

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 154**

51 Int. Cl.:

C12R 1/73 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2010 PCT/US2010/057668**
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11063350**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2010 E 10782791 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2504421**

54 Título: **Métodos y composiciones para producir escualeno empleando levaduras**

30 Prioridad:

23.11.2009 US 263775 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2017

73 Titular/es:

**NUCELIS LLC (100.0%)
6465 Nancy Ridge Drive
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**WALKER, KEITH A.;
KNUTH, MARK E.;
FONG, NOEL M. y
BEETHAM, PETER R.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 625 154 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

Métodos y composiciones para producir escualeno empleando levaduras

Campo de la invención

Se describen métodos y composiciones para producir isoprenoides, tales como escualeno, empleando levaduras.

5 Antecedentes de la invención

La siguiente descripción de los antecedentes de la invención se proporciona simplemente como una ayuda para comprender la invención y no se admite para describir o constituir una técnica anterior a la invención.

10 Los isoprenoides, tales como escualeno, son un tipo de lípidos importantes comercialmente. Son excelentes lubricantes, estabilizantes oxidativos, con bajos puntos de fusión y de congelación, altos puntos de ebullición, y fácil biodegradabilidad. El escualeno se produce en la actualidad mediante la extracción a partir del aceite de oliva o del aceite de hígado de tiburón en agua fría a un elevado coste por unidad. Debido al alto coste por unidad, los usos viables económicamente para escualeno y escualano (el derivado completamente hidrogenado del escualeno) están en aplicaciones de mercado reducido, tal como lubricantes de relojes, composiciones farmacéuticas/nutracéuticas, cosméticos, perfumes y como intermediarios químicos para productos de elevado valor. Existen, sin embargo, 15 significativos mercados potenciales para los lubricantes biodegradables, aditivos lubricantes, y fluidos hidráulicos. Es particularmente importante la biodegradabilidad de estos productos para aplicaciones sensibles con el medio ambiente, tales como en aplicaciones en la agricultura, o cuando fluidos hidráulicos o lubricantes importantes puedan aparecer en el medio ambiente. Los mercados potenciales para los lubricantes biodegradables, aditivos lubricantes y fluidos hidráulicos, son muy amplios, se estima que es del orden de cinco millones de toneladas al año.

20 Están disponibles lubricantes biodegradables, aditivos lubricantes, y fluidos hidráulicos derivados de grasas vegetales y animales, pero tienen inconvenientes. Normalmente solidifican a temperaturas relativamente altas (es decir, solidifican en frío) y tienen puntos de ebullición que son demasiado bajos para emplear en condiciones de calor (es decir, se descomponen o combustionan bajo condiciones normales de motor en caliente).

25 Por tanto, se desea un método de producción de escualeno a coste eficaz que permita la fabricación a gran escala y uso generalizado del escualeno y escualano en lubricantes biodegradables, aditivos lubricantes, y fluidos hidráulicos.

30 Chang *et al.*, (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 78, 963-72) divulga el descubrimiento de una levadura de tipo salvaje, *Pseudozyma* sp. JCC207, que produce "una gran cantidad de escualeno y varios ácidos grasos poliinsaturados". Chang *et al.*, describen el aislamiento de *Pseudozyma* sp. JCC207 a partir de agua de mar recogida en Guam, E.E.U.U., y no está seguro si *Pseudozyma* sp. JCC207 es una nueva especie o una variante de *P. regulosa* o *P. aphidis*. En el artículo, "la eficacia de la producción de escualeno [de *Pseudozyma* sp. JCC207] se investigó bajo diferentes condiciones".

35 Dow AgroSciences LLC, *Using Yeast Fermentation to Produce Cost-Effective and Biodegradable Lubricants*, <http://statusreports.atp.nist.gov/reports/95-01-0148PDF.pdf>, divulga que "[t] la compañía propuso el empleo de la ingeniería genética para alterar las características metabólicas de una levadura oleaginosa (oleosa) para incrementar la capacidad de la levadura para producir isoprenos mediante biosíntesis". Específicamente, fueron objetivo cuatro enzimas: ACCasa, hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMGR), escualeno sintetasa, y escualeno epoxidasa.

40 La Patente de E.E.U.U. N° 5.460.949 divulga "[a] un método para incrementar la acumulación de escualeno y esteroides específicos en la levadura". En particular, se divulga que "[s] la acumulación de escualeno y esterol se incrementa mediante el aumento del nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad HMG-CoA reductasa".

45 WO 2008/130372 A9 se refiere a métodos para la producción biológica de determinados compuestos de esterol, y a sistemas para producir levaduras oleaginosas u hongos que son capaces de producir determinados compuestos de esterol.

45 Compendio de la invención

Una materia sujeto de la presente invención es una composición como se define en la reivindicación 1, y un método para producir escualeno como se define en la reivindicación 2. Las reivindicaciones dependientes se refieren a realizaciones particulares de las mismas.

50 Un aspecto según la presente invención se refiere a una composición que comprende una levadura transformada genéticamente. La levadura transformada genéticamente expresa una o más enzimas modificadas que tienen una o más mutaciones diseñadas, en donde la mutación o mutaciones diseñadas están en posiciones determinadas dentro de dicha enzima. La enzima o enzimas modificadas comprenden escualeno epoxidasa, y la escualeno epoxidasa tiene actividad y/o expresión reducida. La levadura produce cantidades aumentadas de escualeno en comparación

con la levadura nativa, y se selecciona una cepa de *Yarrowia lipolytica* del grupo que consiste en ATCC 90812, ATCC MYA-2613, o Yeastern polg.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir escualeno mediante una levadura modificada genéticamente. El método comprende incrementar o disminuir la actividad o expresión de una o más enzimas en la ruta de biosíntesis isoprenoide. La actividad o expresión enzimática se incrementa o disminuye mediante una o más mutaciones diseñadas, en donde la mutación o mutaciones diseñadas están en posiciones determinadas dentro de dicha enzima. La enzima o enzimas modificadas comprenden escualeno epoxidasa, y la escualeno epoxidasa tiene actividad y/o expresión reducida. La levadura produce cantidades aumentadas de escualeno en comparación con la levadura nativa, y es una cepa de *Yarrowia lipolytica* seleccionada del grupo que consiste en ATCC 90812, ATCC MYA-2613, o Yeastern polg.

Según una realización particular, la levadura transformada genéticamente se deriva de una levadura oleaginosa.

Según una realización particular, la enzima o enzimas modificadas comprenden además una enzima modificada seleccionada del grupo que consiste en acetil-CoA carboxilasa ("ACCasa"), HMG-CoA reductasa, escualeno sintasa, ATP citrato liasa, ATP citrato sintasa, mevalonato quinasa, glicerol quinasa y 5-aminolevulinato sintasa.

Según una realización particular, la actividad o expresión se reduce a aproximadamente el 90%; o aproximadamente 80%; o aproximadamente 70%; o aproximadamente 60%; o aproximadamente 50%; o aproximadamente 40%; o aproximadamente 30%; o aproximadamente 20%; o aproximadamente 10%; o aproximadamente 5% de la actividad o expresión de la levadura nativa correspondiente.

Según una realización particular, la actividad o expresión está entre 90-95%; o 80-90%; o 70-80%; o 60-70%; o 50-60%; o 40-50%; o aproximadamente 30-40%; o aproximadamente 20-30%; o aproximadamente 10-20%; o aproximadamente 5-10%; o aproximadamente 2-5% de la actividad de la levadura nativa correspondiente.

Según una realización particular, la levadura es la cepa Yeastern polg de *Yarrowia lipolytica*.

Según una realización particular, está presente en la composición un agente antifúngico o se añade a la levadura en el método. Por ejemplo, un agente antifúngico está presente en la composición o se añade a la levadura en el método a una concentración entre 0,5 a 100 µg/ml, entre 1 a 25 µg/ml, o entre 10 a 15 µg/ml. Según una realización particular, el agente antifúngico puede ser un agente antifúngico de alilamina. Por ejemplo, el agente antifúngico puede ser un agente antifúngico de alilamina presente a una concentración entre 0,5 a 100 µg/ml, tal como entre 1 a 25 µg/ml, o entre 10 a 15 µg/ml. Según una realización particular, el agente antifúngico puede ser terbinafina. Por ejemplo, la terbinafina se puede presentar a una concentración entre 0,5 a 100 µg/ml, tal como entre 1 a 25 µg/ml, o entre 10 a 15 µg/ml.

Según una realización particular, el método comprende cultivar la levadura con un agente antifúngico; en donde la levadura es la cepa Yeastern polg de *Yarrowia lipolytica* y en donde el agente antifúngico es terbinafina. Por ejemplo, la terbinafina se puede presentar a una concentración de aproximadamente 12,5 µg/ml o más.

Como se divulga en la presente memoria, cantidades aumentadas de un isoprenoide (por ejemplo, escualeno) producidas mediante transformación genética o no genética de la levadura, pueden ser el resultado de mutar, modificar y/o alterar la actividad de una o más enzimas dentro de la ruta de biosíntesis isoprenoide. Por ejemplo se pueden modificar, mutar o alterar la actividad de acetil-CoA carboxilasa (o "ACCasa"), HMG-CoA reductasa, escualeno epoxidasa, escualeno sintasa, ATP citrato sintasa, mevalonato quinasa (por ejemplo, *Y. lipolytica* mevalonato quinasa (Genolevures YALI0B16038g)), glicerol quinasa (por ejemplo, *Y. lipolytica* glicerol quinasa (Genolevures YALI0F00484g)) y/o 5-aminolevulinato sintasa (por ejemplo, codificada por el gen *Saccharomyces cerevisiae* HEM1).

Como se divulga en la presente memoria, una levadura transformada genéticamente que expresa una enzima modificada, se puede producir mediante la introducción de una mutación en la enzima a través del empleo de una oligonucleobase de un gen reparador como se describe en la presente memoria. Tales métodos pueden incluir la introducción de una oligonucleobase de un gen reparador que contiene una mutación específica para un gen diana de interés dentro de una célula de levadura, mediante cualquiera de los métodos que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, electroporación, LiOAc, biolística, esferoplástica y/o *Agrobacterium* (véase, por ejemplo, McClelland, C.M., Chang, Y.C., y Kwon-Chung, K.J. (2005) *Fungal Genetics and Biology* 42:904-913) e identificación de una célula que tiene la enzima mutada.

Como se describe en la presente memoria, un método para producir isoprenoides, preferiblemente escualeno, puede incluir proporcionar una levadura transformada genéticamente o no transformada genéticamente como se describe en la presente memoria y extraer escualeno a partir de la levadura. El método puede incluir exponer la levadura (bien transformada genéticamente o transformada no genéticamente) a un agente antifúngico (por ejemplo, un agente antifúngico de alilamina tal como terbinafina) y extraer escualeno a partir de la levadura. El método puede incluir exponer una levadura transformada genéticamente tal como se describe en la presente memoria a un agente antifúngico (por ejemplo, un agente antifúngico de alilamina tal como terbinafina) y extraer escualeno a partir de la levadura. El método puede incluir exponer la levadura transformada no genéticamente, tal como se describe en la

presente memoria a un agente antifúngico (por ejemplo un agente antifúngico de alilamina tal como terbinafina) y extraer escualeno a partir de la levadura.

