferentes secuencias de ADN, tal como se ha descrito más arriba (SEQ.ID.NO:30, 31).

SEQ.ID.NO:18 Secuencia de aminoácidos de la colesterol 25-hidroxilasa putativa de *P. troglodytes*:

MSCHNCSDPQVLCSSGQLFLQPLWDHLRSWEALLQSPFFPVIFSIITTYVGFCLFFVVLIDLCSWVPALRRYKIHP
 DFSPSARQLLPCLGQTLYQHVMFVFPVTLHWHARS PALLPHEAPELLLLLHHILFCLLLFDMEFFVWHLLHKKVP
 WLYRTEHKVHHQNSSSFALATQYMSVWELFSLGFFDMMNVTLLGCHPLTTLTFHVVNIWLSVEDHSGYNEFPWSTH
 RLVPFGWYGGVVHDLHSHFNCNFAPYFTHWDKILGLRTASVPAR

SEQ.ID.NO:19 Secuencia de ADN de *P. troglodytes* CH25OH_opt 2.0

ATGTCATGTCATAACTGTTCTGATCCTCAAGTTTTGTGTTCAAGTGGTCAACTGTTCCCTGCAACCTCTTTGGGAT
 CACTTGAGAAGTTGGGAGGCACTATTGCAGTCTCCATTCTTCCCTGTGATCTTCTCTATTACTACCTATGTTGGA
 TTCTGTTTGCCATTTGTGGTGCTGGACATCTATGCTCATGGGTTCCCTGCCTTGAGAAGGTATAAGATACATCCT
 GACTTTTCCCCTTCTGCTAGACAACCTTTTACCATGCTTAGGGCAAACATTGTACCAACACGTGATGTTTCGTTTTT
 CCAGTGACATTGTTGCATTGGGCTAGATCCCCAGCTTTACTTCCACACGAAGCCCCAGAACTGTTACTTCTACTA
 CACCACATTCTGTTCTGCTTGTGCTATTTGATATGGAGTTTTTCGTATGGCACTTGCTTCATCACAAAGTCCCA
 TGTTTATACAGAACCTTTTCATAAAGTACATCACAAAACCTCCTCCTTTCCTTTCGACTGGCCACTCAGTACATGTCT
 GTTTGGGAATTGTTTAGTTTTAGGGTTTTTCGATATGATGAATGTCACGTTGCTAGGCTGTCAACCATTAACGACA
 TTAACATTTTCATGTTGTCAATATCTGGTTGTGTCAGTTGAGGATCATAGTGGCTACAACCTCCCATGGTCTACGCAC
 AGATTAGTACCATTTCGGTTGGTATGGTGGTGTGTACATCATGACTTGATCACTCTCATTTCAATTGTAACCTTT
 30 GCTCCTTACTTCACACATTGGGATAAGATCCTAGGAACTCTGAGAACAGCCTCAGTACCTGCAAGGTAATGA

SEQ.ID.NO:20 Secuencia de ADN de *P. troglodytes* CH25OH_HY

ATGTCCTTGTCACAACCTGTTCTGATCCACAAGTTTTGTGTTCTTCTGGTCAATTGTTCTTGCAACCATTGTGGGAT
 CACTTGAGATCaTGGGAAGCcTTGTTGCAATCTCCATTCTTCCCAGTTATTTTCTCTATTACTACTTACGTTGGT
 TTCTGTTTGCCATTTCGTTGTTTTGGATATTTGTGTTCTTGGGTTCCAGCTTTGAGAAGATACAAGATTCACCCA
 GATTTCTCTCCATCTGCTAGACAATTGTTGCCATGTTTGGGTCAAACCTTTGTACCAACACGTTATGTTTCGTTTTT
 CCAGTTACTTTGTTGCACTGGGCTAGATCaCCAGCTTTGTTGCCACACGAAGCTCCAGAATTGTTGTTGTTGTTG
 CACCACATTTTGTCTGTTTGTGTTGTTGTCGATATGGAGTTCTTCGTTTGGCACTTGTTCACCACAAGGTTCCA
 TGTTGTACAGAACTTTCCACAAGGTTCCACCACAAAACCTTCTTCTTTCGCTTTGGCTACTCAATACATGTCT
 GTTTGGGAATTGTTCTTTCGTTTTCGATATGATGAACGTTACTTTGTTGGGTTGTCCACCATTGACTACT
 TTGACTTTCACGTTGTTAACATTTGGTTGTCTGTTGAAGATCACTCTGGTTACAACCTCCCATGGTCTACTCAC
 AGATTGGTTCCATTTCGTTTGGTACGGTGGTGTGTTCCACCACGATTTGCACCCTCTCACTTCAACTGTAACCTC
 GCTCCATACTTCACTCACTGGGATAAGATTTGGGTACTTTGAGAAGCTTCTGTTCCAGCTAGATAATGA

SEQ.ID.NO:21 Secuencia de aminoácidos de la colesterol 25-hidroxilasa putativa de *R. norvegicus*

MACHNVSELQDLGCSNQLLLQPLWDSIRTEASARSFFFPVIFSIPTYLGFCLPFVVDLPCWPVPI LRRYKIHP
 DFSPSVRQLLPCGLTLYQHLVVFVPTLMHWARS PALLPREAPELSQLLSHVLI CLLLLFDEIFAWHLLHKKVP
 WLYRTEFHKVHQNSSSFALATQYMSVWELLSLTFDFVLNVAMLQCHPLTILVFHVVNIWLSVEDHSGYDFPWSTH
 5 RLVFPGWYGGVAHHDLHHSQFNCNFAPYFTHWDKMLGLRCA PHSKRLCAGSESCLD SGEQCTVHLNQKKQT

SEQ.ID.NO:22 Secuencia de ADN de *R. norvegicus* CH25OH_opt 2.0

ATGGCTTGTCATAATGTTTCAGAATTGCAGGATTTGGGTTGTAGTAACCAATTACTACTACAACCCTTTGGGAC
 TCTATCAGAACTGGCGAAGCATCTGCTCGTTCTCCATTCTTCCCCTGTCATTTTCTCCATTTTCACTTACTTAGGC
 TTTTGCTGCACTTTGTAGTCTTGATGTAATTTGTCCATGGGTTCCCTATACTTAGAAGATACAAGATCCATCCT
 GACTTCTCACCATCCGTCAGGAGTTGCTACCTTGTCTGGGCTAACATTGTATCAGCACCTAGTGTTCGTTTTT
 CCAGTACATTGATGCACTGGGCTAGATCACCAGCCCTGCTACCTAGAGAAGCACCAGAGTTATCTCAATTACTG
 TCCCATGTAATGATGCTTGTGTTGTTGACACTGAAATCTTTGCTTGGCATCTTTTACACCACAAAGTTCCCT
 TGGTTATACAGAACCTTCCATAAGGTGCATCACCAAAACCTATCTTCATTTGCTTTAGCCACTCAATACATGAGT
 GTGTGGGAGCTGTTATCATTAACCTTTTTCGATGTCCTTAATGTTGCCATGCTTCAATGTCACCCTTTGACAATT
 CTGGTTTTTCATGTTGTAACATCTGGTTGTCTGTAGAAGATCACTCTGGATATGATTTCCCATGGTCTACTCAT
 AGGTTAGTTCCTTTTCGTTGGTACGGGGGTGTAGCACATCATGATCTGCATCATAGTCAATTCAACTGCAATTT
 GCACCATACTTACACATTGGGATAAGATGCTAGGGACTCTAAGATGTGCCCCACACTCCAAGAGACTTTGTGCT
 GGATCAGAATCTTGCCTAGATAGTGGTGAACAATGTACAGTGCACCTGAACCAGAAAAAGAAACAAACATGATAA
 TGA

SEQ.ID.NO:23 Secuencia de ADN de *R. norvegicus* CH25OH_HY

ATGGCTTGTCACAACGTTTCTGAATTGCAAGATTTGGGTTGTTCTAACCAATTGTTGTTGCAACCATTGTGGGAT
 TCTATTAGAAGCTGGTGAAGCaTCTGCTAGATCaCCATTCTTCCCAGTTATTTTCTCTATTTTCACTTACTTGGGT
 TTCTGTTTGCCATTTCGTTGTTTTGGATGTTTTGTGTTCCATGGGTTCCAATTTTGAGAAGATACAAGATTCACCCA
 GATTTCTCTCCATCTGTTAGACAATTGTTGCCATGTTTGGGTTTACTTTGTACCAACACTTGGTTTTTCGTTTTT
 CCAGTTACTTTGATGCACTGGGCTAGATCaCCAGCTTTGTTGCCAAGAGAAGCTCCAGAATTGTCTCAATTGTTG
 TCTCACGTTTTGATTTGTTGTTGTTGTTGTCGATACTGAAATTTTCGCTTGGCACTTGTTCACCACAAGGTTCCA
 TGTTGTACAGAACTTTCCACAAGGTTCCACCACAAAACCTTCTTCTTTCGCTTTGGCTACTCAATACATGTCT
 GTTTGGGAATTGTTGCTTTTACTTTCTTCGATGTTTTGAACGTTGCTATGTTGCAATGTCACCATTGACTATT
 TTGGTTTTCCACGTTGTTAACATTTGGTTGTCTGTTGAAGATCACTCTGGTTACGATTTCCCATGGTCTACTCAC
 10 AGATTGGTTCCATTTCGTTTGGTACGGTGGTGTGCTCACCACGATTTGCACCCTCTCAATTCAACTGTAACCTC
 GCTCCATACTTCACTCACTGGGATAAGATGTTGGGTACTTTGAGATGTGCTCCACACTCTAAGAGATTGTGTGCT
 GGTCTGAATCTTGTTTGGATTCTGGTGAACAATGTACTGTTCACTTGAACCACAAAAGAAGAAGCAAACTTAATGA

SEQ.ID.NO:24 Secuencia de aminoácidos de la colesterol 25-hidroxilasa putativa de *E. caballus*:
 MSGHNSSELHVLCSGQLFLQPLWDSLRTREALTHSPFFPVIFS IATYVGFCLPFVVLDDLCL

PWVPALRRYKIHPDFLPSARQVLPCLGQTLYQHLVVFVPATLLLWARGPVFLPLEAPELLQL
 AFHVVFCLLLFDTEFFLWHVLHKKVPWLYRTFHKMHQNSSSFALATQYMSIWELFSLVFFD
 IMNVTLLECHPLTILVFHVVNIWLSVEDHSGYDFPWSTHRLVFPFGWYGGVAHHDLHHSQFNC
 NFAPYFTHWDKILGTLRSAHAK

