

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 916**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

**C12P 33/00** (2006.01)

**C12N 9/04** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2012 PCT/EP2012/061601**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12175453**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2012 E 12728522 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2723868**

54 Título: **Procedimiento para preparar levaduras genéticamente transformadas capaces de producir una molécula de interés con un título elevado**

30 Prioridad:

**21.06.2011 FR 1155462**

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

**30.10.2017**

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)  
54, rue La Boétie  
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BROCARD-MASSON, CORINNE;  
BONNIN, ISABELLE y  
DUMAS, BRUNO**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 639 916 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para preparar levaduras genéticamente transformadas capaces de producir una molécula de interés con un título elevado

5 El objeto de la presente invención es un procedimiento para preparar una levadura genéticamente modificada mediante integración de múltiples copias de al menos cuatro casetes de expresión, que permite la producción de hidrocortisona con un título elevado. El objeto de la presente invención son levaduras transformadas según dicho método, y el uso de las mismas para producir hidrocortisona.

Producción de proteínas recombinantes

10 La levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* se seleccionó como un organismo hospedante para producir proteínas recombinantes debido a sus características de célula eucariota relacionadas con esos mamíferos, incluyendo modificaciones post-traduccionales de las proteínas sintetizadas, tales como acetilación, fosforilación y glicosilación, pero también debido a la facilidad con la que se puede manipular genéticamente, la disponibilidad de su secuencia genómica, el control de los procedimientos de fermentación a gran escala para microorganismos de este tipo, y la ausencia de peligro para seres humanos, animales o plantas (clasificada como GRAS, Generalmente Reconocida como Segura). Estas características le han hecho un organismo de elección ampliamente usado en la industria del procesamiento de alimentos, y más recientemente en el campo farmacéutico.

15 *Saccharomyces cerevisiae* se puede usar para producir compuestos de usos industriales variados en virtud de su capacidad para sintetizar diversos metabolitos en el estado natural, tales como enzimas, ácidos orgánicos, polisacáridos, o compuestos organolépticos. En particular, se puede usar una variedad de ácidos grasos y esteroides endógenos para producir agentes cosmetológicos y farmacéuticos tales como provitamina D2 producida a partir de ergosterol. Los compuestos esterólicios endógenos también son precursores de moléculas heterólogas que se pueden obtener tras la manipulación genética de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Los ejemplos incluyen taxadien-5-acetoxi-10-ol, un precursor de taxol, ácido artemisinico, un compuesto que es parte de la composición de un agente antimalárico, y hormonas esteroideas.

25 Producción de hidrocortisona en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

La hidrocortisona sigue siendo, más de cincuenta años después de que se puso por primera vez en el mercado, una molécula terapéutica que se usa por sus propiedades antiinflamatorias o como un intermedio de síntesis para sustancias esteroideas derivadas.

30 La producción de esteroides está asociada actualmente con procedimientos de extracción o síntesis caros y contaminantes que comprenden una etapa de bioconversión y varias etapas de síntesis química. Se ha buscado el desarrollo de un procedimiento alternativo, que sea más barato.

35 El desarrollo de tal procedimiento se inició en la década de 1990. Implica usar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificada. La prueba del concepto se demostró en 1999, y se confirmó subsiguientemente (documento WO02/061109; Ménard Szczebara et al., 2003). Las levaduras se modificaron para expresar varias proteínas heterólogas y para inactivar varias proteínas endógenas a fin de eliminar reacciones parásitas. Estas cepas de levadura modificada son capaces de producir, mediante fermentación a partir de una fuente carbonosa simple, hidrocortisona vía la ruta biosintética de mamíferos reconstituida en este organismo (Brocard-Masson y Dumas, 2006; Dumas B. et al., 2006).

40 El documento WO02061109 se refiere a cepas de levaduras genéticamente modificadas que producen de forma autónoma esteroides a partir de una fuente de carbono simple, y también se refiere a un método para producir esteroides a partir de dichas cepas de levadura. Sin embargo, estas primeras cepas mostraron una baja capacidad para producir hidrocortisona, y por lo tanto no satisficieron los requisitos de una producción industrial.

Métodos de transformación de levaduras

45 Una estrategia para incrementar la productividad de las cepas es mejorar los procedimientos de transformación para introducir genes heterólogos en una célula de levadura. Los procedimientos de transformación van acompañados típicamente de una selección, según un método adecuado, de los mejores transformantes.

50 Entre los procedimientos convencionales para la transformación de cepas de levaduras, se puede hacer mención en particular de los propuestos por Ito et al. (1983), o por Klebe et al. (1983). En el caso particular de la transformación con fragmentos de ADN lineal, se usará preferentemente una técnica de transformación de esferoplastos, tal como la propuesta por Becker y Lundblad (2001).

A fin de incrementar la expresión proteica, una estrategia es introducir varias copias de un gen de interés en una cepa de levadura. Típicamente, los vectores de levadura son plásmidos que se replican de forma autónoma que contienen un gen que codifica un marcador seleccionable, así como un origen de replicación de levadura de tipo 2  $\mu\text{m}$  (Broach, 1983). El origen de tipo 2  $\mu\text{m}$  permite que estén presentes múltiples copias del plásmido en cada célula.

Para mantener el plásmido en la célula, se usa presión selectiva (es decir, las células se cultivan en un medio químicamente definido de tal manera que solamente pueden crecer las células que portan el plásmido que posee el marcador selectivo).

5 Sin embargo, el uso de vectores que se replican de forma autónoma, de copias elevadas, no es aplicable para ciertos procedimientos de producción industriales que usan materias primas complejas. Además, el número de genes que se puede clonar en tal vector plasmídico está limitado generalmente a dos o tres casetes de expresión, debido a que el tamaño del plásmido afecta a la eficiencia de la transformación y replicación.

10 Otra estrategia se ha descrito por Lopes et al. (1989 y 1991). Consiste en la construcción de un vector de integración múltiple, denominado pMIRY2, por Múltiple Integración en el ADN Ribosómico de Levadura, que selecciona como diana el ADN ribosómico (ADNr) del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. El gen de interés a expresar, portado por el plásmido pMIRY2, se inserta en el ADN ribosómico compuesto de aproximadamente 100 a 200 unidades repetidas en tándem ubicadas en el cromosoma XII. Se integra en el locus del ADNr inicialmente en un número bajo de copias, y entonces se puede amplificar aplicando una fuerte presión de selección (Lopes et al. 1991).

15 Sin embargo, el uso de múltiples copias integrantes de un plásmido en ADN ribosómico también tiene limitaciones: este método se ha descrito solamente para la introducción de un solo gen de interés acompañado de un marcador seleccionable.

En consecuencia, sería ventajoso combinar los beneficios de la introducción de múltiples copias de un gen vía un plásmido de replicación de 2  $\mu$ m con el de la integración estable de un gen vía un plásmido de integración, para permitir la coexpresión eficiente de varias proteínas.

20 Hemos mostrado que es posible obtener levaduras que producen títulos elevados de moléculas de interés adecuadas para la producción a escala industrial, mediante la integración de múltiples copias estables de al menos cuatro casetes de expresión para genes de interés. De este modo, usando la presente invención se puede lograr una expresión de nivel elevado de al menos cuatro genes diferentes, cada uno de los cuales está presente en múltiples copias.

25 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método simple y rápido para obtener levaduras que producen hidrocortisona con un título elevado tras la integración de múltiples copias estable de al menos cuatro casetes de expresión. La integración de múltiples copias permite, después de la selección de los mejores transformantes, la expresión en un nivel elevado de los transgenes de interés.

30 Tal método hace posible modificar una levadura proporcionándola con diversos genes de la misma ruta metabólica o de diferentes rutas metabólicas. Así modificada, la levadura adquiere la capacidad para convertir moléculas endógenas o sustratos exógenos en un producto de interés. Tal levadura transformada se puede usar por lo tanto como una herramienta biológica personalizada para producir moléculas de interés, incluyendo proteínas recombinantes.

35 Una materia objeto según la invención es una levadura que expresa 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), esteroide 11 $\beta$ -hidroxilasa, también denominada P450c11 (CYP11B1), citocromo P450 de escisión de la cadena lateral (o P450scc) (CYP11A1) y adrenodoxina (ADX), obtenida aplicando el procedimiento según la invención. Para convertir esteroides endógenos en hidrocortisona se puede usar una levadura que expresa esteroide  $\Delta$ 7-reductasa, esteroide 17 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP17A1), y esteroide 21-hidroxilasa (CYP21A1), además de los cuatro genes mencionados anteriormente.