En los métodos y composiciones descritos en la presente memoria que incluyen un agente antifúngico (por ejemplo, un agente antifúngico de alilamina tal como terbinafina), el agente antifúngico (por ejemplo terbinafina u otro agente antifúngico) se puede añadir o presentar en una concentración a o por encima de aproximadamente 1 µg/ml; o aproximadamente 5 µg/ml; o aproximadamente 10 µg/ml; o aproximadamente 11 µg/ml; o aproximadamente 12 µg/ml; o aproximadamente 12,5 µg/ml; o aproximadamente 13 µg/ml, o aproximadamente 15 µg/ml; o aproximadamente 16 µg/ml; o aproximadamente 20 µg/ml; o aproximadamente 25 µg/ml; o aproximadamente 30 µg/ml; o aproximadamente 40 µg/ml; o aproximadamente 50 µg/ml o más. En los métodos y composiciones descritos en la presente memoria que incluyen un agente antifúngico (por ejemplo, un agente antifúngico de alilamina tal como terbinafina), el agente antifúngico (por ejemplo terbinafina u otro agente antifúngico) se puede añadir o presentar en una concentración entre aproximadamente 0,5 a 100 µg/ml; o 0,5 a 50 µg/ml, o 1 a 50 µg/ml; o 5 a 50 µg/ml; o 8 a 50 µg/ml; o 10 a 50 µg/ml; o 12 a 50 µg/ml, o 15 a 50 µg/ml; o 15 a 50 µg/ml; o 25 a 50 µg/ml; o 1 a 25 µg/ml; o 5 a 25 µg/ml; o 10 a 25 µg/ml; o 10 a 20 µg/ml; o 10 a 15 µg/ml.

Se describe en la presente memoria una levadura transformada genéticamente que produce isoprenoides. En determinados ejemplos, la levadura transformada genéticamente produce escualeno.

Se describe además en la presente memoria una levadura transformada genéticamente, en donde la levadura se transforma genéticamente, tal que produce niveles aumentados de escualeno en comparación con la levadura nativa correspondiente. En determinados ejemplos, la levadura transformada genéticamente expresa una o más enzimas modificadas que tienen una o más mutaciones. En determinados ejemplos, el nivel de expresión de una o más enzimas en la levadura transformada genéticamente, está aumentado o disminuido en relación a la levadura nativa correspondiente. En ejemplos relacionados, la levadura transformada genéticamente expresa una o más enzimas modificadas que tienen una o más mutaciones y el nivel de expresión de una o más enzimas en la levadura transformada genéticamente está aumentada o disminuida en relación a la levadura nativa correspondiente. En determinados ejemplos preferidos, una levadura transformada genéticamente como se describe en la presente memoria, está transformada genéticamente mediante la introducción de una mutación dentro de una enzima empleando una oligobase de un gen reparador. En algunos ejemplos, una levadura transformada genéticamente como se describe en la presente memoria, se transforma genéticamente mediante la introducción de una o más mutaciones en o alrededor del sitio de comienzo de translación de un gen que codifica una enzima para incrementar o disminuir la expresión de la enzima, por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente de E.E.U.U. N^{os} 10/411.969 y 11/625.586. En determinados ejemplos, la enzima modificada en una levadura transformada genéticamente como se describe en la presente memoria, incluye una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en acetil-CoA carboxilasa (o "ACCase"), HMG-Co reductasa, escualeno epoxidasa, escualeno sintasa, ATP citrato liasa, ATP citrato sintasa, mevalonato quinasa (por ejemplo, *Y. lipolytica* mevalonato quinasa (Genolevures YALI0B16038g)), glicerol quinasa (por ejemplo, *Y. lipolytica* glicerol quinasa (Genolevures YALI0F00484g)) y 5-aminolevulinato sintasa.

Una nucleobase comprende una base, que es una purina, pirimidina, o un derivado o análogo de las mismas. Los nucleósidos son nucleobases que contienen un resto pentosefuranosil, por ejemplo, una ribosa o 2'-desoxirribosa, sustituido opcionalmente. Los nucleósidos se pueden unir mediante uno de los varios restos de unión, que pueden o no contener fósforo. Los nucleósidos que se unen mediante enlaces fosfodiéster sin sustituir se denominan nucleótidos. "Nucleobases" como se emplean en la presente memoria, incluyen nucleobases peptídicas, las subunidades de ácidos nucleicos peptídicos, y nucleobases de morfolina, así como nucleósidos y nucleótidos.

Una oligonucleobase es un polímero de nucleobases, cuyo polímero puede hibridar mediante el emparejamiento de bases Watson-Crick para un ADN que tiene la secuencia complementaria. Una cadena oligonucleobase tiene un extremo 5' y 3' único, que son las últimas nucleobases del polímero. Una cadena de oligonucleobase particular, puede contener nucleobases de todos los tipos. Un compuesto oligonucleobase es un compuesto que comprende una o más cadenas de oligonucleobases que son complementarias e hibridan mediante el emparejamiento de bases Watson-Crick. Las nucleobases son bien de tipo desoxirribosa o bien de tipo ribosa. Las nucleobases de tipo ribosa son pentosefuranosilo que contienen nucleobases en donde el carbono 2' es un metileno sustituido con un hidroxilo, alquilo o halógeno. Las nucleobases de tipo desoxirribosa son nucleobases diferentes a las nucleobases de tipo ribosa e incluyen todas las nucleobases que no contienen un resto de pentosefuranosilo.

Una hebra oligonucleobase incluye genéricamente tanto cadenas oligonucleobase como segmentos o regiones de cadenas de oligonucleobases. Una hebra oligonucleobase tiene un extremo 3' y un extremo 5'. Cuando una hebra oligonucleobase es coextensiva con una cadena, los extremos 3' y 5' de la hebra son también los extremos 3' y 5' de la cadena.

El término "oligonucleobase de un gen reparador" se emplea en la presente memoria para indicar oligonucleobases, que incluyen oligonucleótidos dobles mixtos, moléculas que no contienen nucleótido, oligodesoxinucleótidos monocatenarios y otras moléculas reparadoras genéticas como se describe en detalle a continuación.

En algunos ejemplos, una levadura transformada genéticamente o una levadura transformada no genéticamente como se describe en la presente memoria, se deriva de una levadura oleaginosa. En determinados ejemplos preferidos, una levadura transformada genéticamente o una levadura no transformada genéticamente, como se describe en la presente memoria, se deriva de una levadura que se selecciona del grupo que consiste en *Cryptococcus curvatus*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, y *Rhodosporidium toruloides*. En algunos ejemplos preferidos, la levadura transformada genéticamente o la levadura no transformada genéticamente se deriva de una levadura que se selecciona del grupo que consiste en *Cryptococcus curvatus*, *Yarrowia lipolytica* y *Rhodotorula glutinis*. En ejemplos relacionados, la levadura transformada genéticamente o la levadura transformada no genéticamente se deriva de una levadura que se selecciona del grupo que consiste en *Cryptococcus curvatus* y, *Rhodotorula glutinis*. En determinados ejemplos preferidos, la levadura transformada genéticamente o la levadura transformada no genéticamente no deriva de *Yarrowia lipolytica*. La levadura transformada genéticamente que se emplea en los métodos y composiciones según la presente invención es una cepa de *Yarrowia lipolytica* que se selecciona del grupo que consiste en ATCC 90812, ATCC MYA-2613, y Yeastern polg.

En determinados ejemplos preferidos, una enzima que se modifica en una levadura transformada genéticamente, como se describe en la presente memoria, es acetil-CoA carboxilasa (o "ACCasa"). En algunos ejemplos preferidos, la acetil-CoA carboxilasa en una levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que su actividad y/o expresión disminuye en relación a la levadura nativa correspondiente; o tal que se elimina la actividad y/o expresión. En otros ejemplos, la acetil-CoA carboxilasa se puede modificar para que se altere la selectividad de su sustrato. En algunos ejemplos preferidos, la levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que la actividad y/o expresión de la acetil-CoA carboxilasa se reduce en relación a la levadura nativa correspondiente pero la actividad no se elimina. En algunos ejemplos preferidos, la levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que la actividad y/o expresión de la acetil-CoA carboxilasa en la levadura transformada genéticamente se reduce a aproximadamente el 90%; o aproximadamente 80%; o aproximadamente 70%; o aproximadamente 60%; o aproximadamente 50%; o aproximadamente 40%; o aproximadamente 30%; o aproximadamente 20%; o aproximadamente 10%; o aproximadamente 5% de la actividad y/o expresión de la levadura nativa correspondiente. En ejemplos relacionados, la levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que la actividad y/o expresión de la acetil-CoA carboxilasa en la levadura transformada genéticamente está entre aproximadamente el 90-95%; o aproximadamente 80-90%; o aproximadamente 70-80%; o aproximadamente 60-70%; o aproximadamente 50-60%; o aproximadamente 40-50%; o aproximadamente 30-40%; o aproximadamente 20-30%; o aproximadamente 10-20%; o aproximadamente 5-10%; o aproximadamente 2-5% de la actividad y/o expresión de la levadura nativa correspondiente.

En determinados ejemplos preferidos, una enzima que se modifica en una levadura transformada genéticamente como se describe en la presente memoria, es HMG-CoA reductasa. En algunos ejemplos preferidos, la HMG-CoA reductasa en una levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que su actividad y/o expresión se incrementa en relación a la levadura nativa correspondiente. En otros ejemplos, la HMG-CoA reductasa se puede modificar para que se altere la selectividad del sustrato. En determinados ejemplos preferidos, la levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que la actividad y/o expresión de la HMG-CoA reductasa en la levadura transformada genéticamente se aumenta hasta al menos 1,2 veces; o 1,5 veces; o 2 veces, o 3 veces; o 4 veces; o 5 veces; o 10 veces; o 15 veces; o 20 veces; o 50 veces; o 100 veces; o 1.000 veces; o 10.000 veces; o 100.000 veces; o 1.000.000 de veces más que la actividad y/o expresión de la levadura nativa correspondiente.

Una enzima que se modifica en la levadura transformada genéticamente que se emplea en los métodos y composiciones según la presente invención, es escualeno epoxidasa. En algunos ejemplos preferidos, el escualeno epoxidasa en una levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que su actividad y/o expresión se disminuye en relación a la levadura nativa correspondiente; o de tal manera que se elimina la actividad y/o expresión. En otros ejemplos, la escualeno epoxidasa se puede modificar de tal manera que se altere la selectividad de su sustrato. En algunos ejemplos preferidos, la levadura modificada genéticamente se modifica de tal manera que la actividad y/o expresión de la escualeno epoxidasa se reduce en relación con la levadura nativa correspondiente, pero la actividad no se elimina. En determinados ejemplos, la escualeno epoxidasa se modifica para incluir una o más mutaciones u homólogos de una o más mutaciones asociadas con una sensibilidad incrementada a terbinafina. En determinados ejemplos, la levadura no es *Saccharomyces cerevisiae* y la escualeno epoxidasa se modifica para incluir los homólogos de una o más de las siguientes mutaciones asociadas con una sensibilidad incrementada a terbinafina en el gen ERG1 de *Saccharomyces cerevisiae*: G30S, L37P, y R269G (véase, por ejemplo, Turnowsky, 2005, 2007 y 2008). En determinados ejemplos la levadura es *Y. lipolytica* y la escualeno epoxidasa se modifica para incluir los homólogos de una o más de las siguientes mutaciones asociadas con una sensibilidad incrementada a terbinafina en el gen ERG1 de *Saccharomyces cerevisiae*: G30S, L37P, y R269G (véase, por ejemplo, Turnowsky, 2005, 2007 y 2008). En algunos ejemplos, el gen de escualeno epoxidasa de la levadura se modifica como se describe en la presente memoria mediante la síntesis y reemplazamiento del gen de tipo salvaje o mediante la introducción de mutaciones mediante RTDS. En algunos ejemplos preferidos, la levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que la actividad y/o expresión de la escualeno epoxidasa en la levadura transformada genéticamente se reduce a aproximadamente el 90%; o aproximadamente 80%; o aproximadamente 70%; o aproximadamente 60%; o aproximadamente 50%; o aproximadamente 40%; o aproximadamente 30%; o aproximadamente 20%; o aproximadamente 10%; o aproximadamente 5% de la actividad y/o expresión de la levadura nativa correspondiente. En determinados ejemplos, la levadura modificada genéticamente se modifica de

tal manera que la actividad y/o expresión de la escualeno epoxidasa en la levadura modificada genéticamente está entre aproximadamente 90-95%; o aproximadamente 80-90%; o aproximadamente 70-80%; o aproximadamente 60-70%; o aproximadamente 50-60%; o aproximadamente 40-50%; o aproximadamente 30-40%; o aproximadamente 20-30%; o aproximadamente 10-20%; o aproximadamente 5-10%; o aproximadamente 2-5% de la actividad y/o expresión de la levadura nativa correspondiente.