SEQ.ID.NO:25 Secuencia de ADN de *E. caballus* CH25OH_opt 2.0

ATGTCCGGCCATAACTCATCAGAACTTCATGTTTTGTGTTCCCTCGGCCAATTGTTCCACACCTTTGTGGGAT
 TCACTGAGAAGTAGAGAGGCTCTTACACACTCCCCATTCTTCCCAGTAATCTTCTCAATCGCAACTTACGTTGGA
 TTTTGTGTTGCCATTGTTGTCTTACTGTTATGCCCTTGGGTGCCAGCCCTTAGAAGATACAAGATACATCCT
 GATTTCTGCCAAGTCCAGACAGGCTTGGCATGCTTAGGTCAAACCCTTTACCAACATCTAGTGTTCGTATTC
 CCTGCAACACTATTGCIATGGGCTAGAGGGCCAGTATTTCTGCCTTTAGAAGCCCCTGAACTATTACAATTAGCA
 TTCCATGTCGTCTTTTGTCTGTTGTTATTCGATACCGAGTTTTTCTGTGGCATGTTTTACATCATAAAGTACCA
 TGGTTATACCGTACATTTACAAAATGCACCATCAAAACAGTTCCTCTTTCGCCCTTGCTACTCAGTATATGTCT
 ATCTGGGAAGTGTTAGTCTAGTCTTTTTTCGACATATGAACGTTACATTGTTGGAATGTCACCCATTGACAATA
 CTTGTTTTTCATGTTGTAATATCTGGCTTTCTGTTGAAGATCACTCTGGTTACGATTTCCCTTGGTCAACACAT
 AGGTTAGTTCATTCGGATGGTATGGTGGAGTGGCTCACCATGATTTGCATCACTCACAATTCAATTGCAATTC
 GCACCATACTTCACTCACTGGGATAAGATTTTGGGTACACTAAGGTCTGCACACGCTAAGTAATGA

5 SEQ.ID.NO:26 Secuencia de ADN de *E. caballus* CH25OH_HY

ATGTCTGGTCACAACCTCTTCTGAATTGCACGTTTTGTGTTCTTCTGGTCAATTGTTCTTGAACCATTGTGGGAT
 TCTTTGAGAAGTAGAGAGGCTTTGACTCACTCTCCATTCTTCCCAGTATTTTCTCTATTGCTACTTACGTTGGT
 TTCTGTTTGCATTCGTTGTTTTGGATTGTTGTGTCCATGGGTTCCAGCTTTGAGAAGATACAAGATTCACCCA
 GATTTCTTGGCATCTGCTAGACAAGTTTTGCCATGTTTGGGTCAAACCTTTGTACCAACACTTGGTTTTCGTTTTT
 CCAGTACTTTGTTGTTGTGGGCTAGAGGTCCAGTTTTCTTGCATTGGAAGCTCCAGAATTGTTGCAATTGGCT
 TTCCACGTTGTTTTCTGTTTGTGTTGTTGTCGATACGAATTTTTCTTGTGGCACGTTTTGCACCACAAGGTTCCA
 TGGTTGTACAGAAGTTTCCACAAGATGCACCACAAAACCTTCTTCTTTTCGCTTTGGCTACTCAATACATGTCT
 ATTTGGGAATTGTTCTTTGGTTTTCTTCGATATATGAACGTTACTTTGTTGGAATGTCACCCATTGACTATT
 TTGGTTTTCCACGTTGTTAACATTTGGTTGTCTGTTGAAGATCACTCTGGTTACGATTTCCCATGGTCTACTCAC
 AGATTGGTTCCATTCGGTTGGTACGGTGGTGTGCTCACCACGATTTGCACCCTCTCAATTCAACTGTAACCTC
 GCTCCATACTTCACTCACTGGGATAAGATTTTGGGTACTTTGAGATCAGCTCAGCTCAGCTAAGTAATGA

SEQ.ID.NO:27 Secuencia de ADN de *S. scrofa* CH25OH_opt 2.0

ATGTCTGGTCATAACAATTCTGAGCTATTAGTTCATGTTCTAGTGGACAGTTGTTCCCTCAGCCATTATGGGAT
 CATTTGAAAACCTGGGAACTTTGATTCAATCACCATTCTTCCCAGTCTTTTTCTCAATAACAACCTTATCTGGGT
 TTCTGTTTACCTTTTCGTAGTCTAGATGTTCTATGTCTTGGGTGCCAGCACTTAGAAGATACAAGATCCACCCT
 GACTTCTCACCATCCGTTTGGCAACTACTTCCATGTTTAGGATTAACCCTTTACCAACATGTTGTTTTTGTTTTT
 CCAATGACACTATTACTGGGCTGCTTCACTTCTTACTACCTCCTGAAGCTCCTGAGTTACTGCAATTAGTG
 AGACATATAGTTTTGTGCTTGTCTGTTGTCGATACAGTTTTTTCAATTTGGCATGTTTGCATCACAAGTACCA
 TGGTTGTATAGGACATTTCATAAGATGCACCATCAGAACAGTTCCTCTTTCGCCCTGGCCACTCAATACATGTCA
 GTCGGCGAAGTGTGTTCTTTGGGTGATTTGATATGGTTAACATCATGCTACTACGTTGTCATCCACTTACAGTG
 TTGATCTTTTCATGTCATTAACATCTGGCTTTTCAGTAGAAGATCATAGTGGATACGACTTTCCATGGTCTACTCAC
 AGACTGGTTCATTCGGTTGGTACGGAGGTGTAACACACCACGATTTGCATCACTCTCAATTCAATTGCAATTC
 GCTCCATACTTCAACATTTGGGATAAGATATTGGGCACATTAAGATCCGCACACGCAAAGTAATGA

SEQ.ID.NO:28 Secuencia de ADN de *S. scrofa* CH25OH_HY

ATGTC TGGT CACA ACAACT CTGA ATTG TTCG TTTT GTGT CTCT CTCA ATTG TTCT TGCA ACCATT GTGGGAT
 CACTTGAAGACTTGGGAAACTTTGATTTGTCTCCATTCTTCCCAGTTTCTCTCTATTACTACTTACTTGGGT
 TTCTGTTGCCATTGCGTTGTTTGGATGTTTGTGTCCATGGGTTCCAGCTTTGAGAAGATACAAGATTCACCCA
 GATTTCTCTCCATCTGTTTGGCAATTGTTGCCATGTTGGGTTGACTTTGTACCAACACGTTGTTTTCGTTTTC
 CCAATGACTTTGTTGCACTGGGCTGCTTCTCCAGTTTGTGGCCACCAGAAGCTCCAGAATTGTTGCAATTGGTT
 AGACACATTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGTCGATACTGA_gTTCTTCATTTGGCACGTTTGCACCACAAGGTCCA
 TGGTTGTACAGA ACTTTCCACAAGATGCACCACCAAACTCTTCTCTTTTCGCTTTGGCTACTCAATACATGTCT
 GTTGGTGAATTGTTGCTTTGGGTGTTTTCGATATGGTTAACAATTATGTTGTTGAGATGTCACCCATTGACTGTT
 TTGATTTCCACGTTATTAACAATTGGTTGTCTGTTGAAGATCACTCTGGTTACGATTTCCCATGGTCTGCTCAC
 AGATTGGTTCCATTGCGTTGGTACGGTGGTGTACTCACCACGATTTGCACCCTCTCAATTCAACTGTAACCTC
 GCTCCATACTTCACTCACTGGGATAAGATTTTGGTACTTTGAGATCaGCTCACGCTAAGTAATGA

SEQ.ID.NO:29 Secuencia de aminoácidos de ConHyD

MSCHNSSELQVLCSGQLFLQPLWDHLRTWEALIQSPFFPVIFSIITYVGFCLPFVLDVLCPPWVPALRRYKIHP
 DFSPSARQLLPLCGLQTLYQHVVFVFPVLLHWARS PALLPREAPELLQLLSHVLFCLLLFDTEFFVWHLLHKKVP
 WLYRTEFKVHHQNSSS FALATQYMSVWELL SLGFFDMLNVTLLQCHPLTVLTFHVVNIWLSVEDHSGYDFPWSTH
 RLVPEGWYGGVAHHDHLHHSQFNCFAPYFTHWDKILGLRSa_hAK

5 SEQ.ID.NO:30 Secuencia de ADN de ConHyD_opt 2.0

ATGTC TTGC CACA ATTCTCTGAGCTTCAAGTATTGTTTCATCAGGTCAGTTGTTTTGCAACCATTATGGGAT
 CACTTAAGGACGTGGGAAGCCCTGATTCAAAGTCCTTCTTCCCTGTGATATTCTCCATAACTACTTACGTGGC
 TTTTGTTTACCATTGTTGTTTGGATGTTCTATGCCCATGGGTTCCAGCTCTGAGAAGATACAAGATTCATCCA
 GATTTCTCCCCTTCAGCCAGACAATTGTTACCATGTTGGGGCAAACTATATCAGCATGTGGTCTTTGTTTTT
 CCTGTGACTCTATTACATTGGGCCAGAAGTCCTGCTTTGCTGCCTAGAGAAGCCCCTGAACTGTTGCAGTTATTG
 TCTCACGTTCTATTCTGTTTGTGCTTTTCGATACAGAGTTTTTCGTTTGGCATCTACTTCATCATAAAGTTCCA
 TGGCTGTATAGAACGTTCCACAAGTCCACCACCAGA ACTCTAGTTCATTTCGCATTGGCCACCAATACATGTCC
 GTATGGGA ACTGCTATCTTTAGGCTTTTTCGATATGCTTAATGTCACCTTTTGCAATGTCATCCTTTGACAGTG
 CTAACATTCCATGTAGTGAACATCTGGTTATCTGTAGAAGATCACAGTGGATATGATTTTCCCTGGTCTACTCAC
 AGGTTGGTTCCATTGGATGGTATGGTGGTGTAGCTCATCACGACCTGCATCATTACAATTCAATTGCAACTTT
 GCTCCATACTTTACACATTGGGACAAAATCTTGGGAACATTAAGGTCTGCTCATGCAAAGTGA