40 Más específicamente, el aislado de levadura según la presente invención produce al menos 100 mg/l de hidrocortisona.

Descripción detallada de la invención

45 El objeto de la presente invención es un procedimiento para preparar levaduras genéticamente transformadas que producen un título elevado de hidrocortisona, que consiste en (i) la integración de múltiples copias estable de al menos cuatro casetes de expresión, seguido de (ii) la selección de las levaduras que son las mejores productoras.

La etapa de la integración de múltiples copias estable de al menos 4 casetes de expresión según la invención se basa en la cotransformación de dos plásmidos de integración que comprenden cada uno al menos dos casetes de expresión para transgenes de interés, y, opcionalmente, un marcador seleccionable.

50 La frase "casete de expresión", también denominado "transgén", pretende incluir secuencias de ADN endógenas que se encuentran en la cepa de levadura que se está transformando, secuencias de ADN exógenas que no se encuentran en la cepa de levadura que se está transformando, así como secuencias de ADN heterogéneas, que combinan secuencias de ADN endógenas y exógenas. El casete de expresión puede incluir elementos de flaqueo necesarios para la expresión del gen, incluyendo un promotor y/o un terminador. A fin de asegurar una buena

- expresión en la levadura, los promotores o terminadores se pueden seleccionar de secuencias que se originan a partir de la levadura. Los promotores que se pueden usar incluyen promotores derivados de genes implicados en la glicolisis, tales como: el promotor del gen *PGK* (que codifica 3-fosfoglicerato cinasa), el promotor del gen *GAPDH* (*TDH3*) (que codifica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), el promotor del gen *ADH1* (que codifica alcohol deshidrogenasa 1), el promotor del gen *ENO1* (que codifica enolasa 1), o el promotor del gen *TPI1* (que codifica triosa fosfato isomerasa).
- También se pueden usar promotores inducibles, incluyendo: un promotor de uno de los genes *GAL* regulados por galactosa o el promotor híbrido *GAL10/CYC1*, el promotor del gen *CYC1* (que codifica iso-1-citocromo c, un transportador de electrones mitocondrial), que es regulado con oxígeno y reprimido por glucosa, el promotor reprimible por metionina del gen *MET25* (que codifica O-acetilhomoserina (tio)liasa), el promotor inducible por metionina del gen *MET3* (que codifica ATP sulfurilasa), el promotor inducible por cobre del gen *CUP1* (que codifica quelatina de cobre), y los promotores de los genes *CTR1* y *CTR3* (que codifican transportadores de cobre a través de la membrana), que son reprimidos por cobre en concentración elevada e inducidos por cobre a concentración baja.
- También se puede usar el promotor del gen *TEF1* (que codifica un factor de elongación de la transcripción), y el promotor del gen *PMA1* (que codifica una ATPasa transportadora de protones a través de la membrana).
- Los terminadores que se pueden usar incluyen *NCP1*, *PGK*, *ADH1*, así como otros terminadores endógenos de levadura.
- El término “marcador” pretende significar cualquier marcador seleccionable que se puede usar en levadura, por ejemplo marcadores auxotróficos tales como *URA3*, *ADE2*, *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* o *LYS2*, y marcadores de resistencia, tales como *natMX*, para resistencia a nourseotricina, el gen *hphMX* para resistencia a higromicina, o el gen *KanMX* para resistencia a geneticina (G418).
- Tales marcadores pueden estar presentes en los plásmidos a fin de asegurar la transformación con éxito de la cepa por dicho plásmido. Los marcadores auxotróficos permiten la selección de la expresión del gen marcador seleccionable, haciendo posible eliminar levaduras que pierden este plásmido.
- La expresión “origen de replicación” quiere decir una secuencia que permite que el plásmido sea reconocido y replicado por la levadura aunque esté presente en la levadura en forma circular. En la levadura se puede usar un origen de replicación de tipo  $2\mu$  que se origina a partir de plásmidos circulares endógenos extracromosómicos de levadura, o el origen de replicación *ARS CEN*, compuesto de una de las secuencias del origen de replicación *ARS* cromosómicas y de una de las secuencias centroméricas *CEN*.
- Un casete de expresión se puede introducir en la levadura vía un plásmido de integración o vía un plásmido de replicación autónoma.
- La expresión “plásmido de integración” quiere decir el uso de secuencias de ADN que comprenden preferiblemente un marcador seleccionable y al menos un casete de expresión para un gen o genes de interés. Los plásmidos de integración se linealizan antes de que se transformen en la levadura, permitiendo que sus secuencias se inserten en regiones del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.
- La expresión “plásmido de replicación autónoma” quiere decir un sistema de expresión que comprende: un origen de replicación de levadura de tipo  $2\mu$ , uno o dos marcadores seleccionables, y al menos un casete de expresión para un gen o genes de interés. Después de la transformación en levadura, este tipo de vector sigue siendo extracromosómico en forma de un ADN circular bicatenario, que se replica de forma autónoma en el núcleo de la levadura (en otras palabras, no se integra en el genoma de la levadura).
- El procedimiento descrito por los inventores se basa en la transformación simultánea de una cepa de levadura con al menos dos plásmidos de integración diferentes. Por lo tanto, se denomina como una “cotransformación”. Este procedimiento tiene la ventaja de ser simple y rápido, puesto que la integración de múltiples copias se lleva a cabo en una sola etapa.
- La expresión “integración de múltiples copias” quiere decir la integración de al menos dos copias de la misma secuencia. El número de copias que se integran cuando se lleva a cabo el procedimiento como se describe puede variar de 2 a 20, preferiblemente de 5 a 20, incluso más preferiblemente de 8 a 12.
- La segunda etapa del procedimiento según la invención consiste en la selección de los mejores transformantes, a saber, aquellos que expresan hidrocortisona con el mejor título. Se lleva a cabo en dos etapas.
- En la primera etapa del procedimiento de selección, se seleccionan las cepas que tienen integrados los transgenes en su genoma, ya sea a través de detección de la presencia de los casetes de expresión, o mediante observación fenotípica del marcador seleccionable cuando está presente tal marcador. Se selecciona un número suficiente de transformantes. Un número suficiente es al menos hasta 30 clones; en una realización, se seleccionan al menos 40 clones; en otra realización, se seleccionan al menos 50 clones. Esto es debido a que se ha demostrado que el nivel

5 de productividad es muy heterogéneo en la población de transformantes obtenida por medio del procedimiento según la invención. En consecuencia, a fin de permitir la selección de clones muy productivos, es necesario comenzar a partir de una población bastante grande. La selección de solamente alrededor de diez clones, o menos, como se hace convencionalmente, no optimiza la selección de los mejores productores. Este aspecto se demuestra en los Ejemplos.

En la segunda etapa del procedimiento de selección, las cepas mejor productoras se seleccionan usando un ensayo que generalmente será un ensayo funcional.

10 Este ensayo funcional se basa típicamente en la productividad de las cepas y en la pureza de la hidrocortisona producida. De hecho, estos dos criterios son indisociables cuando se busca seleccionar una cepa que tiene las propiedades necesarias para su industrialización.

La expresión "productividad de la cepa" quiere decir su capacidad de producir grandes cantidades de una molécula o moléculas de interés.

15 La expresión "pureza de la molécula de interés producida" quiere decir la producción de molécula de interés producida con respecto a intermedios o impurezas asociados con su producción como subproductos. La molécula de interés debe ser capaz de ser separada de estos productos.

20 Tal ensayo funcional se puede llevar a cabo según las técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Para cuantificar la producción de una molécula de interés, los transformantes de levadura se pueden cribar usando un ensayo apropiado, incluyendo transferencia Western, ensayos ELISA, ensayos colorimétricos, ensayos microbiológicos, cromatografías de líquidos o de gases, etc. Para cuantificar la producción de una enzima, se puede evaluar la actividad enzimática en el medio de cultivo. La pureza se puede evaluar típicamente por medio de ensayos cromatográficos.

25 Los mejores transformantes obtenidos por medio del método según la invención tienen una productividad que es mayor en al menos +30% en comparación con la del mejor transformante obtenido por medio del método convencional de transformación con un plásmido de replicación autónoma. Esta ganancia en la productividad es muy significativa desde un punto de vista industrial, aún más ventajosa puesto que la calidad en términos de pureza es equivalente a la obtenida con una transformación convencional.

30 Los análisis estadísticos llevados a cabo en las poblaciones de transformantes han mostrado que la cotransfección de al menos dos plásmidos de integración es un suceso relativamente raro. Desde un punto de vista práctico, esto significa que es necesario cribar una gran población a fin de identificar las cepas transformadas que tienen los niveles más elevados de producción, es decir, títulos más elevados.

Una investigación molecular ha demostrado que la integración tiene lugar en múltiples copias, y que dicha integración es estable.