En determinados ejemplos preferidos, la enzima que se modifica en una levadura transformada genéticamente como se describe en la presente memoria, es escualeno sintasa. En algunos ejemplos preferidos, la escualeno sintasa en una levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que su actividad y/o expresión se incrementa en relación a la levadura nativa correspondiente. En otros ejemplos, la escualeno sintasa se puede modificar para que se altere la selectividad del sustrato. En determinados ejemplos preferidos, la levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que la actividad y/o expresión de la escualeno sintasa en la levadura transformada genéticamente se incrementa al menos 1,2 veces; o 1,5 veces; o 2 veces; o 3 veces; o 4 veces; o 5 veces; o 10 veces; o 15 veces; o 20 veces; o 50 veces; o 100 veces; o 1.000 veces; o 10.000 veces; o 100.000 veces; o 1.000.000 de veces más que la actividad y/o expresión de la levadura nativa correspondiente.

En determinados ejemplos, la enzima que se modifica en una levadura transformada genéticamente como se describe en la presente memoria, es ATP citrato liasa. En algunos ejemplos, se modifican como se describe en la presente memoria o bien sólo una subunidad o bien ambas subunidades de los genes de ATP citrato liasa (por ejemplo, citrato liasa de *Yarrowia lipolytica*; Genolevures YALI0D24431g y YALI0E34793g). En determinados ejemplos, la actividad de la ATP citrato liasa en una levadura modificada se incrementa mediante la inserción y/o expresión heteróloga de un gen ATP liasa animal que comprende sólo una subunidad de holoenzima. En algunos ejemplos preferidos, la ATP citrato liasa en una levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que su actividad y/o expresión se incrementa en relación a la levadura nativa correspondiente. En determinados ejemplos preferidos, la levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que la actividad y/o expresión de la ATP citrato liasa en la levadura transformada genéticamente se incrementa al menos 1,2 veces; o 1,5 veces; o 2 veces; o 3 veces; o 4 veces; o 5 veces; o 10 veces; o 20 veces; o 50 veces; o 100 veces; o 1.000 veces; o 10.000 veces; o 100.000 veces; o 1.000.000 de veces más que la actividad y/o expresión de la levadura nativa correspondiente.

En determinados ejemplos de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, la enzima que se modifica en una levadura transformada genéticamente o una levadura transformada no genéticamente es la ATP citrato sintasa. Preferiblemente, su actividad y/o expresión se incrementa en relación a la levadura nativa correspondiente.

En determinados ejemplos, la enzima que se modifica en una levadura transformada genéticamente como se describe en la presente memoria, es mevalonato quinasa (por ejemplo, mevalonato quinasa de *Y. lipolytica* (Genolevures YALI0B16038g)). En algunos ejemplos preferidos, la mevalonato quinasa (por ejemplo, mevalonato quinasa de *Y. lipolytica* (Genolevures YALI0B16038g)) en una levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que su actividad y/o expresión se incrementa en relación a la levadura nativa correspondiente. En determinados ejemplos preferidos, la levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que la actividad y/o expresión de mevalonato quinasa (por ejemplo, mevalonato quinasa de *Y. lipolytica* (Genolevures YALI0B16038g)) en la levadura transformada genéticamente se incrementa al menos 1,2 veces; o 1,5 veces; o 2 veces; o 3 veces; o 4 veces; o 5 veces; o 10 veces; o 15 veces; o 20 veces; o 50 veces; o 100 veces; o 1.000 veces; o 10.000 veces; o 100.000 veces; o 1.000.000 de veces más que la actividad y/o expresión de la levadura nativa correspondiente.

En determinados ejemplos, la enzima que se modifica en una levadura transformada genéticamente como se describe en la presente memoria, es glicerol quinasa (por ejemplo, glicerol quinasa de *Y. lipolytica* (Genolevures YALI0F00484g)). En algunos ejemplos preferidos, la glicerol quinasa (por ejemplo, glicerol quinasa de *Y. lipolytica* (Genolevures YALI0F00484g)) en una levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que su actividad y/o expresión se incrementa en relación a la levadura nativa correspondiente. En determinados ejemplos preferidos, la levadura transformada genéticamente se modifica de tal manera que la actividad y/o expresión de la glicerol quinasa (por ejemplo, glicerol quinasa de *Y. lipolytica* (Genolevures YALI0F00484g)) en la levadura transformada genéticamente se incrementa al menos 1,2 veces; o 1,5 veces; o 2 veces; o 3 veces; o 4 veces; o 5 veces; o 10 veces; o 15 veces; o 20 veces; o 50 veces; o 100 veces; o 1.000 veces; o 10.000 veces; o 100.000 veces; o 1.000.000 de veces más que la actividad y/o expresión de la levadura nativa correspondiente.

En determinados ejemplos de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, la enzima que se modifica en una levadura transformada genéticamente o una levadura transformada no genéticamente es 5-aminolevulinato sintasa (por ejemplo, codificada por el gen HEM1 de *Saccharomyces cerevisiae*). Preferiblemente, su actividad y/o expresión se aumenta en relación a la levadura nativa correspondiente.

En determinados ejemplos preferidos descritos en la presente memoria, la levadura transformada es una levadura transformada genéticamente; en otros ejemplos preferidos, la levadura transformada genéticamente es una levadura transgénica. Otros ejemplos son una levadura que incluyen tanto alteraciones transgénicas como genéticas.

En determinados ejemplos, se describen composiciones que incluyen una levadura (por ejemplo una levadura transformada genéticamente tal como se describen en la presente memoria, o una levadura transformada no genéticamente) en donde al menos el 10% del contenido de lípido total es escualeno; o al menos 20% del contenido de lípido total es escualeno; o al menos 25% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 28% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 30% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 32% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 35% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 37% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 38% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 40% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 42% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 45% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 47% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 50% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 52% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 55% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 57% del contenido total de lípido es escualeno; o al menos 60% o más del contenido total de lípido es escualeno.

La frase "levadura transformada genéticamente" o "levadura alterada genéticamente" como se emplea en la presente memoria, se refiere a una levadura que tiene una o más modificaciones genéticas, tal como transgenes y/o enzimas modificadas que contienen una o más mutaciones diseñadas. Tales mutaciones diseñadas pueden resultar en una enzima modificada que tiene una actividad que es diferente de la enzima nativa. Tales diferencias pueden incluir diferencias en un sustrato específico o nivel de actividad. Como se emplea en la presente memoria, una "levadura transgénica" es un tipo de "levadura transformada genéticamente".

El término "levadura nativa" como se emplea en la presente memoria, se refiere a una levadura que no se transforma genéticamente (es decir, transgénica o alterada genéticamente). Las levaduras nativas incluyen levaduras de tipo salvaje, así como levaduras que se han seleccionadas selectivamente para lograr características particulares.

La frase "levadura transgénica" se refiere a una levadura que tiene un gen de otras especies de levadura o especies de no levaduras. Tal gen se puede referir como un "transgen".

Como se emplea en la presente memoria, el término "gen diana" se refiere al gen que codifica la enzima a modificar.

La frase "levadura oleaginosa" se refiere a una levadura que contiene al menos aproximadamente el 20% del peso seco celular (de sus siglas en inglés, cdw) del lípido extraíble del organismo. La capacidad para acumular niveles de lípido hasta al menos el 20% cdw, no se limita a un gen en particular; se ha notificado más de aproximadamente el 20% cdw lipídico en *Lipomyces lipofer*, *L. starkeyi*, *L. tetrasporus*, *Candida lipolytica*, *C. diddensiae*, *C. paralipolytica*, *C. curvata*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula graminus*, *Trichosporon pullulans*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis*, y *Yarrowia lipolytica*. Véase, por ejemplo, Tatsumi et al. Patente de E.E.U.U. N° 4.032.405, y Rattray, *Microbial Lipids*, Vol. 1 (1998).

El término "aproximadamente" como se emplea en la presente memoria, significa en términos cuantitativos más o menos del 10%. Por ejemplo, "aproximadamente 3%" abarcaría del 2,7-3,3% y "aproximadamente 10%" abarcaría del 9-11%.

A menos que se indique de otra manera, cualquiera de los porcentajes que se indican en la presente memoria, son porcentaje en peso.

Se manifestarán otras características y ventajas de la invención a partir de la descripción de las siguientes realizaciones preferidas y, a partir de las reivindicaciones.

40 Descripción detallada de la invención

Tipos de levadura

Las composiciones y métodos como se describen en la presente memoria, se pueden basar en cualquiera de las diversas especies o cepas de levadura. En determinados ejemplos, la levadura es una levadura oleaginosa. Por ejemplo, la levadura puede ser *Cryptococcus curvatus* (por ejemplo ATCC 20508), *Yarrowia lipolytica* (por ejemplo ATCC 20688 o ATCC 90811), *Rhodotorula glutinis* (por ejemplo ATCC 10788 o ATCC 204091), y *Rhodospiridium toruloides*. Los inventores han descubierto que, respecto a otras levaduras determinadas (tales como *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus curvatus* y *Rhodotorula glutinis*), crecen hasta densidades celulares elevadas en una amplia variedad de sustratos, y producen grandes cantidades de lípido total bajo muchas condiciones de cultivo.

Por consiguiente, en determinados ejemplos, *Cryptococcus curvatus* y *Rhodotorula glutinis* pueden ser ventajosos particularmente para las composiciones y métodos como se describen en la presente memoria. Existen muchas herramientas genéticas (por ejemplo, protocolos de transformación, marcadores seleccionables) que están muy desarrolladas y, en específico para *Yarrowia lipolytica*; así como en algunas realizaciones, *Yarrowia lipolytica* puede ser particularmente ventajosa para las composiciones y métodos como se describen en la presente memoria. En las composiciones y métodos según la presente invención, la levadura transformada genéticamente es una cepa de *Yarrowia lipolytica* que se selecciona del grupo que consiste en ATCC 90812, ATCC MYA-2613, o Yeastern polg.

Oligonucleobases del gen reparador

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden practicar con "oligonucleobases de un gen reparador" que tienen las conformaciones y composiciones químicas como se describen en detalle a continuación. Las "oligonucleobases del gen reparador" incluyen oligonucleótidos dobles mixtos, moléculas que no contienen nucleótidos, oligodesoxinucleótidos monocatenarios y otras moléculas del gen reparador descritas en las patentes y publicaciones de patentes señaladas abajo. Las "oligonucleobases del gen reparador" también se han descrito en publicaciones científicas y bibliografía de patentes empleando otros nombres que incluyen "oligonucleobases recombinagénicas"; "oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN", "oligonucleótidos quiméricos", "oligonucleótidos dobles mixtos (MDONs)", "oligonucleótidos de ARN y ADN (RDOs)", "oligonucleótidos del gen diana", "genoplastos", "oligonucleótidos modificados monocatenarios", "vectores mutacionales de oligodesoxinucleótidos monocatenarios", "vectores mutacionales dobles", y "vectores mutacionales heterodobles".

