(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 662 971**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)
C12P 33/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2005** **E 10186024 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017** **EP 2354218**

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

(30) Prioridad:

06.05.2004 FR 0404890

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2018

(73) Titular/es:

AVENTIS PHARMA S.A. (100.0%)
20, avenue Raymond Aron
92160 Antony, FR

(72) Inventor/es:

POMPON, DENIS;
DUMAS, BRUNO y
SPAGNOLI, ROBERTO

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 662 971 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepas de levadura que producen colesterol y sus aplicaciones

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

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

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

El colesterol se utiliza también en la síntesis industrial de la vitamina D_3. Esta vitamina se utiliza para complementar los alimentos humanos (en los productos lácteos, por ejemplo) y animales. El colesterol se utiliza igualmente de forma ventajosa como aditivo en alimentos animales, principalmente en alimentos destinados a gambas de criadero.

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

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

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

La presente solicitud describe como proporcionar una fuente de colesterol abundante y segura desde el punto de vista sanitario. Se muestra de forma sorprendente que es posible desviar la producción natural de ergosterol en los hongos producir colesterol.

Descripción general de la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere a una cepa de levadura que produce demosterol, caracterizada por que no posee copia funcional del gen que codifica la enzima 24-C-metiltransferasa y por que expresa la enzima heteróloga 7-dehidrocolesterolreductasa.

Un segundo aspecto de la invención describe un organismo del reino de los hongos tal como se define anteriormente, caracterizado por que este último está genéticamente modificado.

Un tercer aspecto de la invención describe un organismo del reino de los hongos tal como se define anteriormente, caracterizado por que este último produce colesterol a partir de una cepa de carbono simple.

La presente solicitud describe también un organismo del reino de los hongos, que expresa las enzimas 7-dehidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxisterol Δ24-reductasa. Más particularmente la solicitud describe un organismo tal como se ha descrito anteriormente en el que la enzima esterol 24-C metiltransferasa se ha inactivado y/o la enzima C-22 esterol desaturasa se ha inactivado.

Otro aspecto de la solicitud se refiere un organismo del reino de los hongos tal como se define anteriormente caracterizado por que la expresión de las enzimas 7-dehidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxisterol Δ24-reductasa se obtiene por transformación del organismo.

La presente solicitud describe igualmente un organismo del reino de los hongos tal como se ha descrito anteriormente, caracterizado porque la desactivación de la enzima esterol 24-C-metiltransferasa se realiza por desactivación génica y/o la desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa se realiza por desactivación génica.

La solicitud describe un organismo del reino de los hongos tal como se ha descrito anteriormente, caracterizado porque se elige entre el filum *Ascomycete*, más especialmente entre el sub-filum *Saccharomycotina*, todavía más especialmente entre la clase Saccharomycetes o *Schizosaccharomycetes*, todavía más especialmente entre el orden Saccharomycetales o *Schizosaccharomycetales,* todavía más especialmente entre la familia *Saccharomycetaceae* o *Schizosaccharomycetaceae*, todavía más especialmente entre el género Saccharomyces o *Schizosaccharomyces*.

Otro aspecto de la invención describe un organismo del reino de los hongos tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que se trata de una levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe.*

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

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

La presente solicitud describe la utilización de un organismo del reino de los hongos, tal como se ha definido anteriormente para la producción de colesterol o de uno de sus intermedios metabólicos o de una mezcla de esteroles marcada con ^{13}C o con ^{14}C.

Se describe igualmente un procedimiento de producción de colesterol o de uno de sus intermedios metabólicos o de una mezcla de esteroles marcada con ^{13}C o con ^{14}C que comprende las etapas siguientes:

- cultivo de un organismo del reino de los hongos tal como se ha definido anteriormente sobre un sustrato marcado con ^{13}C o con ^{14}C y,

- extracción de dicho colesterol, o de uno de sus intermedios metabólicos o de la mezcla de esteroles.