SEQ.ID.NO:31 Secuencia de ADN de ConHyD_HY

ATGTC TTGT CACA AACTCTTCTGAATTGCAAGTTTTGTGTCTCTCTGGTCAATTGTTCTTGCAACCATTGTGGGAT
 CACTTGAAGACTTGGGAAGCaTTGATTCAATCTCCATTCTTCCCAGTTATTTCTCTATTACTACTTACGTTGGT
 TTCTGTTTGGCATTGCGTTGTTTGGATGTTTGTGTCCATGGGTTCCAGCTTTGAGAAGATACAAGATTCACCCA
 GATTTCTCTCCATCTGCTAGACAATTGTTGCCATGTTGGGTCAA ACTTTGTACCAACACGTTGTTTTCGTTTTT
 CCAGTTACTTTGTTGCACTGGGCTAGATCaCCAGCTTTGTTGCCAAGAGAAGCTCCAGAATTGTTGCAATTGTTG
 TCTCACGTTTGTCTGTTTGTGTTGTTGTCGATACTGAATTTTCGTTTGGCACTTGTTCACCACAAGGTCCA
 TGGTTGTACAGA ACTTTCCACAAGGTTCCACCACCAAACTCTTCTCTTTTCGCTTTGGCTACTCAATACATGTCT
 GTTTGGGAATTGTTGCTTTGGGTTTCTTCGATATGTTGAACGTTACTTTGTTGCAATGTCACCCATTGACTGTT
 TTGACTTTCCACGTTGTTAACAATTGGTTGTCTGTTGAAGATCACTCTGGTTACGATTTCCCATGGTCTACTCAC
 AGATTGGTTCCATTGCGTTGGTACGGTGGTGTGCTCACCACGATTTGCACCCTCTCAATTCAACTGTAACCTC
 GCTCCATACTTCACTCACTGGGATAAGATTTTGGTACTTTGAGATCaGCTCACGCTAAGTAATGA

10

Ejemplo 19

Expresión de los nuevos genes de la 25-hidroxilasa de una construcción artificial de expresión integrada en ERG6

15

Los nuevos genes mostrados en el Ejemplo 18 se integraron en el sitio ERG6 de *S. cerevisiae* SC0554 (erg5, erg6, TRP1-pARC300D, URA3-pARC304S, ARE1::TDH3p-S24R2-PGKt-URA3; para una descripción de dos plásmidos véase el documento de patente de los EE.UU. 5.460.949).

La secuencia de la construcción artificial de integración se muestra más abajo. Las hidroxilasas de interés se clonaron entre los sitios de *Bam* HI y *Eco* RI de la construcción artificial de integración. La construcción artificial de integración ERG6 poseía el promotor de TDH3 y el terminador de PGK de *S. cerevisiae* para la expresión y el URA3 de *S. cerevisiae* para la selección, tal como se encontró en el plásmido V51TDH. La cultivación, la transformación y la selección se realizaron tal como se ha descrito más arriba.

5

Las cepas finales se denominaron:

S. cerevisiae Ecab HY (construcción artificial de integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:26),

Ecab opt 2.0 (construcción artificial de integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:25),

10 Ptro opt 2.0 (construcción artificial de integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:19),

Ptro HY (construcción artificial de integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:20),

ConHyD HY (construcción artificial de integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:31),

ConHyD opt 2.0 (construcción artificial de integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:30),

Rnor HY (construcción artificial de integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:23),

15 Rnor opt 2.0 (construcción artificial de integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:22),

Sscr HY (construcción artificial de integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:28),

Sscr opt 2.0 (construcción artificial de integración que posee el gen de la SEQ.ID.NO:27), y

Scr Pompon, que poseía la 25-hidroxilasa procedente de un cerdo, optimizada tal como se ha descrito en el Ejemplo 2.

20

SEQ.ID.NO:32 Secuencia de ADN de la construcción artificial de integración ERG6

gtcgacGTTTTACTTTTCGATTTAAGTTTTACATAAATTTAAAAAACAAGAATAAAATAAATATAGTAGGCAGC
ATAAGATGAGTGAAACAGAATTGAGAAAAAGACAGGCCCAATTCACTAGGGAGTTACATGGTGATGATATTGGTA
AAAAGACAGGTTTGAGTGCATTGATGTCGAAGAACAACCTCTGCCAAAAGGAAGCCGTTTCAGAAGTACTTGAGAA
ATTGGGATGGTAGAACCGATAAAGATGCCGAAGAACGTCGTCTTGAGGATTATAATGAAGCCACACATTCCTACT
ATAACGTCGTTACAGATTTCTATGAATATGTTGAGGTTCTCTTTCCATTTTCAGCAGATTTTATAAAGGTGAGA
GTTTCGCTGCCTCGATAGCAAGACATGAACATTATTTAGCTTACAAGGCTGGTATTCAAAGAGGCGATTAGTTC
TCGACGTTGGTTGTGGTGTGGGGGCCAGCAAGAGAGATTGCAAGATTTACCGGTGCCATTTCAAAGAATACGT
AAATAATTAATAGTAGTGATTTTCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGCCTTTTAATCTGCTGTAACCCGTA
CATGCCCAAAATAGGGGGCGGTTACACAGAATATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTTATTCCTGGC
ATCCACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTAAAGCTGGCATCCAGAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAATATTG
TTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAA
AAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCA
TGTATCTATCTCATTTTCTTACACCTTCTATTACCTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAGGT
TGAACACAGTTCCTCGAAATTTATCCCTACTTACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATGTAATTC
TGTAATCTATTTCTTAACTTCTTAAATCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTAAACACCAAGAA
CTTAGTTTCAATAAACACACATAAagatccattattatttgaattcGCGGGGATCTCCCATGTCTCTACTGGT
GGTGGTGCTTCTTTGGAATTAATGGAAGTAAGGAATGCCAGGTGTGCTTTCTTATCCGAAAAGAAATAAAT
GAATTGAATTGAAATCGTAGATCAATTTTTTCTTTTCTTTTCCCATCCTTTACGCTAAAATAATAGTTTATT
TTATTTTTGAATATTTTTATTTATATACGTATATATAGACTATTATTTATCTTTAATGATTATTAAGATTTT
TATTAATAAATAATTCGCTCTCTTTAATGCCTTTATGCAGTTTTTTTTTCCCATTCGATATTTCTATGTTCCG
GTTTCAGCGTATTTTAAAGTTTAATAACTCGAAAATTCGCGTTCGAAAGCTTTTCAATTCATCTTTTTTTTTTTG
TTCTTTTTTTGATTCCGGTTCTTTGAAATTTTTTTGATTCCGTAATCTCCGAGCAGAAGGAAGAACGAAGGAA
GGAGCACAGACTTAGATTGGTATATATACGCATATGTGGTGTGAAGAAACATGAAATTGCCAGTATCTTAAAC
CCAACGCACAGAACAAAACCTGCAGGAAACGAAGATAAATCATGTCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGCTGC
TACTCATCTAGTCTGTGCTGCCAAGCTATTTAATATCATGCACGAAAAGCAAACAACTTGTGTCTTCATT
GGATGTTCTGACCACAAGGAATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTCCAAAATTTGTTTACTAAAACACA
TGTGGAcATCTTGACTGATTTTCCATGGAGGGCACAGTTAAGCCGCTAAAGGCATTATCCGCCAAGTACAATTT
TTTACTCTTCGAAGACAGAAAATTTGCTGACATTGGTAATACAGTCAAATGCAGTACTCTGCGGGTGATACAG
AATAGCAGAATGGGCAGACATTACGAATGCACACGGTGTGGTGGGCCAGGTATTGTTAGCGGTTTGAAGCAGGC
GGCGAAGAAGTAACAAAGGAACCTAGAGGCCTTTTGATGTTAGCAGAATTGTCATGCAAGGGCTCCCTAGCTAC
TGGAGAAATATACTAAGGGTACTGTTGACATGCGAAGAGCGACAAAAGATTTTGTATCGGCTTTATGCTCAAAG
AGACATGGGTGGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTTGATTATGACACCCGGTGTGGGTTTAGATGACAAAGGAGA
CGCATTGGGTCAACAGTATAGAACCGTGATGATGGTCTCTACAGGATCTGACATTATATTGTTGGAAGAGG
ACTATTTGCAAAGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGTGAACGTTACAGAAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTTGAG
AAGATGCGGCCAGCAAACATAAAAACTGTATTATAAGTAAATGCATGTATACTAAACACAAAATTAGAGCTTC
AATTTAATTATATCAGTTATTACCCGGGAACTCGGTCGTAATGATTTCTATAATGACGAAAAAAAAAAAAATTGG
AAAGAAAAGCTTATTCACTAGATCAATAAGATTCAAATAAAGCGCACGATATATACCTATTTTCTATATATGC
AGATAAAAAGATAGCACGTTCAATGCTAGCAGGCCTTACAAACAGACTGTCCGATGCCTTTACTACCCACAATT
TATCCCACTTGTGATTTTCAAGTTCGGCTTTTTTTTTTTTTCATCATGTGCTGGCAAACGACCAGTATTTCTATC
AGAATRAAAAAAACTATAATTCACTGCATACAAACGTATTGACTGCTCCCTACAGCGGAAGATAGTAAGAATA
CAACATCGTAACGTGTTCCATATTTATGTGCCGATATGGTAAAAGTGAAATCTAAGAATAGTGTATAAAGCTAT
TGTCTACAGCGGCAAGTGGATACTCTCGTTACATCTCGATTAAGAAAAGGTGCACCTTTGGTTACTCAGGTCAGAT
ACGATCCTGTGGTGAACGGCATGTGCTTTCAAAGAAGCAAAGAAAAGGAAAGTGGCAGAAAgtcgac

Ejemplo 20
Ensayos con matraces de sacudimiento de las nuevas cepas de HyDHC

5 Las cepas que se generaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 19, se cultivaron en matraces de sacudimiento para evaluar el efecto de sobreexpresar los genes diseñados de nuevas de la 25-hidroxilasa putativa. 4 ml de un cultivo durante la noche en un medio YPD se utilizaron para la inoculación de 20 ml de un medio de Kapelli (Ejemplo 1). Después de cultivar durante 24 y 48 h, se añadieron 10 g/l y después de cultivar durante 32 y 56 h se añadieron 20 g/l de glucosa. Después de un tiempo de cultivación de 72 h, las células se centrifugaron y se saponificaron, y se determinó el contenido de esteroides tal como se ha descrito en el Ejemplo 9. Tal como se ha mostrado en la **Figura**
10 **15**, todos los nuevos genes de hidroxilasas se expresaron en *S. cerevisiae* y todos los productos génicos fueron capaces de hidroxilar al 7-DHC para dar el HyDHC, si bien con grados variables de eficacia.