Las oligonucleobases que tienen las conformaciones y composiciones químicas descritas en la Patente de E.E.U.U. N° 5.565.350 por Kmiec (Kmiec I) y la Patente de E.E.U.U. N° 5.731.181 por Kmiec (Kmiec II), son adecuadas para emplearse como "oligonucleobases del gen reparador".

Las oligonucleobases del gen reparador en Kmiec I y/o Kmiec II contienen dos hebras complementarias, una de las cuales contiene al menos un segmento de nucleótidos de tipo ARN (un "segmento de ARN") que son bases apareadas a los nucleótidos de tipo ADN de la otra hebra.

Kmiec II divulga que las bases purina y pirimidina que no contienen nucleótidos se pueden sustituir por nucleótidos. Moléculas adicionales del gen reparador que se pueden emplear, se describen en las Patentes de E.E.U.U. N°s 5.756.325; 5.871.984; 5.760.012; 5.888.983; 5.795.972; 5.780.296; 5.945.339; 6.004.804 y 6.010.907 y la Patente Internacional n° PCT/US00/23457; y en la Publicación de Patente Internacional N°s WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702 y WO 99/40789.

En un ejemplo, la oligonucleobase del gen reparador es un oligonucleótido doble mixto en el que los nucleótidos de tipo ARN del oligonucleótido doble mixto son ARNasas resistentes mediante el reemplazamiento funcional del 2'-hidroxilo por un flúor, cloro o bromo o mediante la colocación de un sustituyente en el 2'-O. Sustituyentes adecuados incluyen los sustituyentes enseñados por Kmiec II. Sustituyentes alternativos incluyen los sustituyentes enseñados por la Patente de E.E.U.U. N° 5.334.711 (Sproat) y el sustituyente enseñado por las solicitudes de patente EP 629 387 y EP 679 657 (colectivamente, Las Solicitudes Martin).

Como se emplea en la presente memoria, un 2'-flúor, cloro o boro derivado de un ribonucleótido o un ribonucleótido que tiene un 2'-OH sustituido por un sustituyente descrito en las Solicitudes Martin o Sproat, se denomina un "2'-Ribonucleótido Sustituido". Como se emplea en la presente memoria, el término "nucleótido tipo ARN" significa un 2'-hidroxilo o un Nucleótido 2'-Sustituido que se une a otros nucleótidos de un oligonucleótido doble mixto mediante un enlace fosfodiéster sin sustituir o cualquiera de los enlaces no naturales enseñados por Kmiec I o Kmiec II. Como se emplea en la presente memoria, el término "nucleótido tipo desoxirribo" significa un nucleótido que tiene un 2'-H, que se puede unir a otros nucleótidos de una oligonucleobase del gen reparador mediante un enlace fosfodiéster sin sustituir o cualquiera de los enlaces no naturales enseñados por Kmiec I o Kmiec II.

En un ejemplo particular descrito en la presente memoria, la oligonucleobase del gen reparador es un oligonucleótido doble mixto que se une únicamente mediante enlaces fosfodiéster sin sustituir. En ejemplos alternativos, el enlace es mediante enlaces fosfodiéster sustituidos, derivados fosfodiéster y enlaces que no se basan en fósforo, como se enseña por Kmiec II. En otro ejemplo, cada nucleótido tipo ARN en el oligonucleótido doble mixto es un Nucleótido 2'-Sustituido. Ejemplos preferidos particulares de Ribonucleótidos 2'-Sustituidos son ribonucleótidos 2'-flúor, 2'-metoxi, 2'-propiloxi, 2'-aliloxi, 2'-hidroxietiloxi, 2'-metoxietiloxi, 2'-fluoropropiloxi y 2'-trifluoropropiloxi sustituidos. Ejemplos más preferidos de Ribonucleótidos 2'-Sustituidos son nucleótidos 2'-flúor, 2'-metoxi, 2'-metoxietiloxi, y 2'-aliloxi sustituidos. En otro ejemplo, el oligonucleótido doble mixto se une mediante enlaces fosfodiéster sin sustituir.

Aunque los oligonucleótidos dobles mixtos que tienen sólo un tipo de nucleótido 2'-sustituido de tipo ARN se sintetizan más fácilmente, los métodos descritos en la presente memoria se pueden practicar con oligonucleótidos dobles mixtos que tienen dos o más tipos de nucleótidos tipo ARN. La función de un segmento de ARN puede no afectarse por una interrupción causada mediante la introducción de un desoxinucleótido entre dos trinucleótidos tipo ARN, por consiguiente, el término segmento de ARN abarca como tal al "segmento de ARN interrumpido". Un segmento de ARN ininterrumpido se denomina un segmento de ARN contiguo. En un ejemplo alternativo, un segmento de ARN puede contener ARN-asa resistente y nucleótidos 2'-ON sin sustituir alternativamente. Los oligonucleótidos dobles mixtos tienen preferiblemente menos de 100 nucleótidos y, más preferiblemente menos de 85 nucleótidos, pero más de 50 nucleótidos. La primera y segunda hebras son bases emparejadas mediante Watson-Crick. En un ejemplo, las hebras del oligonucleótido doble mixto están unidas covalentemente mediante un ligando, tal como un tetra, penta o hexanucleótido monocatenario, para que la primera y la segunda hebra sean segmentos de una sola cadena de oligonucleótido que tenga un extremo 3' y 5', únicos. Los extremos 3' y 5' se pueden proteger mediante la adición de una "caperuza en horquilla" a través de la cual el 3' y 5' de los nucleótidos terminales se emparejan mediante Watson-Crick a los nucleótidos adyacentes. Se puede colocar, adicionalmente,

una segunda caperuza en horquilla en la unión entre la primera y la segunda hebra alejadas de los extremos 3' y 5', para que se establezca el emparejamiento de Watson-Crick entre la primera y la segunda hebras.

La primera y segunda hebras contienen dos regiones que son homólogas con dos fragmentos del gen diana, es decir, tienen la misma secuencia que el gen diana. Una región homóloga contiene los nucleótidos de un segmento de ARN y puede contener uno o más nucleótidos de tipo ADN del segmento de ADN unido y puede contener también nucleótidos de tipo ADN que no están dentro del segmento de ADN intermedio. Las dos regiones de homología se separan mediante una región contigua a cada una de ellas que tiene una secuencia que es diferente de la secuencia del gen diana, denominada una "región heteróloga". La región heteróloga puede contener uno, dos o tres nucleótidos desparejados. Los nucleótidos desparejados pueden ser contiguos o pueden estar separados alternativamente mediante uno o dos nucleótidos que son homólogos al gen diana. Alternativamente, la región heteróloga puede contener también una inserción o uno, dos, tres o cinco nucleótidos o menos. Alternativamente, la secuencia del oligonucleótido doble mixto puede diferir de la secuencia del gen diana sólo mediante la eliminación de uno, dos, tres, o cinco nucleótidos o menos del oligonucleótido doble mixto. La longitud y posición de la región heteróloga es, en este caso, considerada por ser la longitud de la eliminación, incluso aunque no haya nucleótidos del oligonucleótido doble mixto dentro de la región heteróloga. La distancia entre los fragmentos del gen diana que son complementarios a las dos regiones homólogas, es idéntica a la longitud de la región heteróloga cuando se pretende una sustitución o sustituciones. Cuando la región heteróloga contiene una inserción, las regiones homólogas se separan así en el oligonucleótido doble mixto más lejos de sus fragmentos homólogos complementarios en el gen, y lo contrario es aplicable cuando la región heteróloga codifica una eliminación.

Los segmentos de ARN de los oligonucleótidos dobles mixtos, están en cada una de las partes de la región homóloga, es decir, una región que es idéntica en la secuencia a un fragmento del gen diana, cuyos segmentos juntos contienen preferiblemente al menos 13 nucleótidos de tipo ARN y, preferiblemente de 16 a 25 nucleótidos de tipo ARN o aún más preferiblemente de 18-22 nucleótidos de tipo ARN o lo más preferiblemente, 20 nucleótidos. En un ejemplo, los segmentos de ARN de las regiones homólogas se separan mediante uno contiguo, es decir, "conectado mediante" un segmento de ADN intermedio. En un ejemplo, cada nucleótido de la región heteróloga es un nucleótido del segmento de ADN intermedio. Un segmento de ADN intermedio que contiene la región heteróloga de un oligonucleótido doble mixto se denomina un "segmento mutador".

En otro ejemplo descrito en la presente memoria, la oligonucleobase del gen reparador es un Vector Mutacional de Oligodesoxinucleótido de Cadena sencilla (SSOMV, de sus siglas en inglés), que se describe en la Solicitud de la Patente Internacional PCT/US00/23457, Patentes E.E.U.U. N^{os} 6.271.360, 6.479.292, y 7.060.500. La secuencia del SSOMV se basa en los mismos principios de los vectores mutacionales descritos en la Patente de E.E.U.U. N^{os} 5.756.325; 5.871.984; 5.760.012; 5.888.983; 5.795.972; 5.780.296; 5.945.339; 6.004.804; y 6.010.907 y en la Publicación Internacional N^{os} WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; y WO 99/40789. La secuencia del SSOMV contiene dos regiones que son homólogas a la secuencia diana separada mediante una región que contiene la alteración genética deseada denominada la región de mutación. La región de mutación puede tener una secuencia que es de la misma longitud que la secuencia que separa las regiones homólogas en la secuencia diana, pero que tiene una secuencia diferente. Tal región de mutación puede causar una sustitución. Alternativamente, las regiones homólogas en la SSOMV pueden estar contiguas entre sí, mientras que las regiones en el gen diana que tienen la misma secuencia están separadas por uno, dos o más nucleótidos. Tal SSOMV causa una eliminación del gen diana de los nucleótidos que están ausentes en la SSOMV. Finalmente, la secuencia del gen diana que es idéntico a las regiones homólogas, puede estar adyacente en el gen diana pero separado por uno o más nucleótidos en la secuencia del SSOMV. Tal SSOMV causa una inserción en la secuencia del gen diana.

Los nucleótidos del SSOMV son desoxirribonucleótidos que se unen mediante enlaces fosfodiéster sin modificar, excepto que el enlace del internucleótido 3' terminal y/o el 5' terminal o alternativamente los dos enlaces del internucleótido 3' terminal y/o 5' terminal, pueden ser un fosforotioato o fosfoamidato. Como se emplea en la presente memoria, un enlace internucleótido es el enlace entre nucleótidos del SSOMV y no incluye la unión entre el nucleótido 3' final o el nucleótido 5' final y un sustituyente de bloqueo, véase supra. En un ejemplo específico, la longitud del SSOMV está entre 21 y 55 desoxinucleótidos y las longitudes de las regiones homólogas son, por consiguiente, una longitud total de al menos 20 desoxinucleótidos y al menos dos regiones homólogas deberían tener cada una longitudes de al menos 8 desoxinucleótidos.

El SSOMV se puede diseñar por complementariedad hacia la hebra de codificación o de no codificación del gen diana. Cuando la mutación deseada es una sustitución de una sola base, se prefiere que ambos nucleótidos mutadores sean una pirimidina. En la medida que sea compatible para lograr el resultado funcional deseado, se prefiere que tanto el nucleótido mutador como el nucleótido diana en la hebra complementaria, sean pirimidinas. Se prefiere particularmente que los SSOMV que codifican mutaciones de transversión, es decir, un nucleótido C o T mutador sea incompatible, respectivamente, con un nucleótido C o T en la hebra complementaria.