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

La presente solicitud se refiere también a una composición que contiene, a título de marcador de trazabilidad, una mezcla isotópica de colesterol, de intermedios o de metabolitos del colesterol, marcados en diferentes posiciones con la ayuda de marcadores isotópicos y que presentan un perfil isotópico definido. Más particularmente, esta composición está destinada al campo de la alimentación o de la terapia humana o animal.

Descripción detallada de la invención

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

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

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

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

La presenta solicitud describe particularmente un organismo del reino de los hongos (*Fungi*) genéticamente modificado que produce de manera autónoma colesterol a partir de una fuente de carbono simple.

Se pueden realizar una serie de modificaciones genéticas del hongo con el fin de desviar la vía metabólica natural de producción del ergoesterol hacia la producción de colesterol. La presente solicitud describe así un organismo del

reino de los hongos genéticamente modificado que expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxisterol Δ24-reductasa. La cepa de organismo del reino de los hongos así modificada produce colesterol. En efecto, la solicitante ha podido realizar un modelo, gracias a los resultados obtenidos, (véase la parte de los ejemplos de la presente solicitud), la vía metabólica que conduce al ergoesterol y a algunos de sus derivados (véase la figura 2). La expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa en el hongo S. cerevisiae puede permitir la producción de colesterol, desviando una parte de la biosíntesis del ergoesterol.

La enzima 7-deshidrocolesterol reductasa tiene el número EC: 1.3.1.21 en la clasificación internacional de enzimas (Enzyme Classification). Se denomina igualmente delta-5,7-esterol-delta-7-reductasa, 7-DHC reductasa o esterol delta-7-reductasa y se denominará igualmente Delta-7 esterol reductasa, Delta-7Red, Delta 7 Reductasa o Δ7-reductasa en la parte siguiente de este documento. Esta enzima cataliza en estado natural, por ejemplo en plantas, la reducción NADPH dependiente del delta 5, 7-colestadienol en delta 5 colestenol o la reducción de intermedios esterólicos que presentan doble enlace en 7-8 (Taton y Rahier, 1991). El gen que codifica para la enzima 7-deshidrocolesterol reductasa ha sido aislado por primera vez en la planta Arabidopsis thaliana, el aislamiento del gen correspondiente y la expresión de esta enzima en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido descrita en la patente EP0727489. Las secuencias de este gen y de la proteína son accesibles con el número de entrada GenBank siguiente: U49398 (Lecain et al., 1996).

Se han descrito una serie de homólogos de este gen en otras especies. Se trata por ejemplo del gen homólogo en el hombre (cuya secuencia de nucleótidos es accesible con el número GenBank AF034544, la secuencia proteica de número GenBank: AAC05086) (Moebius et al., 1998). Del gen homólogo en la rata *Rattus norvegicus* (cuya secuencia de nucleótidos es accesible con el número GenBank: AB016800, la secuencia proteica con el número GenBank: BAA34306). Se han identificado igualmente en la gallina *Gallus gallus* con la referencia Genbank BM490402 o en el sapo *Xenopus laevis* con la referencia Genbank BI315007 o el pez cebra *Danio rerio* con la referencia Genbank BQ132664. Se encuentra igualmente un gen que codifica para la actividad delta7 esterol reductasa en plantas como el arroz *Oryza sativa* con la referencia Genbank CA753545, la patata *Solanum tuberosum* con la referencia Genbank BF342071. Este gen que codifica para la actividad delta7 esterol reductasa puede encontrarse igualmente en la protista *Mastigomoeba balamuthi* con la referencia Genbank BE636562.