Bibliografía:

- 15 Brachmann C.B., Davies A., Cost G.J., Caputo E., Li J., Hieter P., Boeke J.D. (1998). *Yeast* 14(2): 115-132.
- Crameri A., Biondi E., Kuehnle K., Lütjohann D., Thelen K.M., Perga S., Dotti C.G., Nitsch R.M., Ledesma M.D., Mohajeri M.H. (2006). *EMBO J.* 25(2):432-43.
- Cullin C., Pompon D. (1988). *Gene* 65:203-217.
- Bonneaud N., Ozier-Kalogeropoulos O., Li G.Y., Labouesse M., Minvielle-Sebastia L., Lacroute F. (1991). *Yeast* 7:609-615.
- 20 Gaber R.F., Copple D.M., Kennedy B.K., Vidal M, Bard M. (1989). *Mol Cell Biol* 9(8):3447-3456.
- Guarente L., Yocum R.R., Gifford P. (1982). *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7410-7414.
- Hoffman C.S. y Winston F. (1987). *Gene* 57:267-272
- Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R., Woods R.A. (1995). *Yeast* 11:355-360.
- Lecain E., Chenivresse X., Spagnoli R., Pompon D. (1996). *J Biol Chem* 271(18):10866-10873.
- 25 Lund E.G., Kerr T.A., Sakai J., Li W.P., Russell D.W. (1998). *J Biol Chem* 273(51):34316-34327.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1998). *Molecular cloning: a laboratory manual (Clonación molecular, un manual de laboratorio)*. 2ª edición, Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Seçen H., Kalpar H. (1999). *Turk J Chem* 23: 27-30.
- Thomas B.J. y Rothstein R. (1989). *Cell* 56(4):619-630.
- 30 Waterham H.R., Koster J., Romeijn G.J., Hennekam R.C.M., Vreken P., Andersson H.C., FitzPatrick D.R., Kelley R.I., Wanders R.J.A. (2001). *Am J Hum Genet* 69:685-694.
- Wu C., Miloslavskaya I., Demontis S., Maestro R., Galaktionov K. (2004). *Nature* 432 (7017):640-5.
- Zhang S.P., Zubay G., Goldman E. (1991). *Gene* 1005:61-72.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una utilización de la colesterol-C25-hidroxilasa para hidroxilar al ergosterol con el fin de producir el 25-hidroxi-ergosterol, en donde la producción se realiza en una célula de levadura, en la que el ERG6 y el ERG5 están desactivados, y la levadura expresa también una esterol Δ 24-reductasa.
- 10 2. Una utilización de la colesterol-C25-hidroxilasa para hidroxilar al 7-deshidrocolesterol con el fin de producir el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol, en donde la producción se realiza en una célula de levadura, en la que el ERG6 y el ERG5 están desactivados, y la levadura expresa también una esterol Δ 24-reductasa.
- 15 3. La utilización de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la célula de levadura se escoge entre el conjunto que se compone de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia spp.*, *Klyuveromyces spp.*, *Hansenula spp.*, *Schizosaccharomyces spec.* y *Yarrowia lipolytica*.
- 20 4. Un método de producir el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol en una levadura modificada genéticamente, que comprende:
a) poner en contacto el 7-deshidrocolesterol con una colesterol-C25-hidroxilasa producida por la levadura, con lo que se produce el 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol, en donde la levadura no posee enzimas Erg5p y Erg6p activas, y la levadura expresa también una esterol- Δ 24-reductasa.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la levadura expresa una versión truncada de HMG1.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, que antes de la etapa a) comprende además:
poner en contacto al colestá-5,7,24-trienol con una levadura, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica una enzima esterol- Δ 24-reductasa funcional, con lo que la levadura convierte al lanosterol, al dimetil-zimosterol, al metil-zimosterol, al zimosterol, al colestá-7,24-dienol o al colestá-5,7,24-trienol en el 3 β -hidroxi-8-lanosta-8-eno, el 4,4-dimetil-colestá-8-enol, el 4 α -metil-colestá-8-enol, el colestá-8-enol, el latosterol o el 7-deshidrocolesterol, respectivamente.
- 35 7. El método de producir el 25-hidroxi-ergosterol (la 25-hidroxi-provitamina D2) en una levadura modificada genéticamente, que comprende:
a) poner en contacto el ergosterol producido por la levadura con una colesterol-C25-hidroxilasa producida por la levadura, con lo que se produce el 25-hidroxi-ergosterol.