35 El procedimiento según la invención hace posible por lo tanto resolver un problema frecuentemente encontrado, a saber, que es difícil obtener productores de gran cantidad de hidrocortisona. La solución consiste en proponer un procedimiento simple y rápido que permita la integración estable de varios transgenes en la misma levadura.

Hemos descrito que el presente procedimiento se puede usar para introducir genes que son endógenos, o genes que son endógenos con respecto a la levadura, dependiendo del objetivo deseado.

Tales aplicaciones incluyen

40 (i) la biosíntesis, mediante una levadura a partir de una fuente de carbono simple, tal como glucosa o etanol, de enzimas que son parte de una ruta metabólica, que es

- endógena cuando dichas enzimas son limitantes; a título de ejemplo, HMG1 y ERG1 para la producción de esteroides o precursores de esteroides,
- o exógena mediante combinación de transgenes a fin de generar una nueva ruta metabólica; a título de ejemplo, CYP71A1 para la producción de ácido artemisínico, o taxoide hidroxilasas dependientes de citocromo P450 para la producción de taxoides.

Este sistema también se describe como aplicable a la producción mediante bioconversión;

(ii) la producción directa de proteínas recombinantes como molécula de interés; a título de ejemplo, cualquier proteína que se desee producir a nivel elevado, tal como invertasa, etc., o proteínas capaces de interactuar entre sí, tales como las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas.

50 Este método se puede aplicar a diversas cepas de levaduras, en particular *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis*.

En una realización preferida, el procedimiento descrito previamente se aplica a la producción de esteroides/hidro cortisona. Para hacer esto, el primer plásmido comprende un casete de expresión para las enzimas 3 $\beta$ -HSD y P450c11, y el segundo plásmido comprende un casete de expresión para las enzimas P450scc y ADX; los transformantes que han integrado los cuatro transgenes se seleccionan por su capacidad para producir esteroides/hidro cortisona. La productividad se mide directamente en la cantidad de hidro cortisona producida, y la evaluación de la pureza se basa en el porcentaje de hidro cortisona con respecto a los esteroides totales.

En los ejemplos que siguen se describe la preparación de las cepas productoras de hidro cortisona.

Cualquier objeto de la invención consiste en las cepas transformadas productoras de hidro cortisona obtenidas directamente por medio del procedimiento según la invención.

La presente invención también se refiere al uso de las cepas para producir hidro cortisona, y también a un método para producir hidro cortisona que consiste en cultivar las cepas transformadas según la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Histograma de la distribución de las cepas BYM 16 transformadas con el plásmido de replicación autónoma pFM10.

Figura 2: Histograma de la distribución de las cepas BYM 16 transformadas con los plásmido de integración replicativa pFM7 y pCB12.

Figura 2: Histograma de la distribución de las cepas BYM 16 transformadas con los plásmido de integración replicativa pFM7 y pBXL1505.

Figura 4: Perfiles cromosómicos de la cepa parental (línea 2) y de dos prototipos que producen hidro cortisona (líneas 3 y 4), en comparación con la cepa de tipo salvaje (líneas 1 y 5).

Figura 5: Principio de transferencia Southern. A. Integración de una sola copia. B. Integración de múltiples copias en tándem. x: La señal corresponde a una copia. y: Señal característica del fragmento insertado que corresponde a una integración de múltiples copias, siendo la fortaleza de la señal proporcional al número de copias insertadas.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Obtención de levaduras genéticamente modificadas capaces de producir hidro cortisona tras la transformación con un plásmido de replicación autónoma

a – Descripción del plásmido de replicación autónoma

El plásmido pFM10 tiene cuatro casetes de expresión y dos marcadores seleccionables “auxotróficos”: un casete de expresión para el gen heterólogo de P450scc de origen bovino (CYP11A1) en su forma madura, es decir, sin secuencia seleccionadora mitocondrial; un casete de expresión para el gen heterólogo de ADX de origen bovino en su forma madura; un marcador seleccionable “auxotrófico” *URA3*; un casete de expresión para el gen heterólogo de 3 $\beta$ HSD de origen bovino; un casete de expresión para el gen heterólogo quimérico de P450c11 (CYP11B1); y un marcador seleccionable “auxotrófico” *ADE2*. El plásmido pFM10 también contiene dos secuencias cortas, R1 y R2, de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID No.1 y SEQ ID No.2, respectivamente).

b – Transformación del plásmido

Preparación del plásmido: El plásmido pFM10, que carece de un origen de replicación para *E. coli*, se preparó mediante amplificación en la cepa w303 de *S. cerevisiae*. El plásmido se extrajo y se purificó a partir de la cepa w303 de pFM10, que se había pretratado para obtener esferoplastos, usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para la manipulación de *S. cerevisiae*, como se describe por Becker y Lundblad (2001).

Para verificar la eficiencia y la calidad de esta extracción, se usó una amplificación mediante PCR con oligonucleótidos específicos para el gen heterólogo de 3 $\beta$ HSD (SEQ ID No.3 y SEQ ID No.4).

Transformación: La cepa BYM16, que es auxotrófica para adenina y uracilo, se transformó con el plásmido circular pFM10 por medio de un método convencional para transformar *S. cerevisiae*, que da como resultado una buena eficiencia de la transformación.

c – Selección de las cepas transformadas

Cribado primario: Este cribado de selección directa consiste en seleccionar las cepas transformadas en un medio selectivo, es decir, un medio que carece de los componentes para los que la levadura es auxotrófica. Es necesario tener un número significativo de al menos 30 transformantes a fin de llevar a cabo el cribado secundario.

Consiste en amplificar el gen heterólogo de 3 $\beta$ HSD mediante PCR con oligonucleótidos específicos (SEQ ID No. 3 y SEQ ID No. 4), es decir, usando radiografía con una sonda específica para el gen de 3 $\beta$ HSD (SEQ ID No. 8). Este cribado requiere tener un número significativo de al menos 500 a 1000 cepas transformadas seleccionadas en medio mínimo suplementado con adenina.

5 Cribado secundario "funcional": Después de una etapa de crecimiento en medio selectivo, las cepas transformadas se evaluaron para determinar su nivel de producción de hidrocortisona en la escala de un matraz Erlenmeyer en medio "Käppeli", que contiene glucosa y etanol como fuentes de carbono. Después de 3 días de incubación a 30°C con agitación, se añadió etanol al 2%. La incubación se continuó hasta 7 días.

10 Se evaluaron 50 cepas transformadas a fin de llevar a cabo un estudio estadístico del nivel de producción de hidrocortisona, y para permitir la selección de los mejores productores según su nivel de producción de hidrocortisona y porcentaje de hidrocortisona con respecto a esteroides totales.

Al final de la producción, la concentración de hidrocortisona y de esteroides intermedios se midió por medio de un método de HPLC adecuado.

15 Los mejores candidatos se seleccionaron basándose en los criterios de (1) productividad elevada de hidrocortisona, y (2) bajo nivel de impurezas de esteroides, que son las características requeridas para la explotación industrial de la cepa desde un punto de vista normativo.

d – Resultado de la caracterización funcional de las cepas obtenidas por medio del procedimiento según el Ejemplo 1

El plásmido de replicación autónoma pFM10 se extrajo de la cepa de pFM10 w303.

20 Usando esta preparación, se transformó la cepa BYM16. Las cepas transformadas se seleccionaron aplicando el cribado primario, y 50 de estas cepas se evaluaron para determinar su nivel de producción de hidrocortisona aplicando el cribado secundario.

Los resultados se presentan en la Figura 1. El título de hidrocortisona promedio observado fue 43 mg/l para una dispersión de 142%.

25 La mejor cepa productora mostró una producción de 79 mg/l y un porcentaje de hidrocortisona de 89%, cumpliendo los criterios de una cepa industrializable, a saber, una productividad elevada y un nivel bajo de impurezas de esteroides.

### **Ejemplo 2: Obtención de levaduras genéticamente modificadas capaces de producir hidrocortisona tras la transformación con plásmidos de integración**

30 a – Descripción de los plásmidos de integración

Se pueden introducir simultáneamente dos plásmidos de integración en el genoma de *S. cerevisiae*, haciendo posible que cada uno exprese al menos dos genes heterólogos.

En la presente invención, los plásmidos usados fueron:

El plásmido pFM7, el plásmido pCB12 y el plásmido pBXL1505.

35 El plásmido pFM7 tiene un casete de expresión para el gen heterólogo de P450scc de origen bovino (CYP11A1) en su forma madura, un casete de expresión para el gen heterólogo de ADX de origen bovino en su forma madura, y también un marcador seleccionable auxotrófico *URA3* (Duport et al., 1998).