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

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

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

La enzima 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa, igualmente denominada DHCR24 o 24-deshidrocolesterol reductasa, cataliza en estado natural la reducción del desmosterol (colesta 5, 24 dienol) o de los derivados del lanosterol que posee un doble enlace en 24-25 en la cadena lateral (por ejemplo el 14 desmetil-lanoesterol, el cimosterol o el colesta-7, 24-dienol), reducción necesaria principalmente para la biosíntesis del colesterol en humanos (Waterham H. R. et al., 2.001). Esta enzima se denominará igualmente 24-(25) esterol reductasa, delta 24 esterol reductasa o Δ24-reductasa en la parte restante este documento.

El gen que codifica para la enzima 3β-hidroxiesterol Δ4-reductasa ha sido aislado por primera vez en humanos, el aislamiento del gen correspondiente y la expresión de esta enzima en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido descrita en la publicación Waterham H. R. et al., 2001. Las secuencias de este gen y de la proteína son accesibles con los números de entrada GenBank siguientes: NM_014762 y NP_055577.

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

El experto podrá aislar fácilmente otros genes homólogos que codifican para la enzima 3-βhidroxicolesterol Δ24-reductasa en otros organismos. Se podrá referir principalmente al método de clonación descrito en la publicación Waterham H. R. et al., 2.001. El experto en la materia podrá igualmente fácilmente determinar la actividad 3β-hidroxisterol Δ24-reductasa de las proteínas correspondientes particularmente utilizando el ensayo de actividad igualmente descrito en la publicación (Waterham et al., 2001).

La expresión de la enzima 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa en un organismo del reino de los hongos puede obtenerse por cualquier medio conocido por el experto en la materia. Se puede tratar en particular de los medios descritos anteriormente en lo que se refiere a la expresión de la enzima 7-deshidrocolesterol reductasa.

Preferentemente, la enzima 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa expresada es la enzima humana. Un ejemplo de aislamiento del gen correspondiente y de la expresión de esta enzima en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se describe en la publicación Waterham H. R. et al., 2.001. Sin embargo, se puede tratar de cualquier enzima homóloga o no, natural o artificial, que presente la misma actividad enzimática.

Ventajosamente, los organismos del reino de los hongos según la presente solicitud expresan las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa y presentan además una desactivación de la enzima esterol 24-C-metiltransferasa.

La enzima esterol 24-C-metiltransferasa tiene el número EC-2.1.1.41 en la clasificación internacional de enzimas (*Enzyme Classification*). También se denomina ERG6p, Delta(24)-metiltransferasa, Delta(24)-esterol metiltransferasa, Zimosterol-24-metiltransferasa, S-adenosil-4-metionina:esterol delta(24)-metiltransferasa; SMT1, 24-esterol C-metiltransferasa, S-adenosil-L-metionina:delta(24(23))-esterol metiltransferasa o Fitosterol metiltransferasa. Esta enzima cataliza en estado natural la metilación en C-24 del cimosterol que lleva a la formación del fecosterol

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

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

El experto podrá aislar fácilmente otros genes homólogos del gen *Erg6* en los organismos del reino de los hongos. El experto podrá igualmente determinar fácilmente la actividad de la esterol 24-C-metiltransferasa de las proteínas correspondientes utilizando principalmente como ensayo de actividad la complementación funcional de una cepa de levadura con ruptura por estos genes. La complementación se evalúa entonces por la formación de esteroles ramificados en la posición 24, en particular esteroles de tipo ergosta- que contienen un grupo metileno en posición 24-28. La presencia de una actividad biológica esterol 24-C-metiltransferasa de tipo *ERG6* será igualmente determiand*a in vitro* gracias a las técnicas desarrolladas por (McCammon et al., 1984) o por Taylor et Parks (Taylor y Parks, 1978). Por otra parte, los esteroles producto y sustrato de la enzima ERG6 se separarán por cromatografía en fase gaseosa según la técnica desarrollada por Nes en (Methods in Enzymology Steroids and Isoprenoids Volúmen 111 parte B, 1.985 «A comparison of Methods for the Identification of Sterols» pp3-37).