Además, el oligodesoxinucleótido del SSOMV puede contener un sustituyente 5 de bloqueo que se une a los carbonos 5' terminales a través de un enlazador. La química del enlace no es fundamental, a excepción de que su longitud debe ser preferiblemente de al menos 6 átomos y de que el enlace debe ser flexible. Se pueden emplear una variedad de sustituyentes no tóxicos, tales como biotina, colesterol u otros esteroides o un colorante fluorescente catiónico no intercalante. Reactivos particularmente preferidos para preparar SSOMV son los reactivos

- comercializados como Cy3TM y Cy5TM por Glen Research, Sterling Va, que son fosforoamidatos de bloqueo que se incorporan dentro de la producción de un oligonucleótido 3', 3', 3', 3'-tetrametil N, N'-isopropil sustituido de colorantes de indomonocarbocianina e indodicarbocianina, respectivamente. Se prefiere Cy3. Cuando la indocarbocianina está sustituida por un N-oxialquilo, se puede unir convenientemente al 5' terminal del oligodesoxinucleótido a través de un fosfodiéster con un fosfato 5' terminal. La química del colorante enlazador entre el colorante y el oligodesoxinucleótido no es fundamental y se elige por conveniencia sintética. Cuando el fosforamidato Cy3 disponible comercialmente se emplea como se indica la modificación 5' resultante consiste en un sustituyente de bloqueo y un enlazador juntos que son una N-hidroxiopropil, N'-fosfatidilpropil 3', 3', 3', 3'-tetrametil indomonocarbocianina.
- 5
- 10 En un ejemplo preferido, el colorante de indocarbocianina está tetra sustituido en las posiciones 3 y 3' de los anillos de indol. Sin limitaciones a la teoría, estas sustituciones previenen que el colorante sea un colorante intercalante. La identificación de los sustituyentes en estas posiciones no es fundamental. El SSOMV puede tener además un sustituyente 3' de bloqueo. De nuevo, la química del sustituyente de bloqueo 3' no es fundamental.

Expresión heteróloga

- 15 En determinados ejemplos, se emplea la expresión heteróloga para expresar genes extraños o copias extras de genes endógenos en la levadura (por ejemplo, *Yarrowia lipolytica*).

La expresión heteróloga en levadura se puede realizar empleando métodos bien conocidos en la técnica. La expresión de genes extraños o copias extras de genes endógenos en la levadura empleando la expresión heteróloga, puede implicar el uso de un vector que incluye (a) secuencias promotoras para la iniciación transcripcional, (b) secuencias terminadoras para la finalización de la transcripción, y (c) un marcador seleccionable. La expresión heteróloga y los vectores de expresión pueden ser como se describen, por ejemplo, en Madzak, C., Gaillardin, C., y Beckerich, J-M., 2004 Heterologous Protein Expression and Secretion in the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica*; un análisis Journal of Biotechnology 109:63-81. En determinados ejemplos de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, el vector es pYLEX1 (Yeastern). Una lista no limitante de los marcadores seleccionables que se pueden emplear incluye *ura3*, *lys5*, *trp1*, *leu2*, *ade1*, *E.coli hph* que codifica resistencia a higromicina, y *SUC2* de *Saccharomyces cerevisiae*. Una lista no limitante de promotores que se pueden emplear incluye pLEU2, pXPR2, pPOX2, pPOT1, pICL1, pG3P, pMTP, pTEF, y pRPS7. En determinados ejemplos, el promotor es el promotor hp4d, que es un fuerte promotor híbrido constitutivo (Patente de E.E.U.U. 6.083.717 publicada el 4 de Julio, 2000). Una lista de secuencias terminadoras no limitante que se puede emplear incluye *XPR2t*, *LIP2t*, y *PHO5t*.

20

25

30

En determinados ejemplos, se emplean como marcadores seleccionables uno o más genes *LYS1* (*Genolevures* YALI0B15444g), *TRP1* (*Genolevures* YALI0B07667g), y *ADE1* (*Genolevures* YALI0E33033g) de *Yarrowia lipolytica*. En determinados ejemplos, se emplean como marcadores seleccionables genes *URA3* (GenBank: U40564.1) o *LEU2* (*genolevures* YALI0C00407) de *Yarrowia lipolytica*.

- 35 En determinados ejemplos, un vector de expresión de integración incluye una o más secuencias promotoras y/o terminadoras que se seleccionan del grupo que consiste en genes de la ruta glucolítica de *Yarrowia lipolytica*, genes de utilización de glicerol o alcanos, *XPR2*, *ACC1*, *HMG1*, *ERG1* y *ERG9*.

En determinados ejemplos una o ambas subunidades de ATP citrato liasa de *Yarrowia lipolytica* (*Genolevures* YALI0D24431g y YALI0E34793g) están sobreexpresadas en *Yarrowia lipolytica*.

40 Enzimas modificadas

Una enzima modificada o mutada de la presente divulgación se pueden modificar o mutar mediante cambios, inserciones, sustituciones, y similares, en los pares de bases.

Los genes que codifican enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos y en la ruta de biosíntesis de isoprenoides, son las dianas preferidas para la mutación. En algunos ejemplos, el gen diana codifica una acil CoA carboxilasa. En otros ejemplos, el gen diana codifica una HMG-CoA reductasa. En otros ejemplos, el gen diana codifica una escualeno epoxidasa. En otros ejemplos, el gen diana codifica una escualeno sintasa. En determinados ejemplos, el gen diana codifica una ATP citrato liasa. Las mutaciones se pueden diseñar para que reduzcan o eliminen la actividad de una enzima, mejore la actividad de una enzima, o que altere la actividad de la enzima (por ejemplo, cambiar la selectividad del sustrato).

45

50 En levaduras oleaginosas de tipo salvaje, la acetil-CoA se dirige extensivamente en la biosíntesis de ácidos grasos a través de la acetil-CoA carboxilasa (ACCCasa). Por tanto, para incrementar la cantidad de acetil-CoA disponible para la síntesis de escualeno, es deseable reducir la expresión enzimática o la actividad específica de la ACCCasa. Un ejemplo de una secuencia genética para la ACCCasa es el gen ACC1 en *Saccharomyces cerevisiae* como se muestra en el número de entrada Z71631. Por consiguiente, en determinados ejemplos, las actividades intracelulares reducidas de la ACCCasa, enzima del punto de ramificación entre la biosíntesis de mevalonato y la biosíntesis de triglicéridos, disminuirá la cantidad de acetil-CoA dividida para la síntesis de grasa, incrementando de esta manera su capacidad para la ruta de isopreno.

55

- La actividad de la HMG-CoA reductasa es la enzima limitante para la síntesis de isopreno. Ejemplos de secuencias genéticas para la HMG-CoA reductasa incluyen HMG1 y los genes HMG1 de *Saccharomyces cerevisiae*, como se muestra en los números de entrada NC_001145 y NC_001144, respectivamente. Por consiguiente, en determinados ejemplos, la actividad HMG-CoA reductasa se aumentará mediante la modificación del gen HMGR para incrementar la transcripción, estabilizar la proteína resultante, y/o reducir la inhibición del producto.
- 5 El descenso de la actividad ACCasa y/o incremento de la actividad HMG-CoA reductasa en una levadura puede crear la producción de un organismo isoprenoide principal capaz de producir una cantidad de productos isoprenoides relacionados mediante la manipulación de enzimas posteriores en la ruta.
- 10 La escualeno epoxidasa cataliza la primera etapa comprometida en la biosíntesis de esterol. Un ejemplo de una secuencia genética para Escualeno epoxidasa es el gen ERG1 de *Saccharomyces cerevisiae*, como se muestra en el número de entrada NC_001139. Por consiguiente, en determinados ejemplos, la actividad de la escualeno epoxidasa, sensibilidad hacia los inhibidores y/o expresión se atenuarán en una levadura, por ejemplo mediante residuos importantes catalíticamente en la secuencia de aminoácidos de la enzima.
- 15 La escualeno sintasa cataliza la síntesis de escualeno mediante condensación de dos precursores de isopreno c15 (farnesil difosfato (FPP)). Un ejemplo de secuencia genética para la síntesis de escualeno es el gen ERG9 de *Saccharomyces cerevisiae*, como se muestra en el número de entrada NC_001140. Por consiguiente, en determinados ejemplos, la actividad y/o expresión de la escualeno sintasa, se incrementará en una levadura.
- 20 La ATP citrato liasa (E.C. 4.1.3.8) separa catalíticamente el citrato para producir acetil CoA y oxalacetato. La AcetilCoA se puede emplear por la ACCasa para la biosíntesis de ácidos grasos o por la acetil CoA acetil transferasa para la producción de isoprenos y derivados tales como escualeno.
- 25 La mevalonato quinasa es la primera enzima después de la HMG-CoA Reductasa en la ruta del mevalonato, y cataliza la conversión del Mevalonato a Mevalonato-5-fosfato. Por consiguiente, en determinados ejemplos, la actividad mevalonato quinasa y/o la expresión de los niveles se incrementará en la levadura, por ejemplo, mediante el cambio catalítico de restos importantes de la secuencia de aminoácidos de la enzima o incrementando su dosis genética o niveles de transcripción.
- La glicerol quinasa cataliza la transferencia de un fosfato del ATP al glicerol para formar glicerol fosfato. Por consiguiente, en determinados ejemplos, la actividad glicerol quinasa y/o niveles de expresión se incrementarán en la levadura, por ejemplo, mediante el cambio catalítico de restos importantes de la secuencia de aminoácidos de la enzima o incrementando su dosis genética o niveles de transcripción.
- 30 El resultado de los cambios metabólicos en determinados ejemplos será en el canal de carbono de acetil-CoA a escualeno, y atenuar rutas competitivas importantes para este flujo de carbono, dando como resultado un incremento significativo del escualeno producido.
- Reparto de oligonucleobases del gen reparador dentro de células de levadura
- 35 En los métodos descritos en la presente memoria se puede emplear cualquier método comúnmente conocido para transformar una célula de levadura con una oligonucleobase del gen reparador. Ejemplos de métodos incluyen el empleo de electroporación, LiOAc, biolística, esferoplástica, y/o *Agrobacterium* (véase, por ejemplo, McClelland, C.M., Chang, Y.C., y Kwon-Chung, K.J (2005) *Fungal Genetics and Biology* 42:904-913).
- 40 En determinados ejemplos, se introduce una oligonucleobase de un gen reparador dentro de una célula de levadura mediante electroporación. En algunos ejemplos, se introduce una oligonucleobase de un gen reparador dentro de una célula de levadura que se ha tratado químicamente con PEG (3350 ó 4000 mw) y/o Acetato de Litio mediante electroporación. En determinados ejemplos, una oligonucleobase del gen reparador se introduce dentro de una célula de levadura utilizando PEG (3350 ó 4000 mw) y/o Acetato de Litio.
- 45 En la Publicación Internacional WO 99/07865, US09/129.298, se describen condiciones específicas para emplear microtransportadores en los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, microtransportadores de hielo (60 mg/mL), oligonucleótido doble mixto (60 mg/mL), 2.5 M CaCl₂ y 0,1 M espermidina se añaden en este orden; la mezcla se agita suavemente, por ejemplo mediante agitador Vortex, durante 10 minutos y dejándolo a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual los microtransportadores se diluyen en 5 volúmenes de etanol, se centrifugan y resuspenden en etanol 100%. Ejemplos de concentraciones de los componentes en la disolución de adhesión incluyen microtransportadores de 8-10 µg/µL, 14-17 µg/µL de oligonucleótido doble mixto, 1,1-1,4 M CaCl₂ y 18-22 mM de espermidina. En un ejemplo, las concentraciones de los componentes son de 8 µg/µL para los microtransportadores, 16,5 µg/µL para el oligonucleótido doble mixto, 1,3 M de CaCl₂ y 21 mM de espermidina.
- 50 En algunos ejemplos, las oligonucleobases del gen reparador se pueden repartir a la célula de la levadura mediante electroporación, según técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Becker, D. M., y Guarente, L. High Efficiency Transformation of Yeast by Electroporation. *Methods in Enzymology*, vol. 194, sección [12] pp. 182-186. 1991. Elsevier Academic Press, Londres).
- 55

Selección de la levadura que tiene la enzima modificada deseada

La enzima modificada que expresa la levadura se puede identificar a través de una cantidad de medios. En un método, se emplea una estrategia de co-conversión de las oligonucleobases del gen reparador (GRONs) para dirigir simultáneamente una conversión seleccionable (es decir, un marcador) y una conversión no seleccionable (por ejemplo, un gen diana de interés) en el mismo experimento. De esta manera, se eliminarían las células para las que no se repartió las GRONs o que no fueron capaces de transmitir las conversiones especificadas mediante la GRON. Ya que se espera que el reparto de GRONs a genes ajenos a los diana no sea selectivo, a la misma frecuencia, también se espera que una colonia con una conversión correctamente seleccionada tenga una conversión en uno de los otros genes diana. Los casos de conversión se resolverán mediante el análisis del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).