40 El plásmido pCB12 tiene un casete de expresión para el gen heterólogo de 3 $\beta$ HSD de origen bovino, un casete de expresión para el gen heterólogo químérico de P450c11 (CYP11B1), y también un marcador seleccionable auxotrófico *ADE2* (Dumas et al., 1996).

El plásmido pBXL1505 deriva del plásmido pCB12; el marcador seleccionable *ADE2* se ha truncado para inactivarlo.

Se puede usar sin distinción cualquiera de los plásmidos pCB12 y pBXL1505.

b – Cotransformación de los plásmidos

45 Preparación de los plásmidos: Los plásmidos pFM7, pCB12 y pBXL1505, que tienen un origen de replicación para *E. coli*, se prepararon mediante amplificación en *E. coli* y extracción/purificación, según los métodos habituales implementados por los expertos en la técnica (Sambrook et al., 1989).

El plásmido pFM7 se escindió mediante una enzima de restricción *Aat II* para linealizarlo. Se obtuvo así un solo fragmento de ADN lineal bicatenario de 10,5 kb que comprende un casete de expresión para el gen heterólogo de P450scc de origen bovino (CYP11A1) en su forma madura, un casete de expresión para el gen heterólogo de ADX

de origen bovino en su forma madura, y también un marcador seleccionable *URA3* y dos secuencias R1 y R2 (Duport et al., 1998).

El plásmido pCB12 se escindió mediante una enzima de restricción *BamHI*. Se obtuvieron dos fragmentos de ADN lineal bicatenario:

- 5
- un fragmento de 2,7 kb,
  - un fragmento de 9,3 kb de interés, que contiene un casete de expresión para el gen heterólogo de 3 $\beta$ HSD de origen bovino, un casete de expresión para el gen heterólogo quimérico de P450c11 (CYP11B1), un marcador seleccionable *ADE2*, y también dos secuencias R1 y R2 (Dumas et al., 1996).

10 El fragmento de ADN de 9,3 kb se purificó según técnicas de biología molecular convencionales tras el aislamiento del producto de la restricción enzimática mediante electroforesis en gel de agarosa.

En un experimento, se usó el plásmido pBXL1505 en lugar del plásmido pCB12. El tratamiento con enzimas de restricción fue idéntico, y se obtuvieron los siguientes fragmentos:

- 15
- un fragmento de 2,7 kb,
  - un fragmento de 8,1 kb de interés, que comprende un casete de expresión para el gen heterólogo de 3 $\beta$ HSD de origen bovino, un casete de expresión para el gen heterólogo quimérico de P450c11 (CYP11B1), una secuencia truncada del marcador *ADE2*, y también dos secuencias R1 y R2.

Transformación: En un primer conjunto de experimentos, una cepa que muestra auxotrofia doble para adenina y uracilo, se contrató con los siguientes ADN:

- 20
- el fragmento de ADN lineal de 10,5 kb del plásmido pFM7, y
  - el fragmento de ADN lineal de 9,3 kb derivado del plásmido pCB12.

En este caso, la cepa se hizo prototrófica.

En un segundo conjunto de experimentos, una cepa que muestra auxotrofia doble para adenina y uracilo se cotransformó con los siguientes ADN:

- 25
- el fragmento de ADN lineal de 10,5 kb del plásmido pFM7, y
  - el fragmento lineal de 8,1 kb derivado del plásmido pBXL1505.

En este caso, la cepa siguió siendo auxotrófica para adenina.

Este método de cotransformación hace posible introducir simultáneamente cuatro casetes de expresión.

c – Selección de las cepas transformadas

30 La selección de las cepas productoras de los títulos más elevados de hidrocortisona se llevó a cabo como se describió en el Ejemplo 1, c.

Para el cribado primario, en el caso particular de la cotransformación con un fragmento de ADN lineal derivado del plásmido pBXL1505 y un fragmento de ADN lineal del plásmido pFM7, esta etapa de selección consiste en seleccionar las cepas en un medio selectivo suplementado con adenina y libre de uracilo, y requiere un cribado adicional a fin de seleccionar la integración del fragmento lineal de pBXL1505.

35 d – Resultados de la caracterización funcional de las cepas

Cotransformación de la cepa BYM16 con los plásmidos de integración pFM7 y pCB12:

Se seleccionaron 36 cepas cotransformadas con el plásmido pFM7 linealizado y el fragmento de 9,3 kb del plásmido pCB12 aplicando el cribado primario, y estas 36 cepas se evaluaron para determinar la producción de hidrocortisona aplicando el cribado secundario.

40 Los resultados se presentan en la Figura 2. Muestran que el título promedio de hidrocortisona observado fue 28 mg/l para una dispersión de 212%.

La mejor cepa productora mostró una producción de 103 mg/l de hidrocortisona y un porcentaje de hidrocortisona de 85%, satisfaciendo los criterios de una cepa industrializable, a saber, productividad elevada y nivel bajo de impurezas de esteroides. Se denomina Cepa A.

Cotransformación de la cepa BYM16 con los plásmidos de integración pFM7 y pBXL1505

Se seleccionaron 74 cepas cotransformadas con el plásmido pFM7 linealizado y el fragmento de 8,1 kb del plásmido pBXL1505 aplicando el cribado primario, y estas 74 cepas se evaluaron para determinar la producción de hidrocortisona aplicando el cribado secundario.

- 5 Los resultados se presentan en la Figura 3. Muestran que el título promedio de hidrocortisona observado fue 20 mg/l para una dispersión de 344%.

La mejor cepa productora mostró una producción de 110 mg/l de hidrocortisona y un porcentaje de hidrocortisona de 85%, satisfaciendo los criterios de una cepa industrializable, a saber, productividad elevada y nivel bajo de impurezas de esteroides. Se denomina Cepa B.

- 10 Se observó que las mejores productoras obtenidas por medio del procedimiento según la invención resultan de la combinación de los plásmidos como se usan en este ejemplo. Estas cepas comprenden por lo tanto la mejor combinación genética entre las combinaciones de plásmidos ensayadas.

**Ejemplo 3: Comparación de las cepas transformadas**

- 15 Las mejores cepas que resultan de las cotransformaciones, Cepa A y Cepa B, citadas en el Ejemplo 2, d, mostraron niveles de producción de hidrocortisona que fueron al menos +30% mayores en comparación con la mejor cepa transformada con el plásmido de replicación autónoma pFM10, citado en el Ejemplo 1.

**Ejemplo 4: Investigaciones moleculares de las cepas productoras de los títulos más elevados de hidrocortisona**

- 20 A fin de caracterizar el genotipo de las mejores cepas productoras transformadas con los plásmidos de integración pFM7 y pCB12 (Cepa A) o los plásmidos de integración pFM7 y pBXL1505 (Cepa B), se aplicaron dos métodos:

1. Hibridación de cromosomas separados mediante electroforesis de campo pulsado,
2. Hibridación de fragmentos de ADN genómico, denominada técnica de transferencia Southern.

1. Hibridación de cromosomas separados mediante electroforesis de campo pulsado

- 25 Es posible verificar la integración de un gen, y también localizarlo, por medio de una hibridación en cromosomas completos. Esto implica separar los cromosomas usando la técnica "CHEF" (Campos Eléctricos Homogéneos de Contornos Limitados), seguido de la hibridación específica para los casetes de expresión integrados (Maule 1994).

- 30 Para analizar la Cepa A o Cepa B, se construyó mediante amplificación por PCR una sonda específica para el casete de expresión de P450scc (SEQ ID No. 7) del plásmido de integración pFM7 y una sonda específica para el casete de expresión de 3βHSD (SEQ ID No. 8) para los plásmidos de integración pCB12 o pBXL1505, y entonces se radiomarcaron con dCTP-α-<sup>32</sup>P.

- 35 Esta técnica reveló que el fragmento de ADN que contiene el casete de expresión de P450scc, y también el fragmento de ADN que contiene el casete de expresión de 3βHSD, estaban ubicados en el cromosoma XII o IV (comigración) en las cepas A (Figura 4, línea 3) y B (Figura 4, línea 4). Estas cepas muestran una sola banda en la región de los cromosomas IV y XII. En comparación, las cepas no productoras de hidrocortisona, a saber, la cepa de tipo salvaje (Figura 4, líneas 1 y 5), y la cepa parental (Figura 4, línea 2), muestran un perfil de migración con dos bandas. Por lo tanto, estas características diferenciales hacen posible establecer una huella genética específica común a las cepas según la invención que son capaces de producir hidrocortisona.