La cepa de organismo del reino de los hongos según la presente solicitud que expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa y que presenta además una desactivación de la enzima 24-C-metiltransferasa produce colesterol. La solicitante ha podido determinar en efecto que, de forma sorprendente, la desactivación de la enzima esterol 24-C-metiltransferasa bloquea la vía de biosíntesis anterior del ergosterol y permite una producción aumentada de colesterol por la cepa de hongo (véase la parte experimental de la presente solicitud).

La expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa se realiza como se describe a continuación.

La inactivación de la enzima esterol 24-C-metiltransferasa se puede realizar por cualquier medio conocido por el experto. Se puede tratar en particular de la introducción por mutagénesis de una mutación sin sentido, de una inserción o una deleción que provoca un cambio del marco de lectura en el gen que codifica dicha proteína.

Se puede tratar igualmente de la expresión de un ARN antisentido complementario del ARN mensajero que codifica dicha proteína o del sistema de extinción génica conocido por el experto con el nombre de ARNi (*small interfering RNA*) y de los sistemas enzimáticos asociados si aquellos no existen de forma natural en el huésped. La mutagénesis puede efectuarse en la secuencia codificadora o en una secuencia no codificadora de manera que inactive la proteína codificada o impida su expresión o su traducción. La mutagénesis puede efectuarse *in vitro* o *in situ*, por supresión, sustitución, deleción y/o adición de una o varias bases en el gen considerado o por desactivación génica.

Se puede tratar en particular de la introducción de un ADN exógeno en la secuencia codificadora o promotora (por ejemplo un casete de expresión con un promotor y/o terminador homólogo y una parte codificadora heteróloga). La casete de expresión permite ventajosamente la expresión de un marcador de selección. Igualmente es posible modificar el promotor del gen con el fin de reducir el nivel de expresión. Para los hongos, la desactivación se hace igualmente por interrupción de la secuencia codificadora con un gen marcador heterólogo u homólogo. Las principales técnicas para interrumpir un gen de los hongos se describen en el artículo de Johnston et al (2.002) (Methods in Enzymology Volúmen 350 Editado por Christine Guthrie y Gerry Fink; «Gene Disruption»; M. Johnston, L. Riles, J. Hegemann pp290-315).

Ventajosamente, los organismos del reino de los hongos según la presente solicitud expresan las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa y presentan además una desactivación de la enzima C-22-esterol-desaturasa.

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

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

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

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

La cepa de organismo del reino de los hongos según la presente solicitud que expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa y que presenta además una desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa produce colesterol. La solicitante ha podido determinar en efecto que la desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa bloquea ventajosamente la conversión del colesterol en colesta-5, 22-dienol y permite una estabilización de la producción de colesterol (véase la parte experimental de la presente solicitud). Este bloqueo interviene también a nivel de la conversión del colesta-5,7-dienol, un precursor del colesterol en colesta-5,7,22-trienol, un precursor del colesta-5,22-dienol. De forma sorprendente, la enzima C-22-esterol desaturasa acepta, en efecto, como sustrato el colesterol que ella convierte en colesta-5, 22-dienol. Esta reacción parásita se puede eliminar por desactivación de la enzima 22-esterol desaturasa, tal como ha podido ser determinado por la demandante.

La expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa se realiza como se describe a continuación. La desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa se puede realizar por cualquier medio conocido por el experto. Se puede tratar en particular de los métodos descritos anteriormente que se refieren a la desactivación de la enzima esterol 24-C-metiltransferasa.

Ventajosamente, los organismos del reino de los hongos según la presente solicitud expresan las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa y presentan además una desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa y una desactivación de la enzima esterol 24-C-metiltransferasa. Estas cepas presentan en efecto las ventajas acumuladas de las dos desactivaciones y son cepas productoras de colesterol.

La expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa y la desactivación de las enzimas C-22-esterol desaturasa y esterol 24-C-metiltransferasa se realizan como se ha descrito anteriormente.