Figura 1

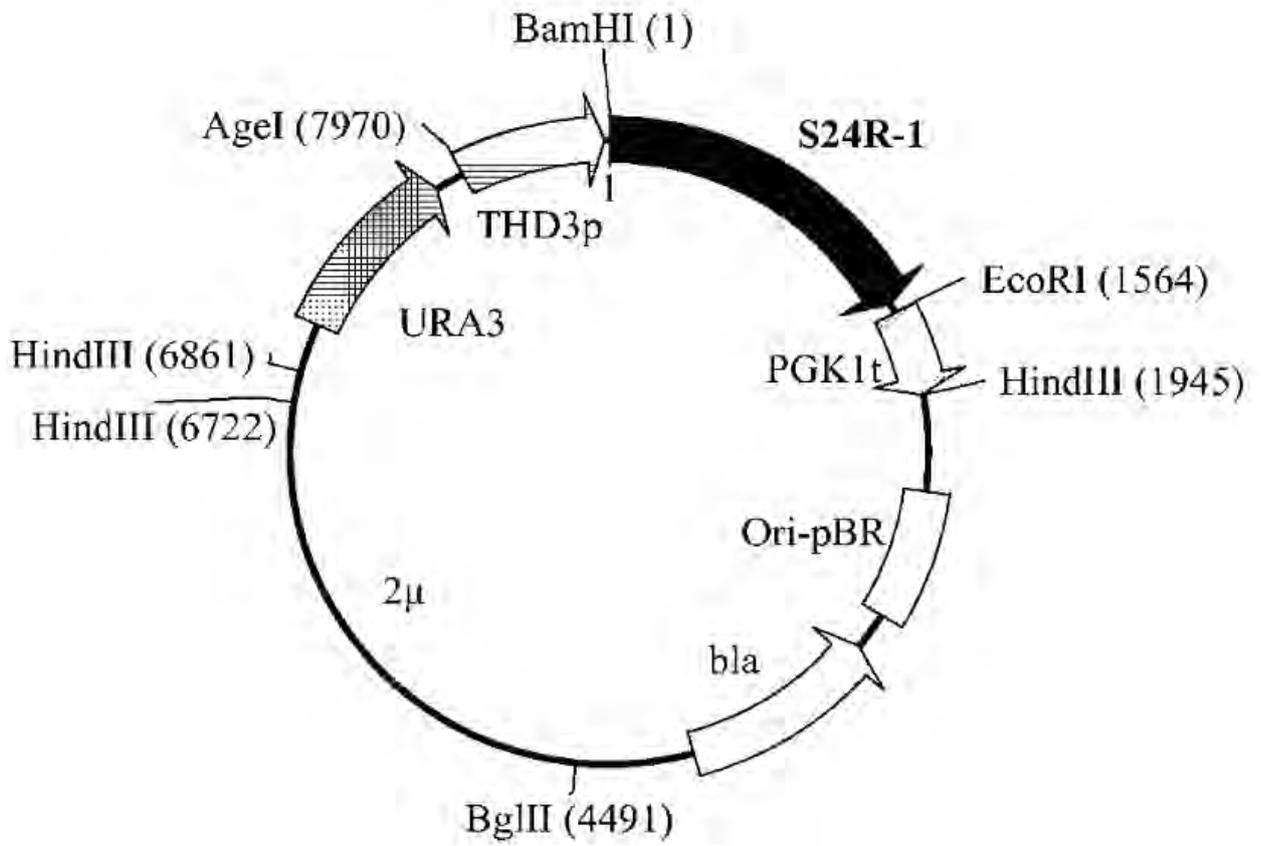


Figura 2

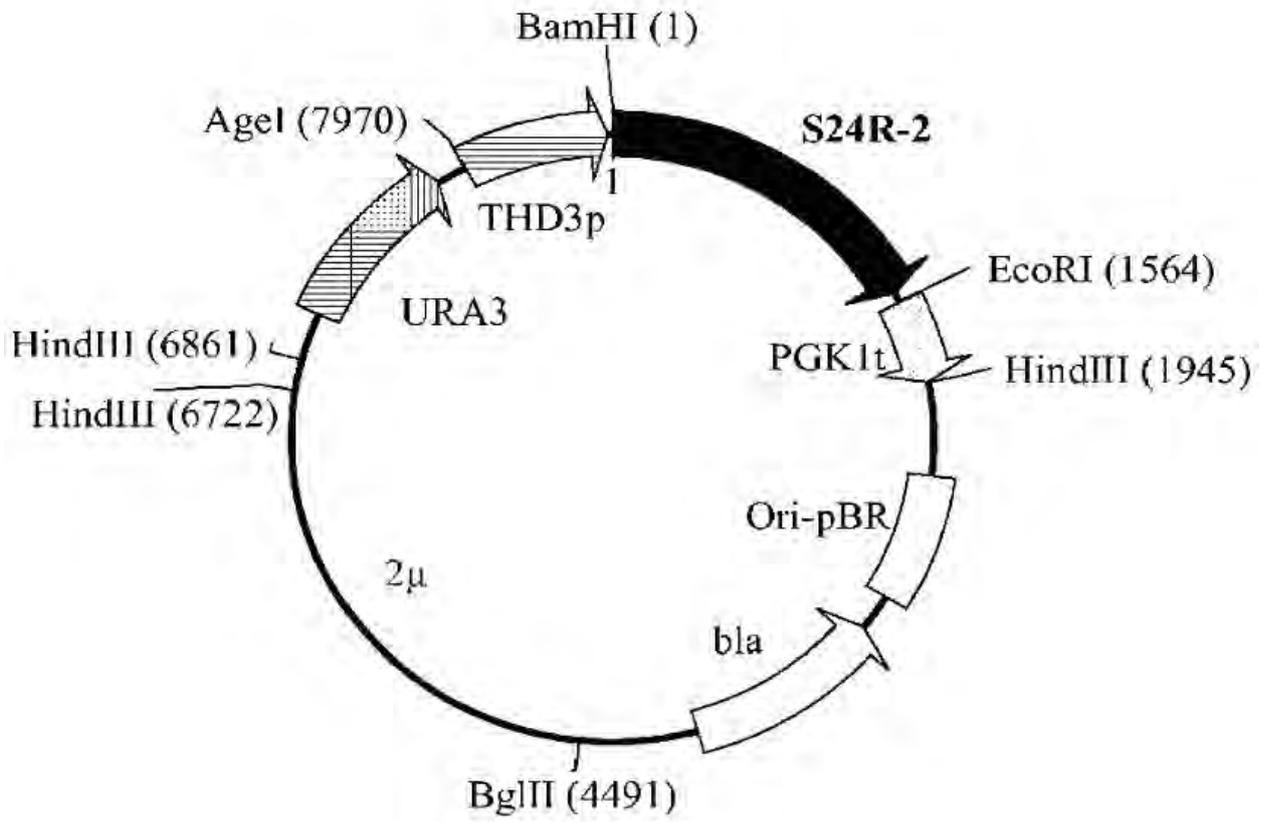


Figura 3

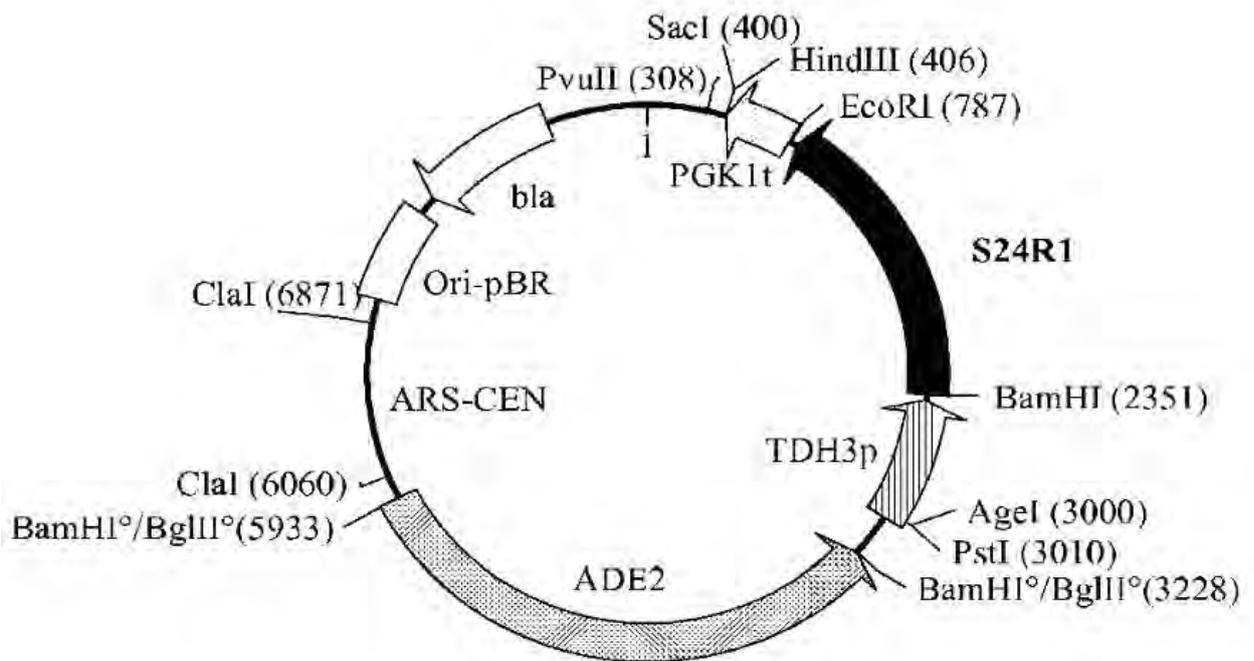


Figura 4

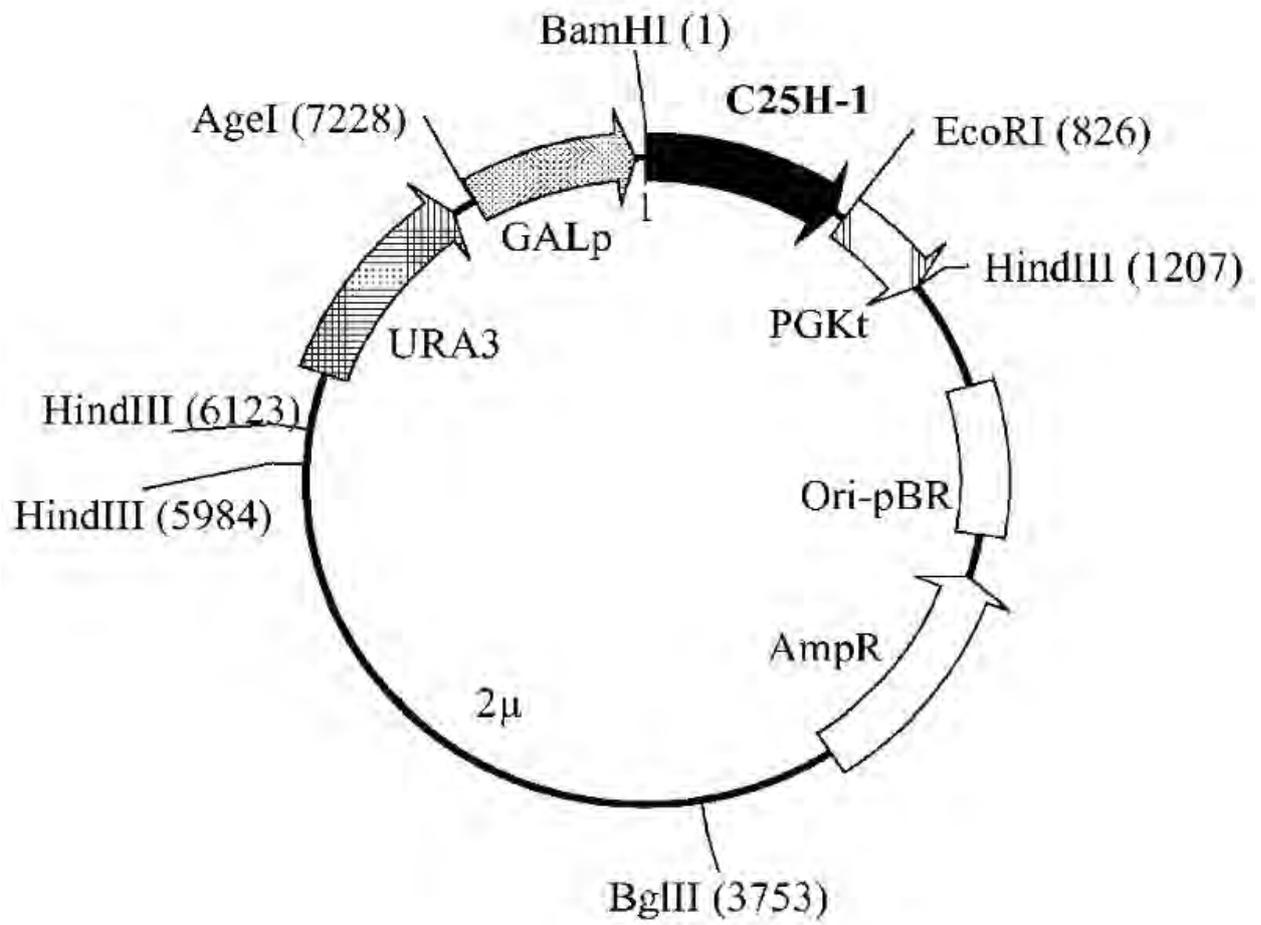


Figura 5

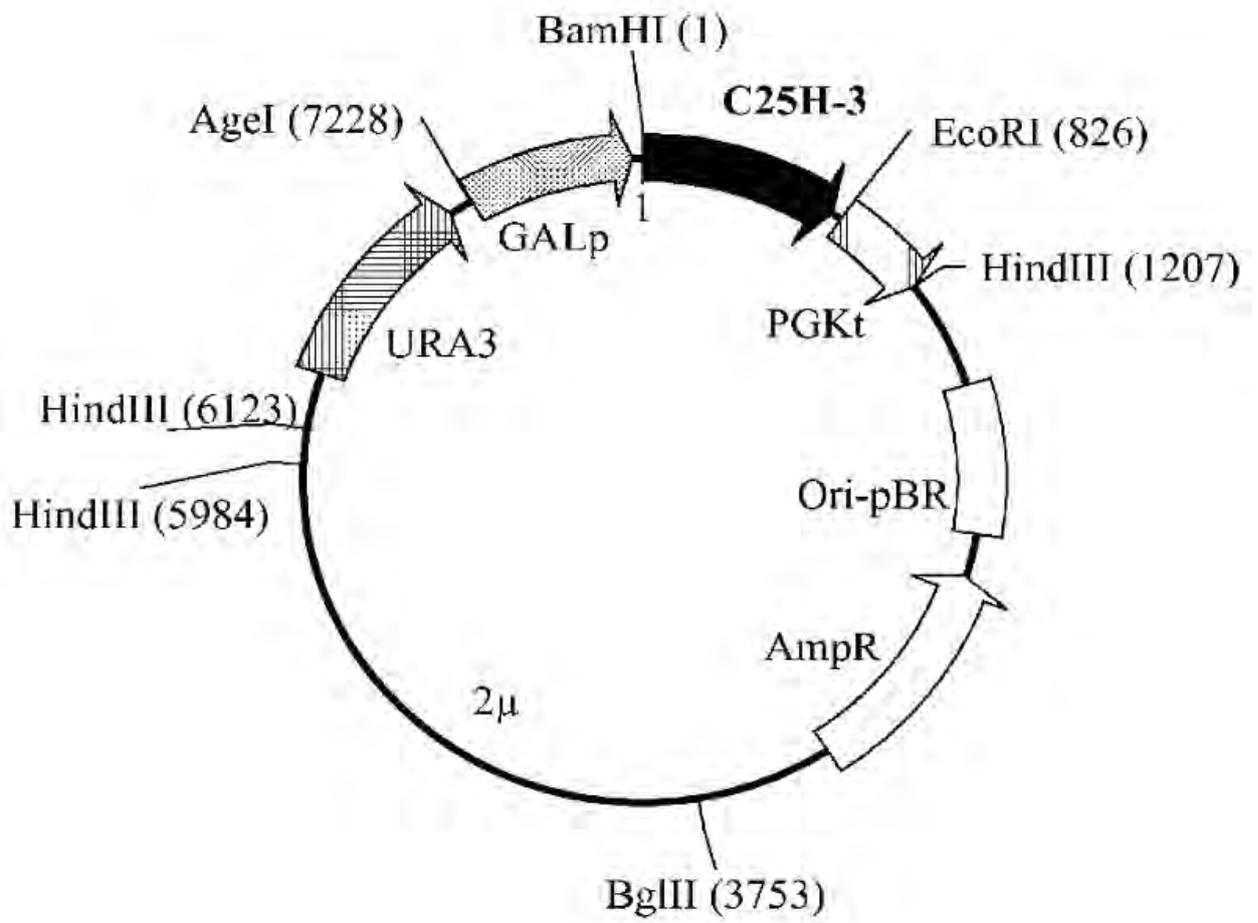


Figura 6