2. Hibridación mediante transferencia Southern

- 40 La transferencia Southern hace posible detallar la presencia de una secuencia de ADN endógena o exógena en ADN genómico parcialmente escindido con enzimas de "restricción". Este señalamiento se realiza mediante hibridación de esta secuencia con una sonda específica marcada (Southern, 1975).

Dependiendo del tipo de restricción enzimática aplicado al ADN genómico, es posible revelar la manera en la que se integra esta secuencia: una única integración, múltiples integraciones en diversas regiones o loci del genoma, o múltiples integraciones en tándem en un único locus (Figura 5).

- 45 A fin de caracterizar las cepas sobreproductoras, se usó una sonda específica para el casete de expresión de P450scc (SEQ ID No.7) y una sonda específica para el casete de expresión de 3βHSD (SEQ ID No.8). Los ADN genómicos extraídos de estas cepas se escindieron con HpaI a fin de revelar la presencia del casete de expresión de 3βHSD, o con EcoRV a fin de revelar la presencia del casete de expresión de P450scc (véase la Figura 5).

- 50 Esta técnica reveló que el fragmento de ADN que contiene el casete de expresión de P450scc, y también fragmento de ADN que contiene el casete de expresión de 3βHSD, se integraron en un tándem de al menos diez copias.

## ES 2 639 916 T3

Estos perfiles de integración se observaron en varios descendientes de las mejores productoras, y demostraron ser idénticos. Por lo tanto, estas integraciones son genéticamente estables.

Por lo tanto, estas integraciones múltiples aleatorias confieren tanto estabilidad a las cepas como una ganancia en función en términos de producción de hidrocortisona.

### 5 Descripción del material biológico usado

Lista de los plásmidos descritos en la presente solicitud

[pFM7: ori *E.coli* ori 2 $\mu$  levadura R1  $P_{Gal10/CYC1}$ -matADXbov- $T_{PGK1}$  URA3  $P_{Gal10/CYC1}$ -P450sccbov- $T_{PGK1}$  R2]

[pCB12: ori *E.coli* R2  $P_{CYC1}$ -P450c11híbrido- $T_{PGK1}$  ADE2  $P_{TDH3}$ -3 $\beta$ HSDbov- $T_{PGK1}$  R1]

[pBXL1505: ori *E.coli* R1  $P_{TDH3}$ -3 $\beta$ HSDbov- $T_{PGK1}$  ade2  $P_{CYC1}$ -P450c11híbrido- $T_{PGK1}$  R2]

10 [pFM10: ori 2 $\mu$  levadura R1  $P_{Gal10/CYC1}$ -matADXbov- $T_{PGK1}$  URA3  $P_{Gal10/CYC1}$ -P450sccbov- $T_{PGK1}$  R2  $P_{CYC1}$ -P450c11híbrido- $T_{PGK1}$  ADE2  $P_{TDH3}$ -3 $\beta$ HSDbov- $T_{PGK1}$ ]

Lista de las cepas descritas en la presente solicitud

◦ BYM16

Genotipo

15 *MATa*, *ura3-52*, *LEU2::P<sub>CYC1</sub>-ARH1-T<sub>PGK1</sub>*, *TRP1::P<sub>TDH3</sub>-c17bov-T<sub>NCP1</sub>-P<sub>TEF1</sub>-ADRbov-T<sub>PGK1</sub>*  
*ypr1::P<sub>TEF1</sub>-(c21humano)n-T<sub>PGK1</sub>*, *gcy1::P<sub>TDH3</sub>-c21humano-T<sub>PGK1</sub>*, *atf2::P<sub>TEF1</sub>-KanMX-T<sub>TEF1</sub>*,  
*ade2::P<sub>GAL10/CYC1</sub>-esterol  $\Delta$ 7REDArabidopsis-T<sub>PGK1</sub>*, *HIS3::P<sub>TEF1</sub>-c17bov-T<sub>PGK1</sub>-P<sub>TDH3</sub>-COXVI levadura ADXbov-T<sub>NCP1</sub>, gal80*

Fenotipo

20 a-materia Leu+ His+ Trp+ Ura- Ade- G418R

◦ BYM16 transformada con los plásmidos de integración pCB12 y pFM7

Genotipo

*MATa*, *ura3-52*, *LEU2::P<sub>CYC1</sub>-ARH1-T<sub>PGK1</sub>*, *TRP1::P<sub>TDH3</sub>-c17bov-T<sub>NCP1</sub>-P<sub>TEF1</sub>-ADRbov-T<sub>PGK1</sub>*  
*ypr1::P<sub>TEF1</sub>-(c21humano)n-T<sub>PGK1</sub>*, *gcy1::P<sub>TDH3</sub>-c21humano-T<sub>PGK1</sub>*, *atf2::P<sub>TEF1</sub>-KanMX-T<sub>TEF1</sub>*,  
25 *ade2::P<sub>GAL10/CYC1</sub>-esterol  $\Delta$ 7REDArabidopsis-T<sub>PGK1</sub>*, *HIS3::P<sub>TEF1</sub>-c17bov-T<sub>PGK1</sub>-P<sub>TDH3</sub>-COXVI levadura ADXbov-T<sub>NCP1</sub>, gal80*

Integración aleatoria en múltiples copias de: ( $P_{GAL10/CYC1}$ -ADX- $T_{PGK1}$ )*n*, ( $P_{GAL10/CYC1}$ -P450scc- $T_{PGK1}$ )*n*, ( $P_{TDH3}$ -3 $\beta$ HSD- $T_{NCP1}$ )*n*, ( $P_{CYC1}$ -P450c11híbrido- $T_{PGK1}$ )*n*, URA3*n*, ADE2*n*

Fenotipo

30 a-materia Leu+ His+ Trp+ Ura+ Ade+ G418R

◦ BYM16 transformada con los plásmidos de integración pBXL1505 y pFM7

Genotipo

*MATa*, *ura3-52*, *LEU2::P<sub>CYC1</sub>-ARH1-T<sub>PGK1</sub>*, *TRP1::P<sub>TDH3</sub>-c17bov-T<sub>NCP1</sub>-P<sub>TEF1</sub>-ADRbov-T<sub>PGK1</sub>*  
*ypr1::P<sub>TEF1</sub>-(c21humano)n-T<sub>PGK1</sub>*, *gcy1::P<sub>TDH3</sub>-c21humano-T<sub>PGK1</sub>*, *atf2::P<sub>TEF1</sub>-KanMX-T<sub>TEF1</sub>*,  
35 *ade2::P<sub>GAL10/CYC1</sub>-esterol  $\Delta$ 7REDArabidopsis-T<sub>PGK1</sub>*, *HIS3::P<sub>TEF1</sub>-c17bov-T<sub>PGK1</sub>-P<sub>TDH3</sub>-COXVI levadura ADXbov-T<sub>NCP1</sub>, gal80*

Integración aleatoria en múltiples copias de: ( $P_{GAL10/CYC1}$ -ADX- $T_{PGK1}$ )*n*, ( $P_{GAL10/CYC1}$ -P450scc- $T_{PGK1}$ )*n*, ( $P_{TDH3}$ -3 $\beta$ HSD- $T_{NCP1}$ )*n*, ( $P_{CYC1}$ -P450c11híbrido- $T_{PGK1}$ )*n*, URA3*n*, ade2*n*

Fenotipo

40 a-mater Leu+ His+ Trp+ Ura+ Ade- G418R

## ES 2 639 916 T3

- BYM16 transformada con el plásmido de replicación autónoma pFM10

### Genotipo

*MATa, ura3-52, LEU2::P<sub>CYC1</sub>-ARH1-T<sub>PGK1</sub>, TRP1::P<sub>TDH3</sub>-c17bov-T<sub>NCP1</sub>-P<sub>TEF1</sub>-ADRbov-T<sub>PGK1</sub>*

*ypr1::P<sub>TEF1</sub>-(c21humano)n-T<sub>PGK1</sub>, gcy1::P<sub>TDH3</sub>-c21human-T<sub>PGK1</sub>, atf2::P<sub>TEF1</sub>-KanMX-T<sub>TEF1</sub>,*

- 5 *ade2::P<sub>GAL10/CYC1</sub>-esterol Δ7RED*Arabidopsis*-T<sub>PGK1</sub>, HIS3::P<sub>TEF1</sub>-c17bov-T<sub>PGK1</sub>-P<sub>TDH3</sub>-COXVI *levadura* ADXbov-T<sub>NCP1</sub>, gal80*

[pFM10: *2μ-URA3-ADE2 P<sub>GAL10/CYC1</sub>-ADX-T<sub>PGK1</sub> P<sub>GAL10/CYC1</sub>-P450scc-T<sub>PGK1</sub> P<sub>TDH3</sub>-3βHSD -T<sub>NCP1</sub> P<sub>CYC1</sub>-P450c11híbrido-T<sub>PGK1</sub>*]