Por tanto, el ADN genómico se extrae a partir de la levadura y de la investigación de las muestras de ADN individuales empleando tecnología de detección de SNP, por ejemplo, la Reacción de la Cadena de Polimerasa alelo-específica (ASPCR, de sus siglas en inglés). Para confirmar independientemente el cambio de secuencia en la levadura positiva, se puede amplificar por PCR la región apropiada del gen diana y o bien secuenciar directamente el amplicón resultante, o bien clonar y secuenciar los múltiples insertos.

Alternativamente, la incorporación de la mutación dentro del gen de interés se puede identificar mediante cualquiera de las diversas técnicas de biología molecular diseñadas para detectar mutaciones de un solo nucleótido en el ácido nucleico extraído (por ejemplo, métodos de amplificación tales como PCR y análisis de extensión del primer nucleótido). Se pueden detectar mutaciones más extensas mediante la amplificación y secuenciación de la región del gen diana a mutar.

Alternativamente, las células de la levadura o de las levaduras que contienen la enzima modificada se pueden identificar mediante, por ejemplo, el análisis de la composición de los isoprenoides producidos por la levadura. Por tanto, la levadura se puede cultivar y extraer y analizar las grasas empleando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, cromatografía de gases o HPLC).

Ejemplos

Ejemplo 1. Sistemas de transformación de *Cryptococcus curvatus* y *Rhodotorula glutinis*. (no según la presente invención)

Para crear un sistema de transformación de *Cryptococcus curvatus* (ATCC cepa 20508) y *Rhodotorula glutinis* (ATCC cepas 10788 y 204091), se emplea un casete de expresión KANMX (promotor-gen-terminador) el cual confiere resistencia a Kanamicina para *S. cerevisiae* como un marcador seleccionable para convertir las cepas sensibles a kanamicina en resistentes (Véase, por ejemplo, Baudin, A., *et al.* (1993) *Nucleic Acids Research* (21) 3329-3330). Las cepas se transforman sólo con el casete de expresión, así como con el KANMX ligado a fragmentos de restricción de un plásmido presentado en *R. glutinis* (Véase, por ejemplo, Oloke, J.K., y Glick, B.R. (2006) *African Journal of Biotechnology* 5(4):327-332) que contiene ADN de origen de replicación. El ADN se introduce en el *C. curvatus* y *R. glutinis* mediante electroporación, LiOAc, biolística, esferoplástica y/o *Agrobacterium* (McClelland, C.M., Chang, Y.C., y Kwon-Chung, K.J. (2005) *Fungal Genetics and Biology* 42:904-913).

Ejemplo 2. Marcadores Seleccionables (no según la presente invención)

Para generar mutaciones auxotróficas de uracilo en *Cryptococcus curvatus* y *Rhodotorula glutinis*, las células se cultivaron en un medio mínimo que contiene el antimetabolito ácido 5-fluorouracilo para seleccionar los mutantes resistentes con lesiones en los genes *ura3* o *ura5*. Se acumularon 33 colonias 5-FOA^R estables de *Cryptococcus curvatus* y 20 colonias 5-FOA^R de *Rhodotorula glutinis*. Se clonaron tanto los genes *ura3* de tipo salvaje de *Cryptococcus curvatus* como de *Rhodotorula glutinis*, y se secuenciaron los genes *ura3* mutantes en los aislados 5-FOA^R.

Se clonaron otros marcadores auxotróficos mediante complementación funcional en *Saccharomyces cerevisiae* (Véase Ho, Y.R., y Chang, M.C. (1988) *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* 21(1):1-8). Se construyeron bibliotecas genómicas y/o de ADNc a partir de *Cryptococcus curvatus* y *Rhodotorula glutinis* para la unión a un vector de expresión de *Saccharomyces* seleccionable de uracilo para la transformación en la cepa YPH500 (*MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1*) para seleccionar lisina, adenina, triptófano, histidina, y leucina prototrofos. A partir de estos prototrofos, se secuencian los genes correspondientes para LYS2, ADE2, TRP1, HIS3, y LEU2 a partir del inserto genómico o ADNc.

Ejemplo 2. Manipulación Genética en la Levadura empleando tecnología RTDS.

(no según la presente invención)

Se clonaron los alelos de los genes *leu2*, *lys5* y *ura3* de la cepa ATCC 90811 de *Yarrowia lipolytica* (*leu2-35 lys5-12 ura3-18 XPR2B*) mediante PCR y se compararon sus secuencias con las de los alelos de tipo salvaje para identificar las diferencias.

Para *ura3*, las diferencias se encontraron en las posiciones 1365 (mutación A→G, dando como resultado un cambio silente de AAA→AAG que codifica para lisina), 1503 (secuencias AAGAA extra en ATCC 90811 que da como resultado un cambio de estructura, pero que vuelve a resaltar en la posición 1511 dando como resultado 7 aminoácidos adicionales, después de lo cual la secuencia continúa como la YL URA3 en GenBank), 1511 (T extra en ATCC 90811), y 1978 (mutación C→T, conduciendo a una mutación de parada que trunca 24 aminoácidos cortos de la proteína del carbono Terminal). Se diseñó una GRON de un oligonucleótido para restaurar la prototrofia mediante conversión STOP(TGA)→R(CGA) para la producción de 264R en base a la numeración de aminoácido Y1Ura3 – YLU40564. Las GRONs que se emplearon son Y1Ura31264/C/40/5'Cy3/3'idC, que tiene la secuencia

VCGAGGTCTGTACGGCCAGAACCGAGATCCTATTGAGGAGGH, y Y1Ura31264/NC/40/5'Cy3/3'idC, que tiene la secuencia

VCCTCTCAATAGGATCTCGGTTCTGGCCGTACAGACCTCGH, donde V=CY3; H=3'DMT dC CPG. Se prepararon 10, 30, y 50 µg de cada una de las GRONs en la cepa ATCC 90811 de *Yarrowia lipolytica* usando un método basado en Acetato de litio, y se colocó en placas ura- 2% glucosa. Se obtuvo un total de 82 colonias ura+ con la GRON diseñada empleando la hebra codificante y 6 colonias con la GRON diseñada empleando la hebra no codificante, demostrando la preferencia común de la hebra en la transformación con falta de oligonucleótidos de reparación. De la secuenciación de 18 de los transformantes de la hebra codificante, 17 de los clones demostraron el cambio previsto.

Para LEU2 las diferencias se encontraron en las posiciones 1710 (la ausencia del C extra conduce a un cambio de estructura y una terminación proteica prematura); 1896 (T extra); 2036 (mutación T→A, localizado después del codon de parada); 2177 (T extra ausente, localizado después del codon de parada).

Para LEU2 las diferencias se encontraron en las posiciones 1092 (G→A TCG→TCA, una sustitución conservadora (Serina)); 1278 (G→A CAG→CAA, una sustitución conservadora (Glutamina)); 1279 (G→A GGT→ATT, cambiando V→I).

Por consiguiente, las mutaciones se pueden emplear para varios propósitos, por ejemplo convertir la levadura prototrófica a auxotrófica y viceversa.

Una estrategia similar para demostrar la eficacia de la tecnología RTDS en *Cryptococcus curvatus* y *Rhodotorula glutinis* se realiza como se describe para *Yarrowia lipolytica*, en la que se corrigen las mutaciones *ura3* para restaurar la prototrofia.

En determinados ejemplos, la eficacia del RTDS en *Y. lipolytica* se puede demostrar mediante la integración de una versión mutada del gen higromicina de *E. coli* en su genoma. Esta versión del gen, que tiene un punto de mutación en G34T, codifica un cambio en E12STOP tal que no se ve afectada la sensibilidad natural de *Y. lipolytica* a higromicina. La transformación con una GRON que corrige esta mutación conferirá resistencia a la cepa de *Y. lipolytica*, por ejemplo, hasta 1000 µg/ml de higromicina. También se han construido mutaciones dobles en el gen resistente a higromicina (HGH), que comprenden de G34T A37T (E12ASTOP K13STOP) que se pueden corregir mediante una GRON única, y G34TT149G (E12STOP Y46 STOP) que se puede corregir por 2 GRONs.

Para ensayar la actividad de GRON en *Yarrowia*, se empleó la sensibilidad natural de *Yarrowia lipolytica* de tipo salvaje para el antibiótico aminoglucósido higromicina B. La higromicina B (hmB) es un antibiótico aminocíclico producido por *Streptomyces hygroscopicus* que inhibe la síntesis proteica tanto en procariotas como en eucariotas interfiriendo con la translocación ribosomal y con el reconocimiento del aminoacilARNt. La resistencia se puede conferir mediante la introducción del gen *hph* (también conocido como *aph(4)*) de *E. coli* (GENBANK V01499) que codifica una fosfotransferasa aminocíclica que inactiva la higromicina B mediante la adición covalente de un grupo fosfato en la posición 4 del anillo cíclico. La cepa Polg de *Yarrowia lipolytica* (*Mat a ura3-302:URA3 leu2-270 xpr2-322 xpr-2* de Yeastern) se realizó con el gen *hph* de *E. coli* que contiene o bien una sola mutación (E12stop de G34T) o bien una mutación doble E12stopK13stop (G34T.A37T) mutaciones clonadas en el vector pyLEX1-2u-ura3-13, dejando el gen bajo control del promotor hpd4 y el terminador XPR2. Los vectores lineales se integraron en el genoma de selección para la restauración de la prototrofia conferida mediante el marcador LEU2. Las cepas resultantes tienen versiones desactivadas del gen de higromicina fosfotransferasa (por lo tanto sensible a higromicina), y se convirtieron con las GRONs de a continuación, restaurando bien la G34T o bien la G34T.A37T para el tipo salvaje (resistente a higromicina).