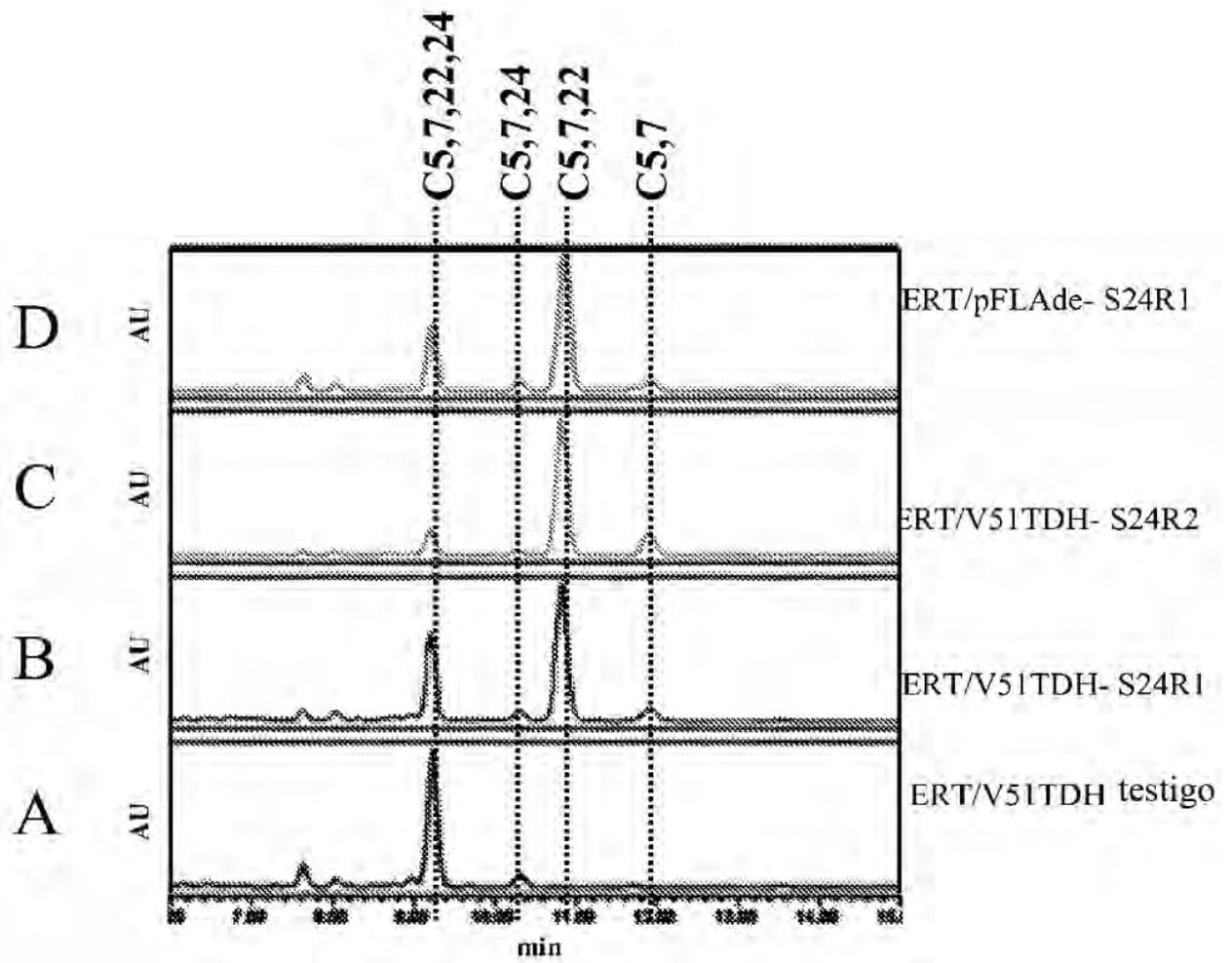


FIGURA 7

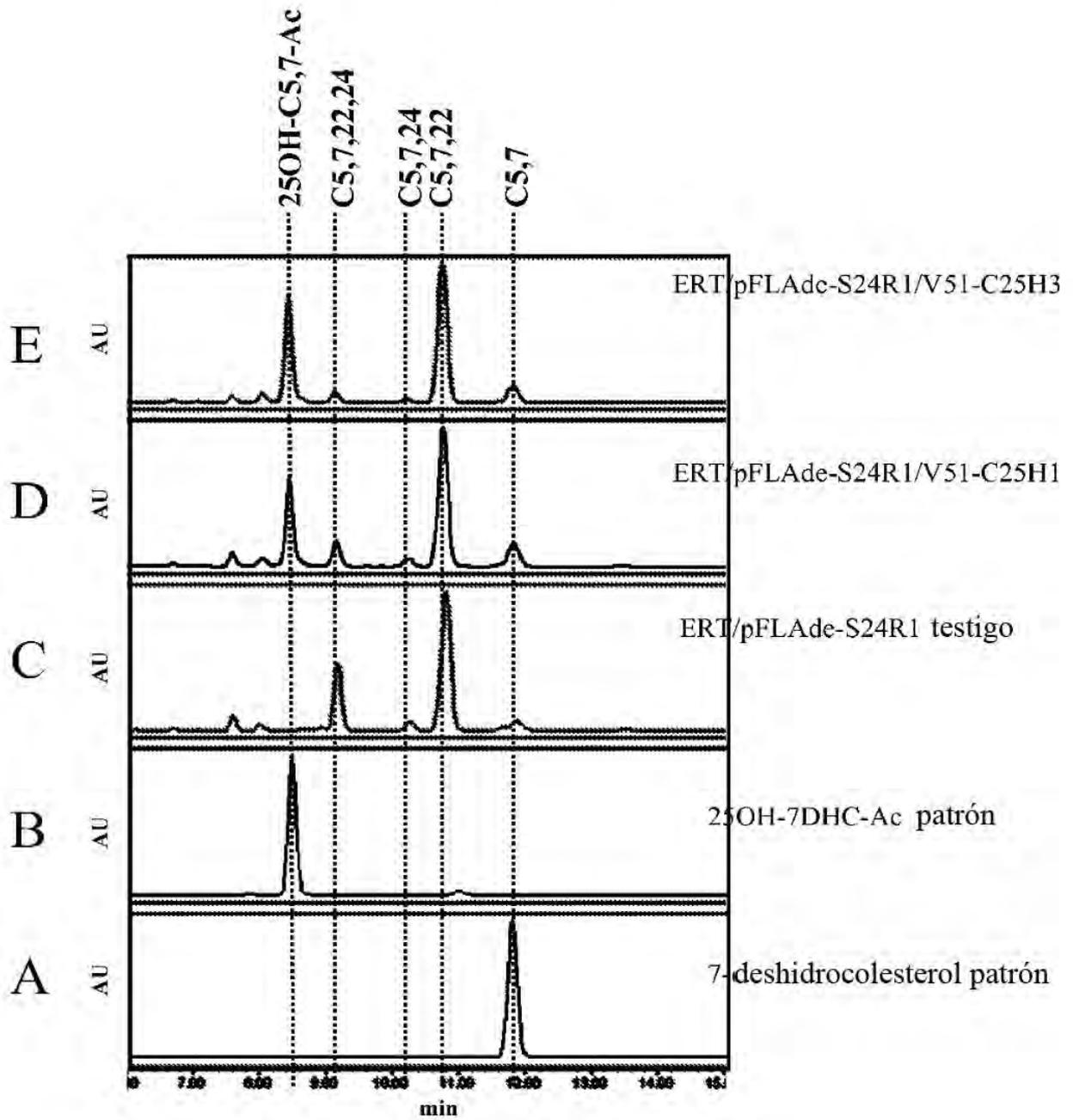
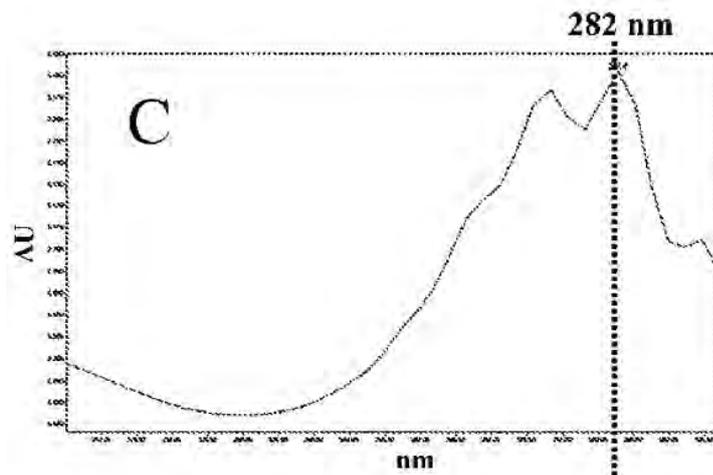
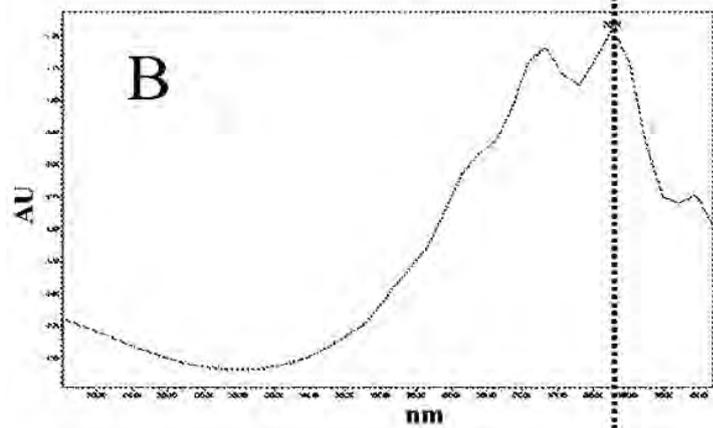


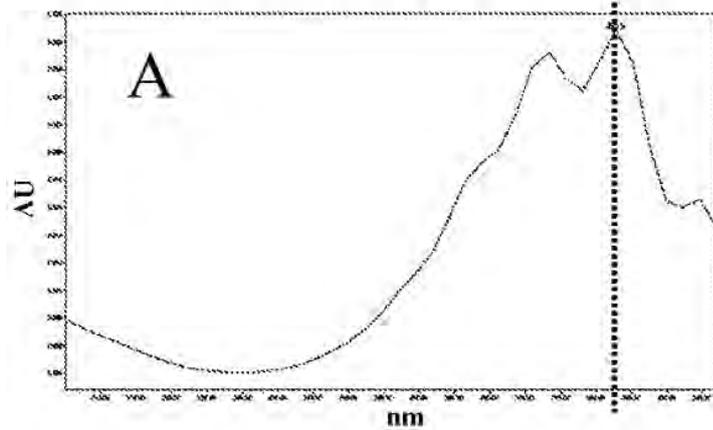
FIGURA 8



ERT/pFLA_{dc}-S24R1/V51-C25H1
(pico 8.5 min)