### Fenotipo

- 10 a-materia Leu+ His+ Trp+ Ura+ Ade+ G418R

- W303 pFM10

### Genotipo

*MATa leu2-3,112 trp1-1, can1-100, ura3-1, ade2-1, his3-11,15 [phi<sup>+</sup>]*

- 15 [pFM10: *2μ-URA3-ADE2 P<sub>GAL10/CYC1</sub>-ADX-T<sub>PGK1</sub> P<sub>GAL10/CYC1</sub>-P450scc-T<sub>PGK1</sub> P<sub>TDH3</sub>-3βHSD -T<sub>NCP1</sub> P<sub>CYC1</sub>-P450c11híbrido-T<sub>PGK1</sub>*]

### Fenotipo

a-materia Leu- His- Trp- Ura+ Ade+

### Referencias bibliográficas

- 20 Becker D. y Lundblad V. (2001). Manipulation of yeast genes. Introduction of DNA into yeast cells. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, Capítulo 13 - Unidad 13.7:1-10.
- Broach J. R. (1983). Construction of high copy vectors using 2μm circle sequences. *Method Enzymol.* 101: 307-325.
- Brocard-Masson C. y Dumas B. (2006). The fascinating world of steroids: *S. cerevisiae* as a model organism for the study of hydrocortisone biosynthesis. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 22:213-52
- 25 Dumas B., Cauet G., Lacour T., Degryse E., Laruelle L., Ledoux C., Spagnoli R., y Achstetter T. (1996). 11 beta-hydroxylase activity in recombinant yeast mitochondria. In vivo conversion of 11-deoxycortisol to hydrocortisone. *Eur J Biochem.* 238:495-504.
- Dumas B., Brocard-Masson C., Assemat-Lebrun K., Achstetter T. (2006). Hydrocortisone made in yeast: Metabolic engineering turns a unicellular microorganism into a drug-synthesizing factory. *Biotechnol.*, 1:299-307.
- 30 Duport C., Spagnoli R., Degryse E., y Pompon D. (1998). Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat Biotechnol.* 16:186-9.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153: 163-168.
- 35 Klebe R.J., Harriss J. V., Sharp Z. D., Douglas M. G. (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene*, 25(2-3):333-41.
- Lopes T. S., Klootwijk J., Veenstra A.E., Van der Aar P. C., Van Heerikhuizen H., Raué H. A., Planta, R. J. (1989). High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene* 79 199-206.
- 40 Lopes T.S., Hakkaart G.-J. A. J., Koerts B. L., Raué H. A., Planta R. J. (1991). Mechanism of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 105 83-90.
- Maule J. (1994). Electrophoretic Karyotype Analysis, PFGE, pages 221-252, in "Methods, vol. 29: Chromosome Analysis Protocole", edited by: J. R. Gosden, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Ménard Szczebara F., Chandelier C., Villeret C., Masurel A., Bourot S., Duport C., Blanchard S., Groisillier A., Testet E., Costaglioli P., Cauet G., Degryse E., Balbuena D., Winter J., Achstetter T., Spagnoli R., Pompon D.,

# ES 2 639 916 T3

Dumas B. (2003). Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nature biotechnology*, 21(2): 143-149.

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. *Molecular cloning*, 2ª edición. (1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 5 Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SANOFI-AVENTIS

- 10 <120> Procedimiento para preparar levaduras genéticamente transformadas capaces de producir una molécula de interés con un título elevado

<130> FR2011-042 PCT

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

- 15 <211> 327

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> R1

- 20 <400> 1

```
atggcccttc aagctgcttt ctttggcttc ctctgctttc tctgtccgca aagatggaaa      60
attaaatgct tcagcatcat catcattcaa agagtctagt ctgttcggtg tttcactttc      120
ggagcaaagc aaagctgact ttgtctcttc ctcatgaga tgcaagaggg aacagagctt      180
gaggaataat aaagcgatta ttcgagctca agcaatcgcg acttcaactc catcagtcac      240
aaaatcttcc ttagaccgca agaaaacact tagaaaagga aacgtggttg tcacgggagc      300
ttcttcaggg ctaggtttag caacggc                                           327
```

<210> 2

<211> 336

<212> ADN

- 25 <213> Artificial

<220>

<223> R2

<400> 2

# ES 2 639 916 T3

	ataatggcgt gcagagactt cctcaaggct gagagagccg ctcaatctgc agggatgcct	60
	aaggacagct aactatgat gcatttggac ttggcgtcct tggacagcgt gaggcagttt	120
	gttgataact tcaggcgagc tgagatgcct ctcgatgtgt tggctctgcaa tgccgcagtc	180
	tatcagccaa cggctaataca acctactttc actgctgaag ggtttgagct tagcgttggg	240
	ataaaccatt tgggccactt tcttctttca agattgttga ttgatgactt gaagaactcc	300
	gattatocat caaaacgtct catcattggt ggtacc	336
	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 3betaHSD-F	
	<400> 3	
	gacgggatgg caggtggag	20
10	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> 3betaHSD-R	
	<400> 4	
	agtgaatctt tgtttcagg	20
	<210> 5	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> P450scc-F	
	<400> 5	
25	ctcccctggt gacaatggct	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> P450scc-R	
	<400> 6	

# ES 2 639 916 T3

```

ggtgggtca aactgtccg      20
<210> 7
<211> 1156
<212> ADN
5  <213> Artificial
<220>
<223> Sonda de P450scc
<400> 7
ctcccctggt gacaatggct ggcttaacct ctaccatttc tggagggaga agggctcaca      60
gagaatccac tttcgccaca tcgagaactt ccagaagtat ggccccattt acagggagaa      120
gcttggaat ttggagtcag tttatatcat tcaccctgaa gacgtggccc atctcttcaa      180
gttcgagga tcctaccag agagatatga catcccgcc tggtggcct atcaccgata      240
ttatcagaaa ccattggag tcctgtttaa gaagtcagga acctggaaga aagaccgggt      300
ggcctgaac acggaggtga tggctccaga ggcaataaag aacttcatcc cactgctgaa      360
tccagtgtct caggacttcg tcagcctcct gcacaagcgc atcaagcagc agggctccgg      420
aaagtttgta ggggacatca aggaagacct gtttcacttt gcctttgagt ccatcaccaa      480
tgtcatgttt ggggagcgc tgggatgct ggaggagaca gtgaaccccg agggccagaa      540
gttcattgat gccgtctaca agatgttcca caccagtgtc cctctgctca acgtccctcc      600
agaactgtac cgtctattca gaaccaagac ttggaggagc catgtagccg catgggacac      660
aattttcaat aaagctgaaa aatacactga gatcttctac caggacctga gacggaaaac      720
agaatttagg aattaccag gcatcctcta ctgcctcctg aaaagtgaga agatgctctt      780
ggaggatgtc aaggccaata ttacggagat gctggcaggg ggtgtgaaca cgacatccat      840
gacattgcaa tggcacttgt acgagatggc acgcagcctg aatgtgcagg agatgctgcg      900
ggaggaggtt ctgaatgcc gacgccaggc agaggagac ataagcaaga tgctgcaaat      960
ggtcccactt ctcaaagcta gcatcaagga gacgctgaga ctccaccca tctccgtgac     1020
cctgcagaga taccctgaaa gtgacttgg tcttcaagat tacctgattc ctgccaagac     1080
actggtgcaa gtggccatct atgccatggg ccgagaccct gccttcttct ccagtccgga     1140
10 caagtttgac ccaacc                                             1156
<210> 8
<211> 1126
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Sonda de 3betaHSD
<400> 8