GRONs para la restauración de E12stop de tipo salvaje (T34G)

HPH2/C/42/5'Cy3/3'idC

5'Cy3-GAACTCACCGCGACGTCTGTGCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAG-3'idC

HPH2/NC/42/5'Cy3/3'idC

5'Cy3-HCTTTTCGATCAGAACTTCTCGACAGACGTGCGGGTGTGAGTTC-3'idC

GRONs para la restauración de E12stopK13stop de tipo salvaje (T34G T37A)

HPH3/C/43/5'Cy3/3'idC

5'Cy3-CTCACCGCGACGTCTGTGCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCG-3'idC

HPH3/NC/43/5'Cy3/3'idC

5 5'Cy3-CGAACTTTTCGATCAGAACTTCTCGACAGACGTCGCGGTGAG-3'idC

Se emplearon 30 µg de la GRON indicada para convertir la cepa mutante hph simple o doble en réplicas (x6), se agruparon, y una alícuota se colocó en placas YEPD que contienen 100-1000 µg/ml de higromicina para optimizar la tasa de la señal-interferencia. Con ambas cepas, se obtuvieron cantidades significativas de colonias presuntamente transformadas a cualquier concentración de higromicina proporcionada por encima del control 'No ADN', con una fuerte predisposición hacia la hebra GRON no codificante en ambos casos. Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren la conversión de GRON del gen de fosfotransferasa higromicina del gen diana de *Yarrowia lipolytica*, y además que se puede conseguir la conversión de dos mutaciones (T34G T37A) empleando una sola GRON. Se realizó la secuenciación del ADN para confirmar la restauración del genotipo de tipo salvaje.

Cepa	ADN	Colonias en Higromicina 100 µg/ml	Colonias en Higromicina 200 µg/ml	Colonias en Higromicina 400 µg/ml	Colonias en Higromicina 600 µg/ml	Colonias en Higromicina 800 µg/ml	Colonias en Higromicina 1000 µg/ml
E12stop	No ADN	0	0	1	1	0	0
E12stop	30 µg hebra codificante	0	1	6	1	1	0
E12stop	30 µg hebra no codificante	20	21	21	12	10	8
E12stopK13stop	No ADN	0	0	4	1	0	0
E12stopK13stop	30 µg hebra codificante	2	2	1	2	0	2
E12stopK13stop	30 µg hebra no codificante	5	3	5	7	8	8

15

Ejemplo 3. Clonación de genes diana. (no según la presente invención)

Las secuencias para la ACCasa, HMGR, escualeno sintasa y escualeno epoxidasa, disponibles en la base de datos NCBI de *Saccharomyces* y otras levaduras, se emplearon como fuente de iniciadores PCR y los correspondientes genes se clonaron a partir de *Cryptococcus curvatus* y *Rhodotorula glutinis* junto con sus regiones reguladoras correspondientes (promotores, terminadores). Para identificar las mutaciones promotoras al "alza" o a la "baja" que incrementan o disminuyen la transcripción, respectivamente, los promotores de estos cuatro genes se clonaron con una ADN polimerasa relativamente propensa a cometer errores para generar mutaciones puntuales en los promotores, y estos fragmentos se clonaron en plásmidos fusionados con Proteína Verde Fluorescente (GFP, de sus siglas en inglés) o con genes marcadores de beta-galactosidasa para ensayar *in vitro* en *S. cerevisiae* o *E. coli*. Se reintrodujeron mutaciones del promotor al "alza" mediante RTDS en las secuencias genómicas de HMGR y escualeno sintasa, mientras que las mutaciones promotoras "a la baja" se realizaron en las secuencias genómicas de ACCasa y escualeno epoxidasa. Se clonaron los promotores de los genes esenciales (por ejemplo, GAPDH, actina) en *R. glutinis* y *C. curvatus* para emplear en la expresión del gen heterólogo. Los iniciadores para la clonación PCR se diseñaron a partir de la homología por estos genes en *S. cerevisiae*.

30 Ejemplo 4. Manipulación de genes diana para la producción aumentada de escualeno.

ACCasa. Se determinó el número de copias del gen ACCasa en *R. glutinis* y *C. curvatus* y otras levaduras. Se empleó RTDS para reducir la expresión ACCasa mediante la introducción de codones de parada inmediatamente después del sitio de comienzo transcripcional en cualquiera de las copias extra.

Escualeno epoxidasa. De forma similar, se alcanzó un incremento en la acumulación de escualeno en *S. cerevisiae* mediante disrupción en el diploide de una copia de escualeno epoxidasa. Kamimura, N., Hidaka, M., Masaki, H., y Uozumi, T. (1994) *Appl. Microb. Biotech.* 42: 353-357. Se determinó el número de copias de la escualeno epoxidasa en *R. glutinis* y *C. curvatus* y otras levaduras, se empleó RTDS para crear o insertar un codon de parada inmediatamente después del sitio de comienzo transcripcional en copias extras más allá de la primera.

En algunos ejemplos, la actividad escualeno epoxidasa se atenúa mediante la adición de terbinafina (un inhibidor de escualeno epoxidasa) al medio. En determinados ejemplos, se realizan cambios en los aminoácidos de la escualeno epoxidasa para incrementar la sensibilidad de escualeno epoxidasa a terbinafina (por ejemplo, cambios de aminoácidos homólogos a G30S, L37P, y R269G mapeado por *Saccharomyces* ERG1). En algunos ejemplos, los cambios de aminoácidos se realizan mediante síntesis génica y reemplazo del gen de tipo salvaje por una versión mutante mediante recombinación homóloga. En otros ejemplos, los cambios se introducen en el gen de tipo salvaje mediante RTDS.

HMGR. Tanto *Saccharomyces cerevisiae* como las enzimas HMGR de mamíferos contienen secuencias de aminoácidos en sus regiones enlazantes, que se presentan en muchas proteínas de corta vida que son objeto de una rápida renovación intracelular en eucariotas (véase Rogers, S., Wells, R., y Rechsteiner, M. (1986) *Science* 234: 364-368; y Chun, K.T., y Simoni, R.D. (1991) *J. Biol. Chem.* 267(6): 4236-4246). Se identifican, si están presentes, secuencias similares en los genes HMGR en *Y. lipolytica*, *R. glutinis* y/o *C. curvatus*, y se eliminan empleando RTDS para reducir la renovación HMGR proteica. Se encontraron secuencias similares en el gen escualeno sintasa de *S. cerevisiae*, y se determinaron también si tales secuencias se presentaban en los genes sintasa escualeno en *Y. lipolytica* y/o *C. curvatus*. Se eliminaron también las secuencias si estaban presentes en la escualeno sintasa de *Y. lipolytica* y/o *C. curvatus* utilizando RTDS para reducir la renovación proteica.

La HMGR en *S. cerevisiae* comprende dos dominios altamente conservados, de los que el N-terminal de los 552 aminoácidos son responsables de la asociación de la membrana. La sobreexpresión de la proteína HMG1 truncada que contiene sólo la porción catalítica C-terminal, conduce a un incremento de la actividad de la HMG-CoA de 40 veces en *S. cerevisiae*, con una acumulación de escualeno aumentada en un 5,5% de la materia seca (Polakowski, T., Stahl, U., y Lang, C. (1998) *Appl. Microbiol. Biotech.* 49:66-71). Se determinó si las proteínas HMGR de *Y. lipolytica*, *R. glutinis* y *C. curvatus* tenían una estructura similar, y, si es así, sólo se podían expresar los fragmentos que tienen el dominio catalítico soluble.

La estructura proteica y la secuencia de ADN de HMGR están altamente conservadas entre los eucariotas de los hongos hasta los animales, con un dominio N-terminal asociado a la membrana y un dominio catalítico C-terminal. El límite entre los dos dominios se puede mapear hasta una región de 500-600 aminoácidos en el gen *HMG1* de *Yarrowia lipolytica* (Genolevures *Yarrowia lipolytica* YALI0E04807g) donde se trazan las transiciones hidrofóbicas a las hidrofílicas. Se eligieron los restos 548 y 544 para la evaluación del diagrama de hidrofobicidad de *HMG1* de *Yarrowia lipolytica*, y su homología para el N-terminal de las proteínas truncadas de *Saccharomyces cerevisiae* (Donald, K.A.G., et al, 1997. *Appl. Environ. Micro.* 63(9):3341-3344) y *Candida utilis* (Shimada, H. et al, 1998. *Appl. Environ. Micro.* 64(7):2676-2680). Por consiguiente, en un ejemplo, se expresan los aminoácidos 548-1000 del dominio C-terminal de *HMG1* de *Yarrowia lipolytica*; en un segundo ejemplo, se expresan los aminoácidos 544-1000 del dominio C-terminal de *HMG1* de *Yarrowia lipolytica*. En ejemplos relacionados, se expresan los aminoácidos 543-1000 del dominio C-terminal de *HMG1* de *Yarrowia lipolytica*; o se expresan los aminoácidos 545-1000 de los dominios C-terminales de *HMG1* de *Yarrowia lipolytica*; o se expresan los aminoácidos 546-1000 de los dominios C-terminales de *HMG1* de *Yarrowia lipolytica*; o se expresan los aminoácidos 547-1000 de los dominios C-terminales de *HMG1* de *Yarrowia lipolytica*; o se expresan los aminoácidos 549-1000 de los dominios C-terminales de *HMG1* de *Yarrowia lipolytica*.

La expresión del dominio catalítico C-terminal del aminoácido 457 de HMGR (restos 543-1000) en la cepa Polg de *Y. lipolytica* produjo un 2% de escualeno/lípido total en comparación con el 0% en la cepa control que contiene sólo el vector en experimentos que emplean agitación de matraces. El proceso se repitió y amplió empleando fermentadores.

En hamsters sirios, la actividad del dominio catalítico de HMGR se modula a la baja mediante la fosforilación por una quinasa dependiente de AMP (Om Kumar, R.V., Darnay, B.G., y Rodwell, V.W. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:6810-6814), y se describió un modo de regulación similar en *S. cerevisiae*. Se determinó si las proteínas HMGR en *R. glutinis*, *C. curvatus* y otras levaduras se regulaban de forma similar, y de ser así, se empleó RTDS para eliminar el sitio de fosforilación.

Escualeno sintasa. La escualeno sintasa en sistemas de mamíferos se regula coordinadamente en el nivel transcripcional junto con la HMG-CoA sintasa y la farnesil difosfato sintasa mediante SREBPs (de sus siglas en inglés, proteínas de unión al elemento regulador del estero) (Szkopinska, A., Swiezewska, E., y Karst, F (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 267:473-477). Las SREBPs existen en tres formas, de las cuales una se une al promotor de la escualeno sintasa. Se determinó si tales factores de transcripción y/o sitios de unión se presentan en el promotor de la escualeno sintasa en *R. glutinis*, *C. curvatus* y otras levaduras, y, si se presentan, se empleó RTDS para realizar los cambios en tales factores de transcripción y/o sitios de unión que mejoraran la transcripción de la escualeno sintasa.

La sobreexpresión de Escualeno Sintasa en *Y. lipolytica* y en la cepa Polg de *Y. lipolytica* produjo un 2% de escualeno/lípido total en comparación con el 0% en la cepa control que contiene sólo el vector en experimentos que emplean agitación de matraces. El proceso se repitió y amplió empleando fermentadores.

Ejemplo 5. Condiciones de Cultivo para *Cryptococcus curvatus*.

5 (no según la presente invención)

El cultivo de *Cryptococcus curvatus* se evaluó para determinar las mejores fuentes de carbono para maximizar su masa celular en cultivo. En un medio rico basado en extracto de levadura (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona), *C. curvatus* se cultivó en pocillos de 2-20% p/v de glucosa, alcanzando un nivel máximo de 55 g/L peso seco celular (CDW) al 16% p/v de glucosa y después de 4 días. De forma similar, *C. curvatus* creció en el mismo medio con 3-12% p/v de glicerol, alcanzando un CDW de 40 g/L en 12% de glicerol después de 5 días. *C. curvatus* también se cultivó en glicerol Biodiesel (Imperial Western Products, Coachella, CA) hasta 3,5% p/v, dando como resultado 23 g/L CDW.

Ejemplo 6. Manipulación medioambiental de genes diana para la producción aumentada de escualeno.