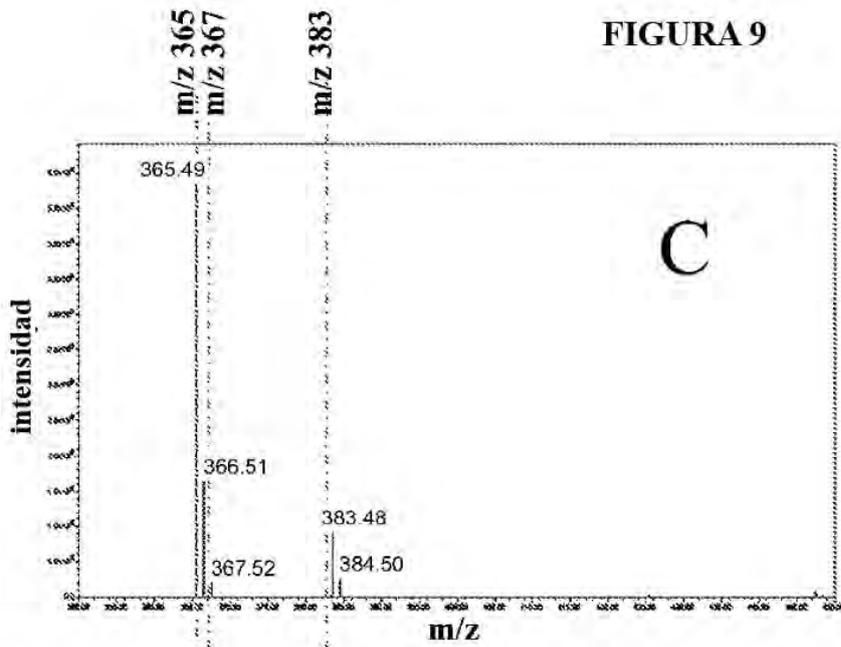


25OH-7DHC-Ac patrón

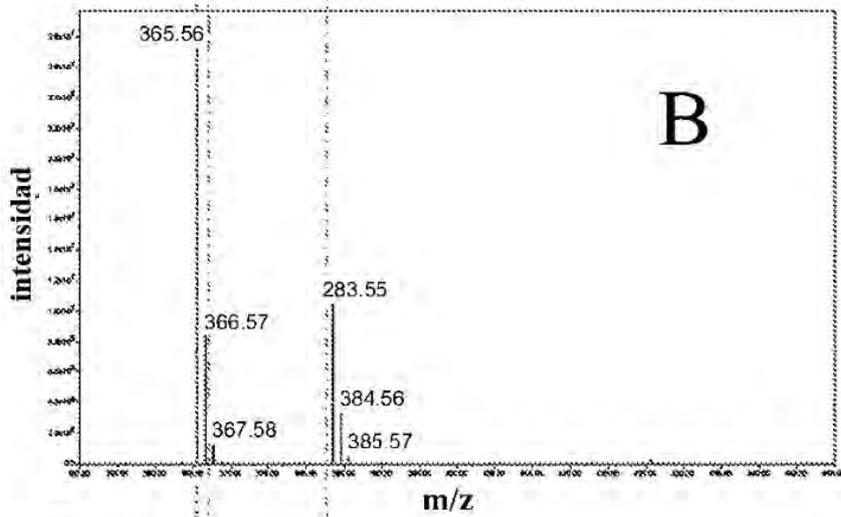


7-deshidrocolesterol patrón

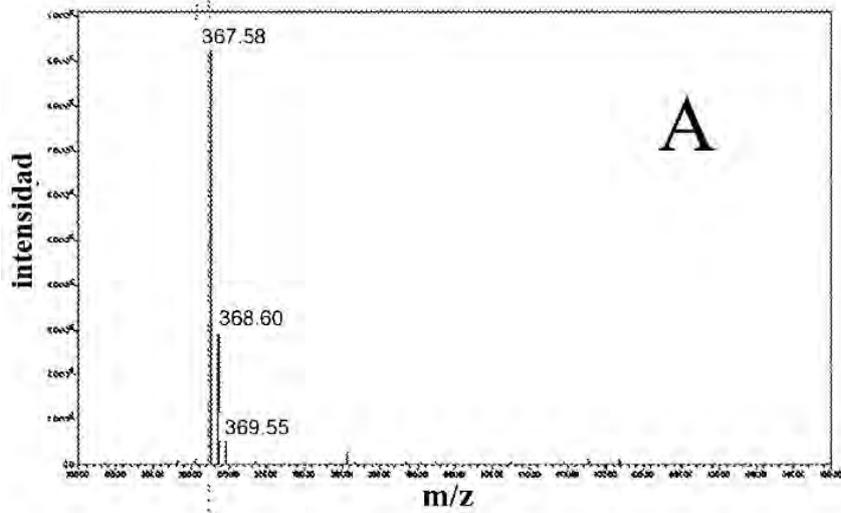
FIGURA 9



ERT/pFLAde-S24R1/
V51-C25H1
(pico 8.5 min)