```

ES 2 639 916 T3

gacgggatgg caggggtggag ctgcctcgtg accggaggag gaggccttct gggccagagg 60  
atcatctgcc tgttgggtgga ggagaaggat ctgcaggaaa tccgggtgct agacaaagtc 120  
ttcagaccag aagttcggga ggaatcttct aagctccaga gcaagatcaa gctgaccctg 180  
ctggaaggag acattctgga tgagcagtc ctgaagggg cctgccaggg cacctcagtg 240  
gtcatccaca ccgcctctgt cattgacgtc aggaatgctg tcccgcgaga gaccatcatg 300  
aacgtcaatg tgaaggtac ccagctgctg ttggaggcct gtgtccaggc cagcgtaccg 360  
gtctttatcc acaccagcac catagaagtg gctgggcca actoctacag ggagatcatc 420  
caagacggcc gtgaagaaga gcatcatgaa tcggcatggt cctctccata cccatacagc 480  
aagaagcttg ccgagaaggc tgtgctggga gctaattgggt gggctctgaa aatggtggc 540  
accttgtaga cttgtgcctt gaggccatg tacatctacg gggaggggag cccattcctt 600  
tctgcctaca tgcacggagc cttgaataac aacggcatcc tgaccaatca ctgcaagttc 660  
tcaagagtca acccagtcta tgttggaat gtggcctggg cccacattct ggccttgagg 720  
gccctgaggg acccaaaaaa ggtcccaaac atccaaggac agtttacta catctcagac 780  
gacacgccac accaaagcta cgatgacctc aattacactt tgagcaaaga atggggcttc 840  
tgcctggatt cccggatgag ccttctatt tctctgcagt actggcttgc cttcctgctg 900  
gaaatagtga gcttctgct cagtccaatt tacaaatata acccttgctt caaccgccac 960  
ctagtgactc tttccaacag cgtgttcacc ttctctata agaaagctca gcgagatctg 1020  
gggtatgagc ccctctacac ttgggaggaa gccaaagcaga aaaccaagga gtggattggc 1080  
tccttggtga aacagcaca agagaccctg aaaacaaga ttcact 1126

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar un aislado de levadura que produce al menos 100 mg/l de hidrocortisona, que comprende:
  - 5 (a) proporcionar dos plásmidos de integración con cuatro casetes de expresión, comprendiendo cada plásmido de integración al menos dos casetes de expresión, en los que los cuatro casetes de expresión son P450scc, adrenodoxina (ADX), P450c11, y 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD)
  - (b) integrar de forma estable múltiples copias de los dos plásmidos de integración en una población de células de levadura, cotransformando los plásmidos en la levadura,
  - 10 (c) llevar a cabo un cribado primario para seleccionar al menos 30 clones de levadura, en el que la selección de los clones se basa en la presencia de los casetes de expresión, o la selección en vista de la expresión de un marcador seleccionable cuando está presente tal marcador, y
  - (d) llevar a cabo un cribado secundario funcional sobre los al menos 30 clones de levadura seleccionados en el cribado primario, para identificar dicho aislado de levadura que produce al menos 100 mg/l de hidrocortisona.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que se integran de 5 a 20 copias de los plásmidos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que se seleccionan al menos 40 clones mediante el cribado primario.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
5. El método de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los plásmidos comprende un marcador seleccionable auxotrófico.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, en el que el marcador auxotrófico se selecciona del grupo que consiste en *ADE2*, *URA3*, *HIS3*, *LEU2*, *TRP1*, y *LYS2*.
7. El método de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los plásmidos comprende un marcador seleccionable que es un marcador de resistencia.
- 25 8. El método de la reivindicación 7, en el que el marcador de resistencia se selecciona del grupo que consiste en *natMX*, *phMX*, y *KanMX*.
9. El método de la reivindicación 6, en el que uno de los plásmidos comprende *URA3* y el otro plásmido comprende *ADE2*.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el gen *ADE2* codifica una proteína inactiva truncada.
- 30 11. El método de la reivindicación 1, en el que al menos 85% del esteroide producido por la levadura es hidrocortisona.
12. Un aislado de levadura que produce hidrocortisona obtenible mediante el método de la reivindicación 1, en el que los casetes de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y de P450scc están ambos situados en el cromosoma XII o IV.
13. Uso de un aislado de levadura preparado según el método de la reivindicación 1, para producir hidrocortisona.
- 35 14. Un método para producir hidrocortisona, que comprende:
  - (a) preparar un aislado de levadura productor de hidrocortisona usando el método de la reivindicación 1;
  - (b) cultivar el aislado de levadura en un medio de cultivo; y
  - (c) recuperar y purificar dicha hidrocortisona del medio de cultivo.