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

Preferiblemente, los organismos del reino de los hongos según la presente solicitud se describen en el filum Ascomycetes, de forma más preferida se describen en el sub-filum Saccharomycotina, de forma aún más preferida se describen en la clase *Saccharomycetes* o Schizosaccharomycetes, de forma aún más preferida se describen en el orden *Saccharomycetales* o Schizosaccharomycetales, de forma aún más preferida se describen de la familia *Saccharomycetaceae* o Schizosaccharomycetaceae, de forma aún más preferida se describen del género *Saccharomyces* o Schizosaccharomyces, de forma completamente preferida los organismos del reino de los hongos descritos pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae* o Schizosaccharomyces pombe.

La presente solicitud describe igualmente un procedimiento de producción de colesterol de origen no animal que comprende las etapas siguientes:

- se cultiva un organismo del reino de los hongos tal como se describe anteriormente,
- extraer el colesterol producido por este organismo.

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

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

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

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

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

- 1) del protocolo de marcación y en particular de la duración y de las condiciones de cultivo en el sustrato marcado y no marcado,
- 2) de la estructura genética precisa de la cepa utilizada, y

- 3) del tiempo preciso de finalización de los cultivos.

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

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

- 1) se puede modular a voluntad actuando sobre las condiciones de cultivo, la cepa utilizada y el esterol elegido. Se puede producir por lo tanto un registro de marcadores único.

- 2) Se puede combinar, a saber, que varias firmas isotópicas correspondientes a varios esteroles únicos marcados por perfiles isotópicos ellos mismos modulables, se pueden combinar para formar un "alfabeto molecular".

- 3) Es reproducible y fácil de determinar experimentalmente.

- 4) Corresponde a una mezcla molecular marcadora fácil de aislar, estable, incolora e inodora, no volátil, no tóxica y que se puede incorporar a alimentos, medicamentos, aditivos o a otros productos asimilables por el hombre.

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

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

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

Leyendas de las figuras

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

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

Figura 3: Perfil comparativo por HPLC con detección UV a 206 nm de los esteroles libres de las cepas derivadas de la cepa BMA64 e identificación de estos esteroles. Las cepas estudiadas son las siguientes: WGIF01 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* (véase ejemplo 1), WGIF02 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la Δ24-reductasa, ejemplo 12), WGIF03 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la Δ7-reductasa, ejemplo 13), WGIF04 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la Δ7-reductasa y la Δ24-reductasa, ejemplo 14). C5 : colesta-5-enol (colesterol) ; C5,22: colesta-5,22-dienol; C5, 24: colesta-5,24-dienol (desmosterol); C8,24: colesta-8,24-dienol (cimosterol); C5, 7,22: colesta-5,7,22-trienol; C5.7, 24: colesta-5,7,24-trienol; C5, 22,24: colesta-5,22,24-trienol; C5, 7,22,24: colesta-5,7,22,24-tetraenol; lan: lanosterol.

Figura 4: Perfil comparativo por HPLC con detección UV a 206 nm de los esteroles libres de la cepa WGIF04 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la Δ7-reductasa y la Δ24-reductasa, ejemplo 14) después de 0,2,4,8,24 horas de inducción con galactosa. Δ : cepa WGIF01 (ejemplo 1). Para la cepa WGIF04, las tomas de muestra se realizan 0, 2, 4, 8 y 24 horas después del vertido de la fuente de carbono en galactosa. El perfil de la cepa BMA64 que contiene la ruptura del *erg6* (WGIF01) presentada es el obtenido inmediatamente después del

vertido en galactosa. Este perfil prácticamente no cambia durante el transcurso de la inducción (0-24 horas). La señal de absorción a 206 nm corresponde a coeficientes de absorción variables de un esterol a otro. C5.: colesta-5-enol (colesterol) ; C5,22: colesta-5,22-dienol; C5, 24: colesta-5,24-dienol (desmosterol); C8,24: colesta-8,24-dienol (cimosterol); C5, 7,22: colesta-5,7,22-trienol; C5.7, 24: colesta-5,7,24-trienol; C5, 22,24: colesta-5,22,24-trienol; C5, 7,22,24: colesta-5,7,22,24-tetraenol; lan: lanosterol.