25OH-7DHC-Ac patrón



7-deshidrocolesterol patrón

FIGURA 10

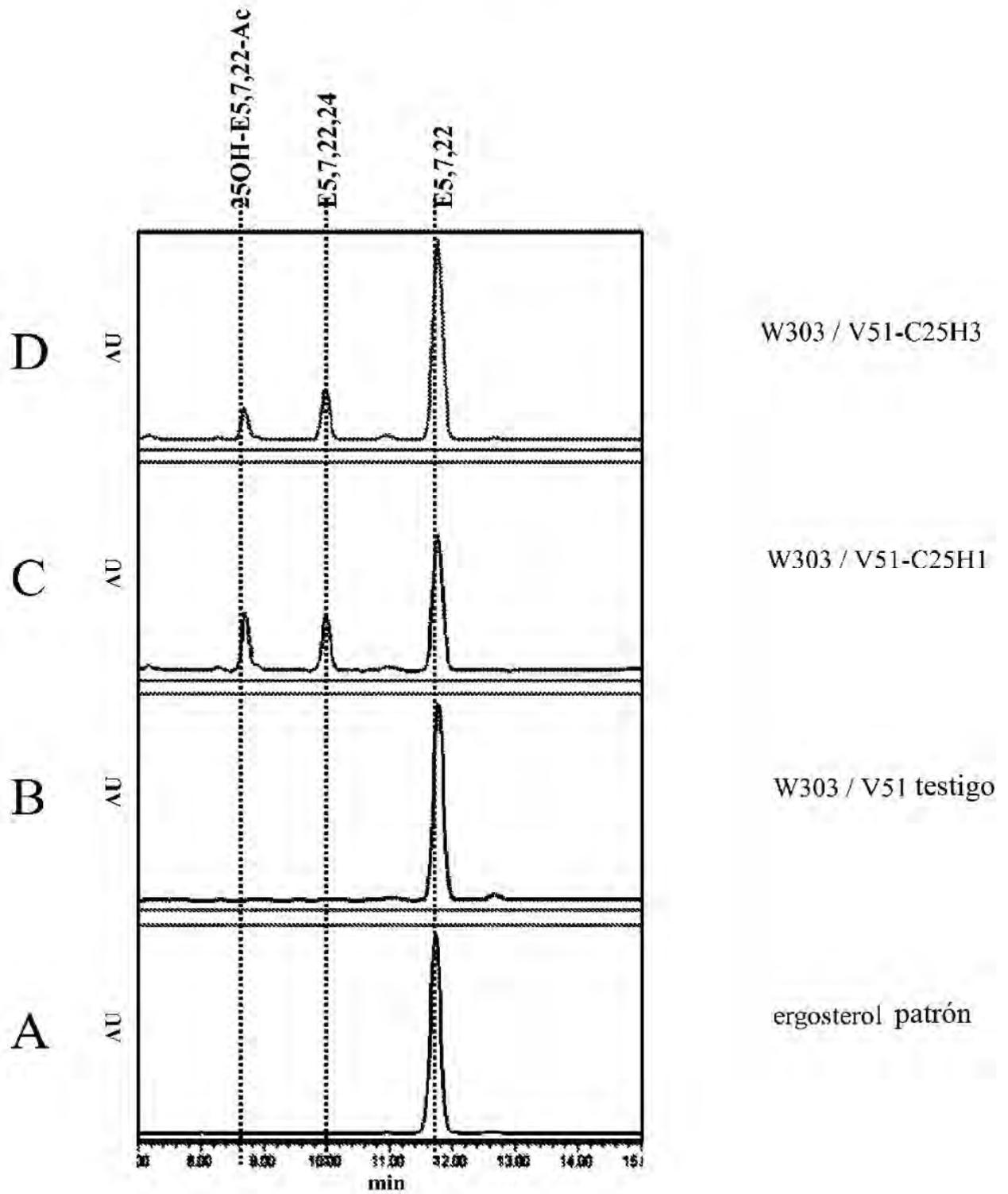


FIGURA 11

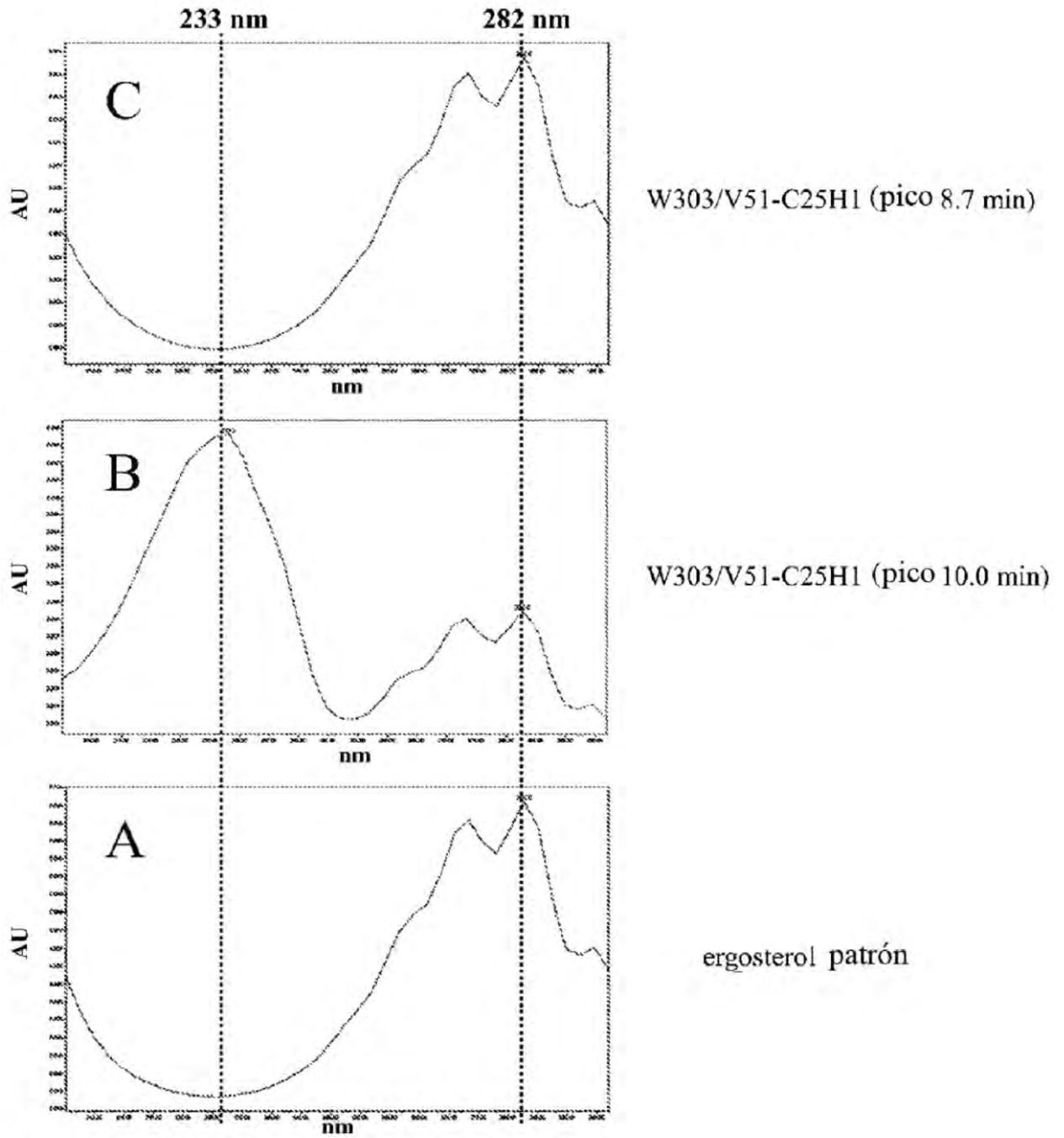
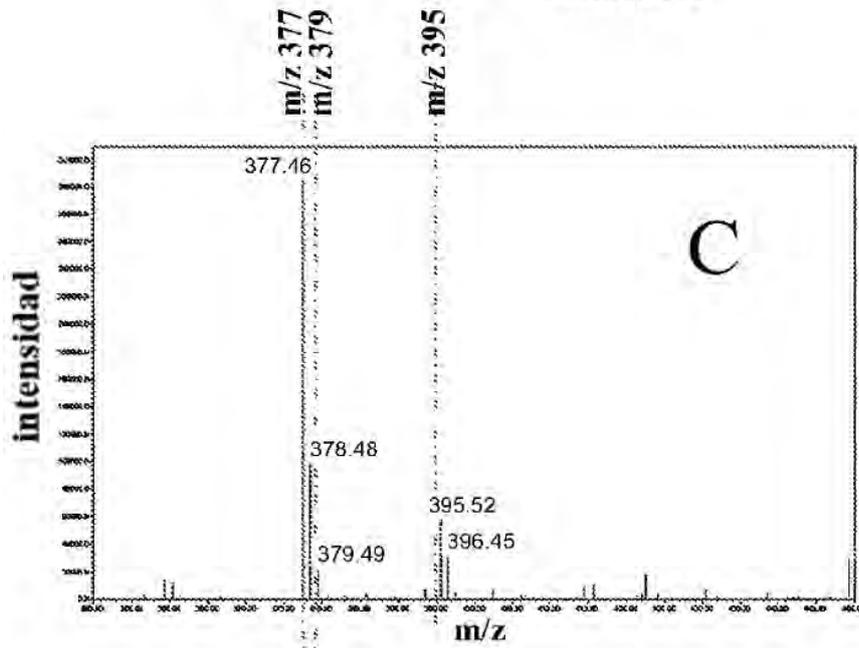
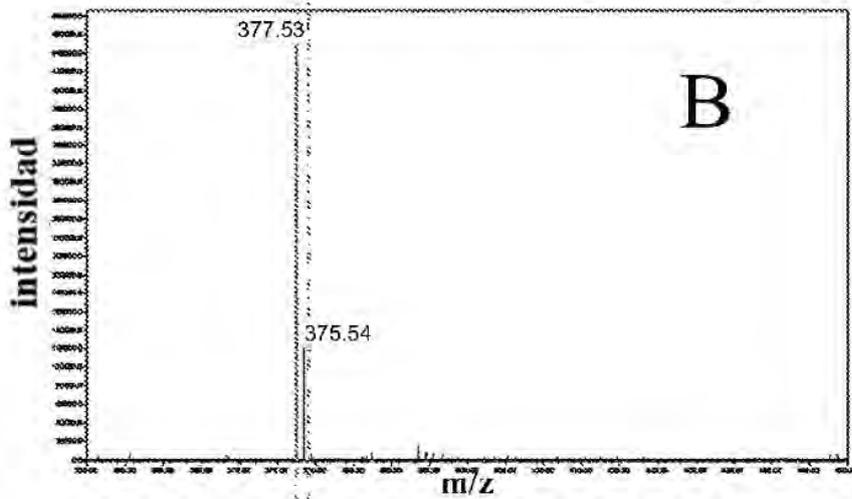


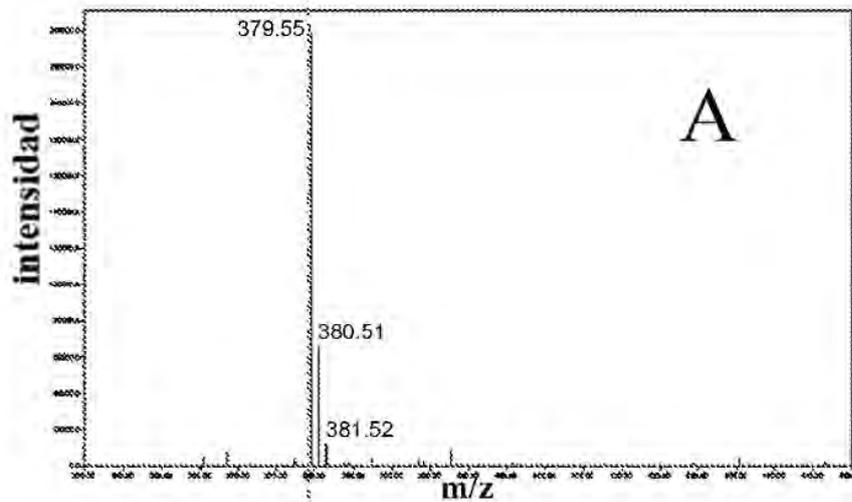
FIGURA 12



W303/V51-C25H1
(pico 8.7 min)



W303/V51-C25H1
(pico 10.0 min)



ergosterol patrón

Figura 13

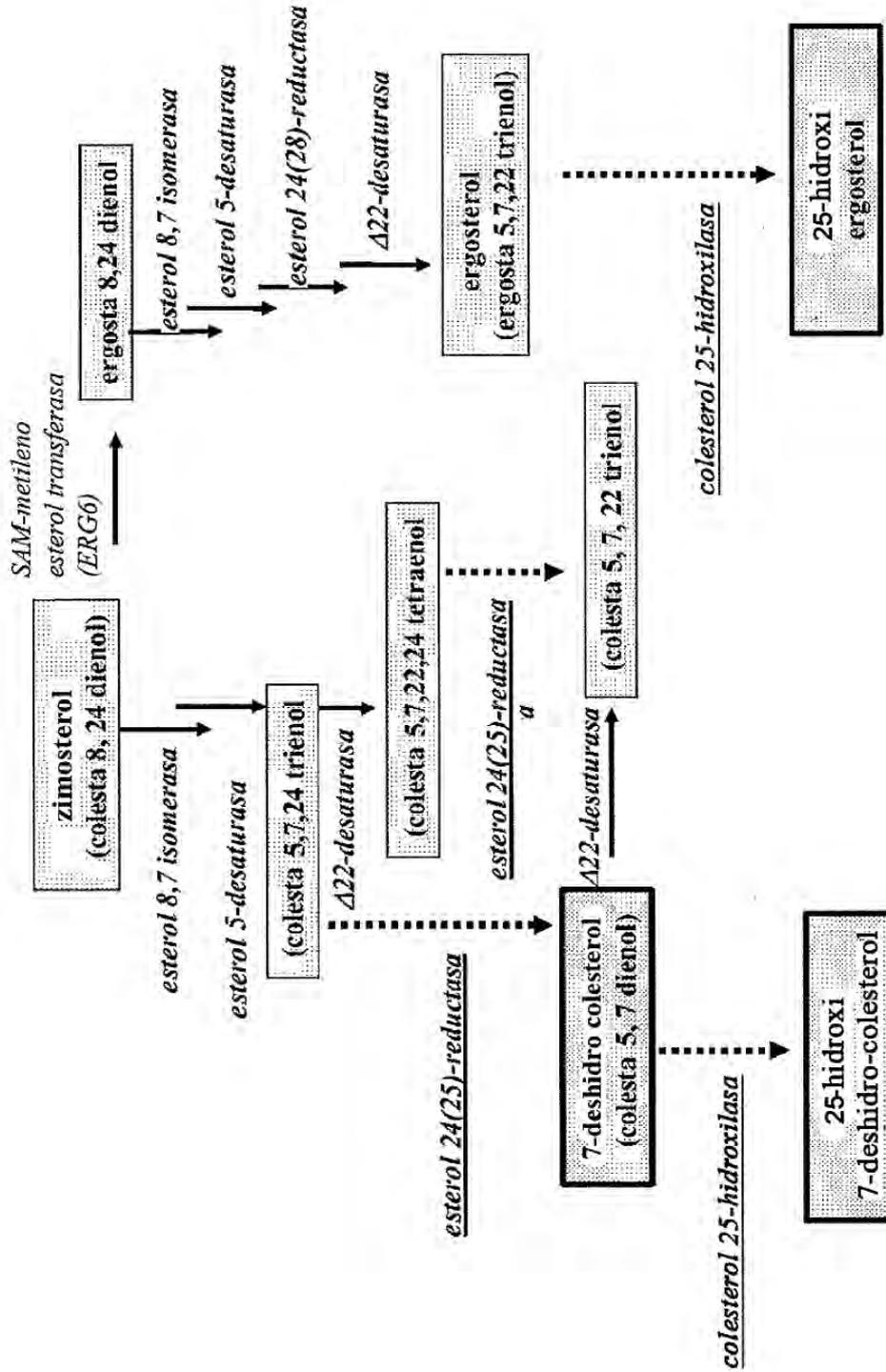


Figura 15