Figura 1

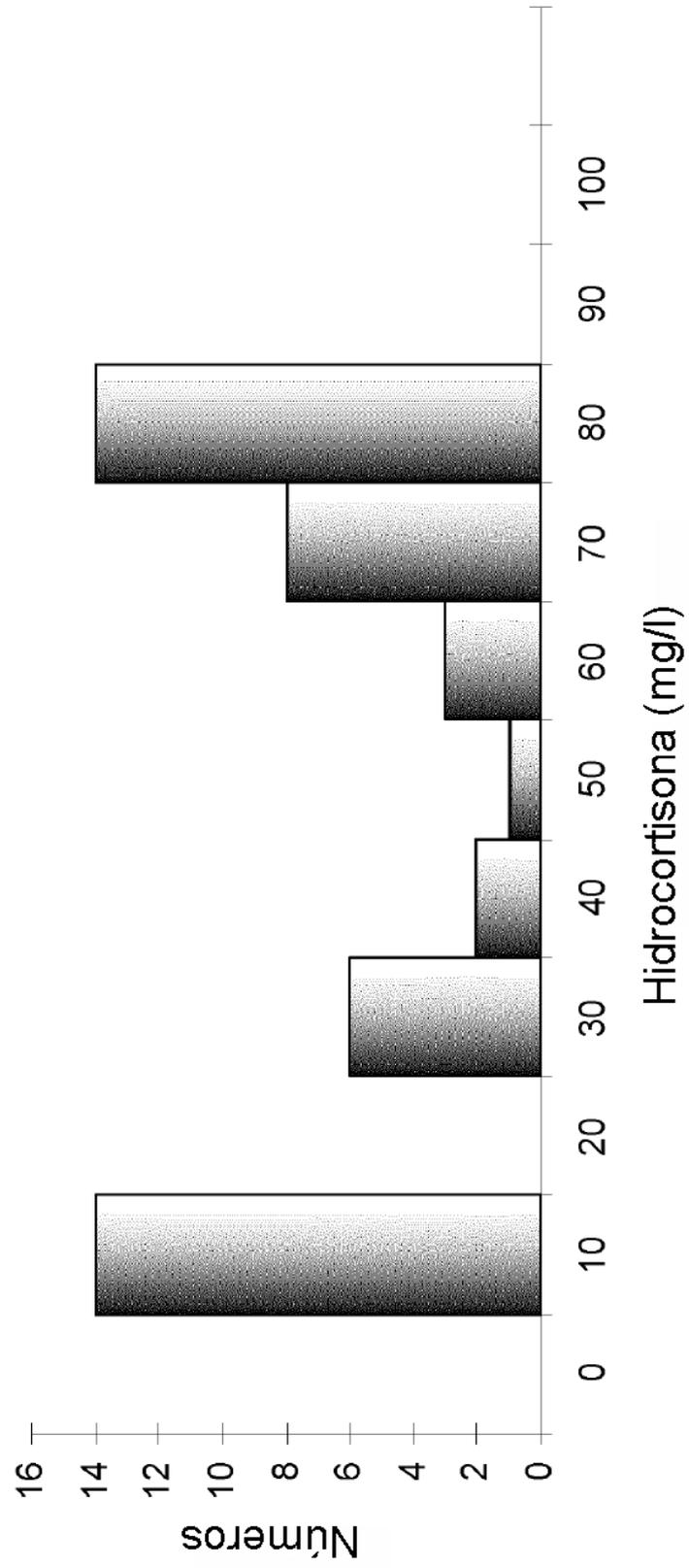


Figura 2

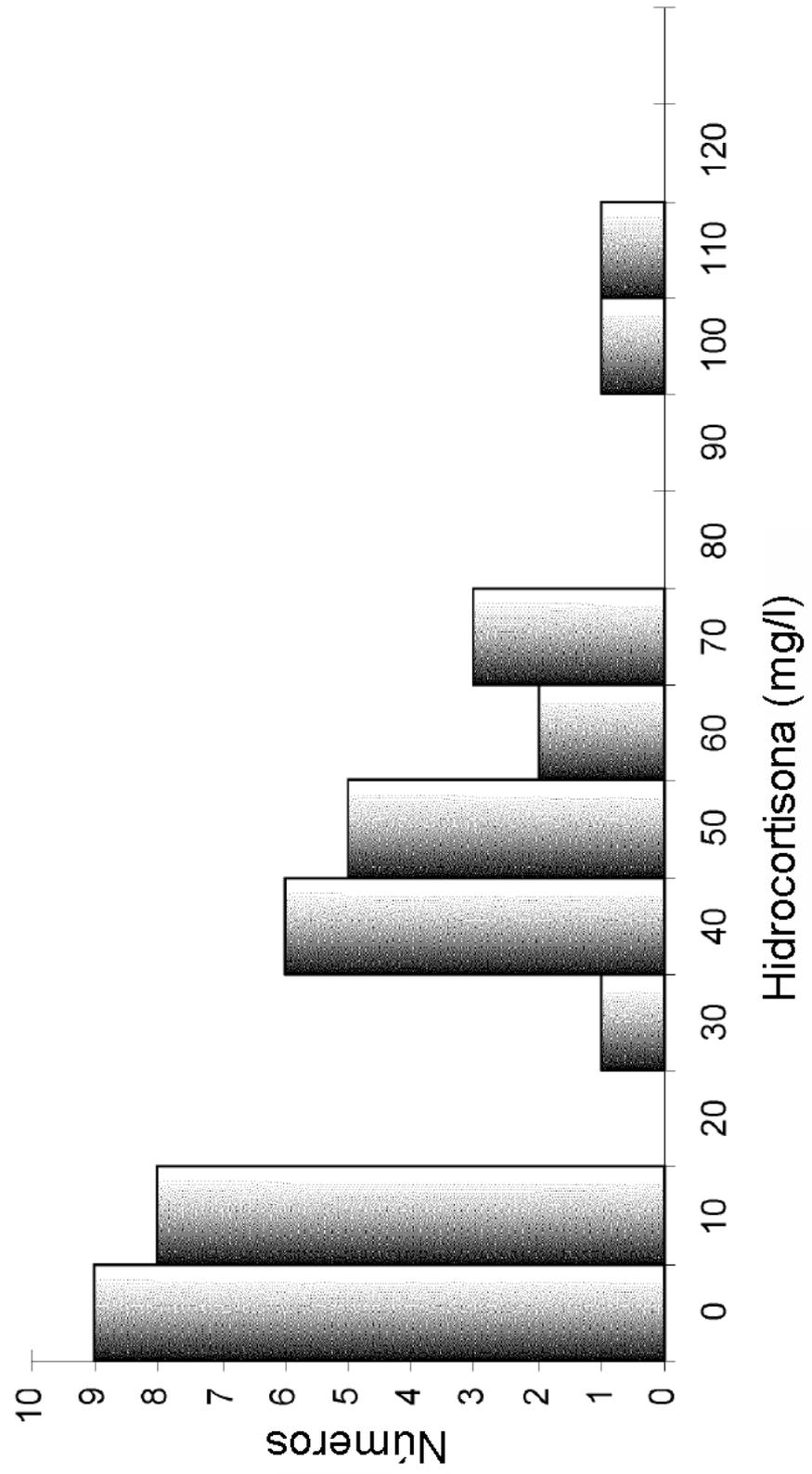


Figura 3

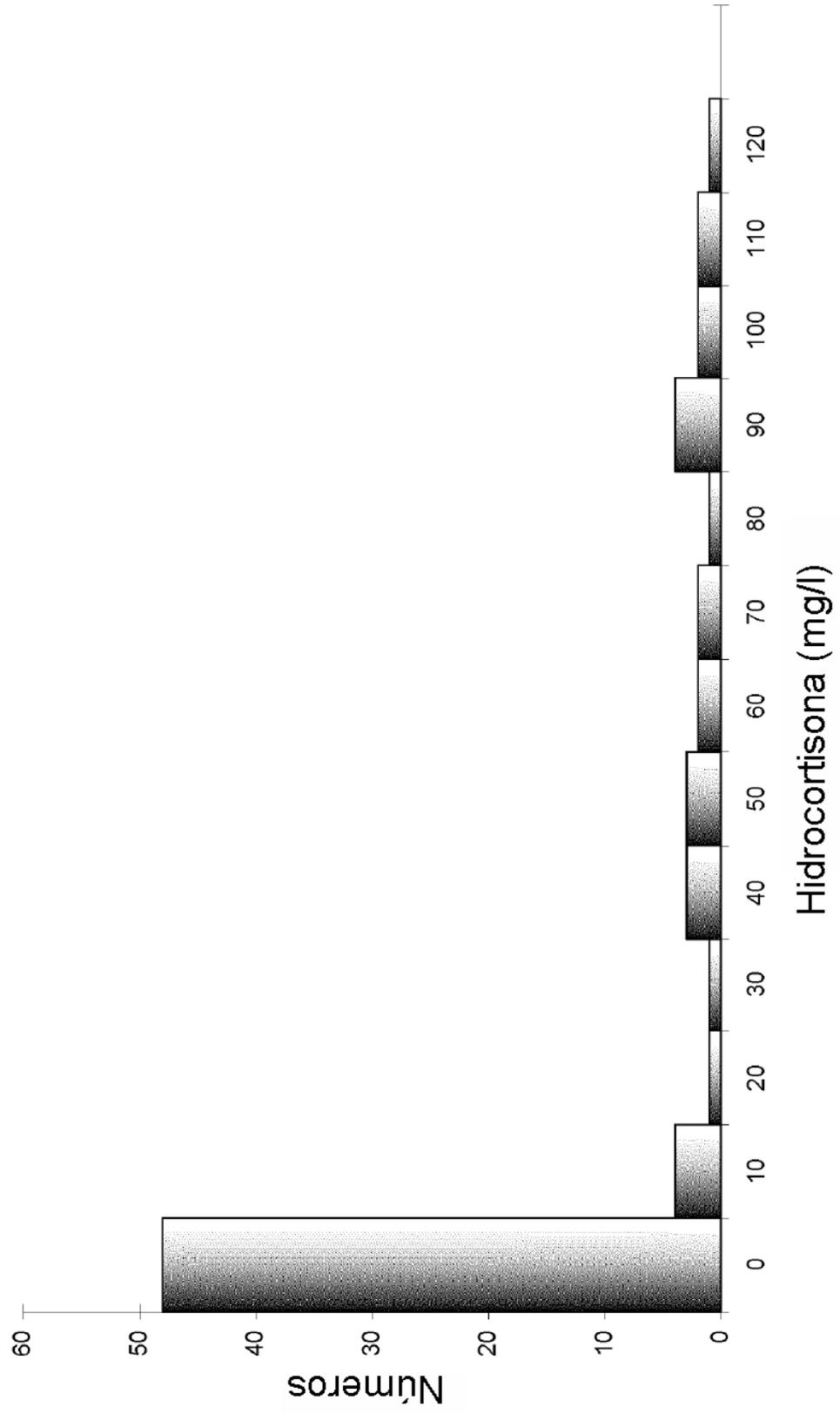
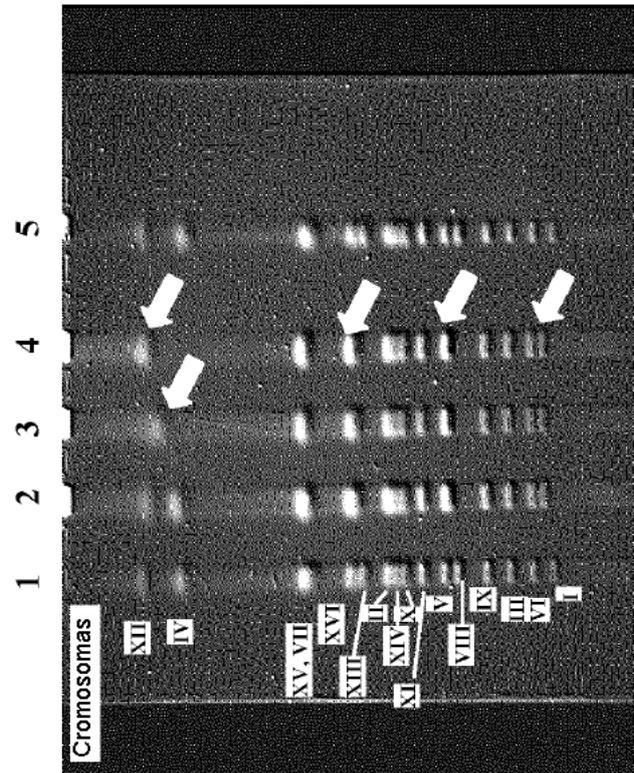


Figura 4



1 y 5: Cepa de tipo salvaje  
2: Cepa parental  
3: Cepa A  
4: Cepa B

Figura 5A

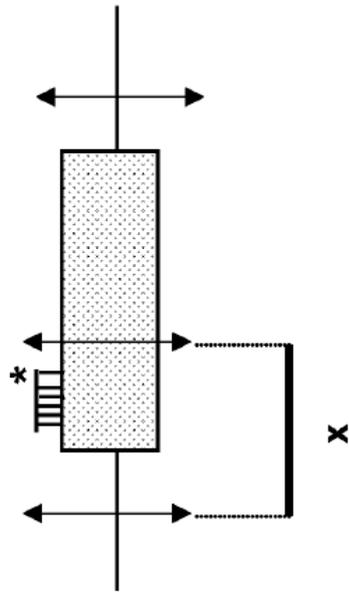


Figura 5B