Se ensayaron manipulaciones medioambientales para incrementar el rendimiento neto de escualeno. Éstas incluyen (a) inhibir la expresión y/o actividad ACCasa con ácido oleico, aceite de oliva, u otro aceite o aceites vegetales, inositol, colina, soraphen, fluazifop, y cletodim u otros herbicidas inhibidores de la ACCasa, (b) inhibir la expresión y/o actividad de la escualeno epoxidasa con terbinafina, tolnaftato, y ergosterol u otros fungicidas inhibidores de la escualeno epoxidasa, (c) manipular la tasa C/N en el medio basado en glicerol (en el medio de inicio o mediante adiciones), (d), variar la fuente de nitrógeno en el medio (orgánico frente inorgánico frente simple/complejo), (e) variar los regímenes de adición de carbono (por ejemplo, lotes frente alimentación), (f) examinar el efecto de los nutrientes agotados diferentes a la fuente de carbono, (g) variar la fuente de carbono para incluir mezclas de azúcares, alcoholes de azúcar, alcoholes, polialcoholes, y ácidos orgánicos, (h) seleccionar para el cultivo compuestos inhibidores de la HMGR, tales como lovastatina u otros inhibidores de tipo estatina, y (i) seleccionar para una gran producción de aceite en cultivo el empleo de colorantes o cepas lipofílicos y/o mediante análisis de lípidos extraíbles empleando, por ejemplo, métodos gravimétricos o cromatografía de gases.

Por ejemplo, *Yarrowia lipolytica* ATCC 90904 se cultivó en un medio con una alta tasa de Carbono/Nitrógeno (C/N = 420, Li, Y-H., Liu, B., Zhao, Z-B., y Bai, F-W. 2006 "Optimized Culture Medium and Fermentation Conditions for Lipid Production by Rhodosporidium toruloides" Chinese Journal of Biotechnology 22(4): 650-656) (de aquí en lo sucesivo "Medio CYM001") enriquecido con 0 a 50 µg/ml de terbinafina a 30 °C, 300 rpm durante 120 horas. Concentraciones de terbinafina de 12,5 µg/ml o superiores, dieron como resultado hasta el 18,5% de escualeno del lípido total.

Se emplearon varias cepas de *Yarrowia lipolytica* para la producción de lípido y escualeno, incluyendo ATCC 20688, ATCC 90811, ATCC 90904, ATCC 90812, ATCC MYA-2613, y Yeastern polg. Por ejemplo, se cultivó una cepa de polg (Yeastern) de *Yarrowia lipolytica* en un medio de una tasa elevada de Carbono/Nitrógeno (C/N = 420, Li, Y-H., Liu, B., Zhao, Z-B., y Bai, F-W. 2006 "Optimized Culture Medium and Fermentation Conditions for Lipid Production by Rhodosporidium toruloides" Chinese Journal of Biotechnology 22(4): 650-656) (de aquí en lo sucesivo "Medio CYM001") enriquecido con 0 a 50 µg/ml de terbinafina a 30 °C, 300 rpm durante 120 horas. Concentraciones de terbinafina de 12,5 µg/ml o superiores, dieron como resultado hasta el 38% de escualeno del lípido total y se alcanzaron Valores de lípido total/Peso seco celular de hasta 51%.

En otro ejemplo, se cultivó *Yarrowia lipolytica* ATCC 90904 en un medio CYM001 enriquecido con 0 a 50 µg/ml de ácido oleico a 30°C, 300 rpm durante 120 horas.

Se encontró que el enriquecimiento con 10 µg/ml de ácido oleico mejoraba en 10 veces la acumulación de lípido en el lípido/CDW (peso celular en seco) frente al no enriquecimiento.

En otro ejemplo, se cultivó *Yarrowia lipolytica* ATCC 90904 en un medio CYM001 enriquecido con 0 a 200 µM de cletodim a 30°C, 300 rpm durante 120 horas. El enriquecimiento de 200 µM de cletodim dio como resultado un incremento de 60 veces el rendimiento (mg) de escualeno por matraz de 60 ml.

Se ha demostrado que un incremento de oxígeno causa una regulación diferencial de HMG1 y HMG2 en *S. cerevisiae*, dando como resultado una rápida degradación de la HMG2 y una expresión incrementada de HMG1 bajo condiciones aeróbicas (Casey, W.M., Keesler, G.A., Parks, L.W. (1992) J. Bact. 174:7283-7288). Se determinó si el número de genes HMGR en nuestras levaduras oleaginosas se afecta por el oxígeno, y si es así, se manipula su expresión y actividad en el fermentador mediante la alteración de los niveles de oxígeno.

Comenzando con un "Medio CYM001" (Li, Y-H., Liu, B., Zhao, Z-B, y Bai, F-W. (2006) Chinese Journal of Biotechnology 22(4):650-656), se cambian varios componentes y concentraciones de los componentes (incluyendo la adición de nuevos componentes) para mejorar el crecimiento celular, porcentaje de contenido de lípido total/unidad de masa celular, y el porcentaje de escualeno/lípido total. Los componentes del medio que se evalúan incluyen: fuentes de carbono: glicerol, glucosa, fuentes de nitrógeno: compuestos de amonio, nitratos, aminoácidos, sales minerales: potasio, magnesio, sodio, hierro, manganeso, zinc, calcio, cobre, extracto de levadura, precursores

lipídicos, y efectores de la síntesis lipídica: terbinafina, cletodim, ácido oleico, ácido palmitoleico, ácido linoleico, ácido linolénico y agentes antiespumantes. Otros factores que se evalúan incluyen: porcentaje inoculante, tiempo de fermentación, temperatura, pH, contrapresión, oxígeno disuelto (DO), composición de la alimentación, estrategia de la alimentación y estrategia de agitación.

5 Ejemplo 7. Selección de la Cepa. (no según la presente invención)

Se emplearon métodos de selección de la cepa tradicional en levaduras oleaginosas para incrementar su productividad neta de escualeno. Se evaluaron y/o seleccionaron las cepas mutadas mediante UV, nitrosoguanidina, o etil metano sulfonato para una acumulación incrementada de escualeno. Las cepas también se sometieron a una presión de selección repetitiva, tal como el paso repetido por medio YEP (15 g/L de extracto de levadura, 5 g/L peptona) que contiene 3% de glicerol o un medio que contiene lovastatina y otro inhibidor HMGR conocido. Las cepas se sometieron también al paso repetido en Medio CYM001 que contiene cantidades variables de glicerol y/o glucosa o un medio que contiene lovastatina y/o otros inhibidores HMGR conocidos, y/o inhibidores de escualeno sintasa para obtener mutantes espontáneos que incrementan la actividad HMGR y/o escualeno sintasa. Tales mutaciones pueden estar en la HMGR, escualeno sintasa, u otros genes ("mutaciones en sitios secundarios").

15 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se emplean en la presente memoria, tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por cualquier experto en la técnica a la cual pertenece esta invención.

Las invenciones que se describen de forma ilustrativa en la presente memoria, se pueden practicar adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elemento, limitación o limitaciones, que no se describen específicamente en la presente memoria. Por tanto, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc, se deberían leer de una forma extensa y sin limitación. Además, los términos y expresiones que se emplean en la presente memoria se han empleado como términos de descripción y no de limitación, y no existe intención en el empleo de tales términos y expresiones, de excluir ninguna de las equivalencias de las características mostradas y descritas, o porciones de las mismas, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención que se reivindica.

Por tanto, se entenderá que aunque la invención se ha divulgado específicamente mediante realizaciones preferidas, el experto en la técnica puede recurrir a características, modificaciones, mejoras y variaciones opcionales de las invenciones descritas en la presente memoria incluidas en ellas, y que tales modificaciones, mejoras y variaciones, se consideran que están dentro del alcance de esta invención. Los materiales, métodos, y ejemplos que se proporcionan aquí, son representativos de realizaciones preferidas, son ejemplos, y no tienen la intención de limitar el alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una levadura transformada genéticamente, en donde dicha levadura transformada genéticamente expresa una o más enzimas modificadas que tienen una o más mutaciones diseñadas, dicha enzima o enzimas modificadas comprenden escualeno epoxidasa, en donde dicha escualeno epoxidasa tiene una actividad y/o expresión reducida, en donde dicha mutación o mutaciones diseñadas están en posiciones determinadas dentro de dicha enzima, en donde dicha levadura produce cantidades aumentadas de escualeno en comparación con la levadura nativa, y en donde la levadura es una cepa de *Yarrowia lipolytica* que se selecciona del grupo que consiste en ATCC 90812, ATCC MYA-2613, o Yeastern polg.
2. Un método para producir escualeno mediante una levadura transformada genéticamente, comprendiendo dicho método el incremento o descenso de la actividad o expresión de una o más enzimas en la ruta de biosíntesis isoprenoide, dicha enzima o enzimas comprenden escualeno epoxidasa, donde dicha escualeno epoxidasa tiene una actividad y/o expresión reducida, en donde dicha actividad o expresión enzimática se aumenta o disminuye mediante una o más mutaciones diseñadas, en donde dicha mutación o mutaciones diseñadas están en posiciones determinadas dentro de dicha enzima, en donde dicha levadura transformada genéticamente produce cantidades aumentadas de escualeno en comparación con la levadura nativa y, en donde la levadura es una cepa de *Yarrowia lipolytica* que se selecciona del grupo que consiste en ATCC 90812, ATCC MYA-2613, o Yeastern polg.
3. Las composiciones o métodos según la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha levadura transformada genéticamente se deriva de una levadura oleaginosas.
4. Las composiciones o métodos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprenden además una enzima modificada que se selecciona del grupo que consiste en acetil-CoA carboxilasa ("ACCasa"), HMG-CoA reductasa, escualeno sintasa, ATP citrato liasa, ATP citrato sintasa, mevalonato quinasa, glicerol quinasa y 5-aminolevulinato sintasa.
5. Las composiciones o métodos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha actividad o expresión se reduce al 90%; o 80%; o 70%; o 60%; o 50%; o 40%; o 30%; o 20%; o 10%; o 5% de la actividad o expresión de la levadura nativa correspondiente.
6. Las composiciones o métodos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha actividad o expresión está entre 90-95%; o 80-90%; o 70-80%; o 60-70%; o 50-60%; o 40-50%; o 30-40%; o 20-30%; o 10-20%; o 5-10%; o 2-5% de la actividad o expresión de la levadura nativa correspondiente.
7. Las composiciones o métodos de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la levadura es la cepa Yeastern polg de *Yarrowia lipolytica*.
8. Las composiciones o métodos de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde un agente antifúngico está presente en la composición o se añade a la levadura en el método; o en donde un agente antifúngico está presente en la composición o se añade a la levadura en el método a una concentración entre 0,5 a 100 µg/ml, entre 1 a 25 µg/ml, o entre 10 a 15 µg/ml.
9. Las composiciones o métodos de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde un agente antifúngico está presente en la composición o se añade a la levadura en el método; y en donde el agente antifúngico es un agente antifúngico de alilamina; o en donde un agente antifúngico está presente en la composición o se añade a la levadura en el método; y en donde el agente antifúngico es un agente antifúngico de alilamina a una concentración entre 0,5 a 100 µg/ml, entre 1 a 25 µg/ml, o entre 10 a 15 µg/ml.
10. Las composiciones o métodos de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde un agente antifúngico está presente en la composición o se añade a la levadura en el método; y en donde el agente antifúngico es terbinafina, o es terbinafina a una concentración entre 0,5 a 100 µg/ml, entre 1 a 25 µg/ml, o entre 10 a 15 µg/ml.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho método el cultivo de dicha levadura con un agente antifúngico; en donde la levadura es la cepa Yeastern polg de *Yarrowia lipolytica* y en donde el agente antifúngico es terbinafina.
12. El método de la reivindicación 11, en donde el agente antifúngico es terbinafina a una concentración de 12,5 µg/ml o más.