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

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

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

Figura 7: Perfiles comparativos de los esteroles totales (libres y esterificados) por cromatografía en fase gaseosa de las cepas WGIF01 (deleción del *erg6*), WGIF02 (deleción del *erg6* con expresión de la Δ24-reductasa), WGIF03 (deleción del *erg6* con expresión de la Δ7-reductasa), WGIF04 (deleción del *erg6* con expresión de la Δ24-reductasa y de la Δ7-reductasa) y CA10 pYES_Delta24 (fondo genético FY1679, deleción del *erg5* con expresión de la Δ24-reductasa, Δ-7 reductasa y *erg5*). Las escalas de respuesta (corrientes de ionización de llama) son arbitrarias. Los perfiles no se pueden comparar de forma cualitativa de una cepa a otra. La escala de tiempos de retención es, sin embargo, la misma para todas las cepas (los tiempos de retención se expresan en minutos). La identificación de los esteroles se realiza según los criterios descritos en la presente invención.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los tiempos de inducción son de 8 ó 24 horas.

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

Figura 13: Perfiles comparados de los esteroles totales (libres y esterificados) por cromatografía en fase gaseosa de las cepas YIM59/pIM303 (parte A de la figura) y de la cepa YIM59/pIM331 (parte B de la figura) (véase el ejemplo 18). Las escalas de respuesta son arbitrarias. La escala de tiempos de retención es la misma para las dos cepas (los tiempos de retención se expresan en minutos). La identificación de los esteroles se realiza según los criterios descritos en la presente invención.

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

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

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

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

La cepa BM64 (de genotipo *MATa; ura3-52; trp1Δ2; leu2-3_112; his3-11; ade2-1; can1-100*) es un derivado de la cepa de levadura S. cerevisiae W303 MATα por deleción total del gen TRP1. La cepa BMA64 y la cepa W303 MATα se describen en la publicación de Baudin-Baillieu et al (Baudin-Baillieu et al., 1997). Para aislar el gen *TRP1,* se ha amplificado el gen *TRP1* del plásmido pFL44 (Bonneaud et al., 1991) utilizando la *Z-Taq*I (una ADN polimerasa ADN dependiente) suministrada por la compañía Takara (PanVera LLC 501 Charmany Drive Madison, WI 53719 USA). El par cebador utilizado permite la amplificación por la ADN polimerasa del gen *TRP1* limitado por secuencias correspondientes al gen ERG6. La secuencia de estos iniciadores es la siguiente:

OERG6trp1 : 5'

(CCTAGCGACGAAAAGCATCATTGGAGTGAATAACTTGGACTTACCAttcttag

cattttgacg) 3' (SEQ ID N° 1).

OERG6trp2 : 5' 5'

(GCATAAGAGTGAAACAGAATTGAGAAAAAGACAGGCCCAATTCAaattcggg

tcgaaaaaagaaaagg) 3' (SEQ ID N° 2).

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

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

Para ello, las 41 colonias se transfieren a un medio mínimo que contiene respectivamente 10, 20 ó 50 µg/mL de nistatina, una decena de colonias es capaz de crecer sobre el medio que contiene una dosis de 50 µg/mL de

nistatina. Estas colonias resistentes se seleccionan para verificar su estructura génica, así como sus composiciones en esteroles.

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

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

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

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

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

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

Las cepas **CA10** (de genotipo: *MATα, rho*$^{+}$*, GAL2, ura3-52, trp1-Δ63, his3-Δ200, erg5::HYGRO*^{R}*, ade2::GAL10/CYC1 :: Δ7Reductasa ::PGK1, LEU2 ::GAL10/CYC1::matADR::PGK1*), **CA14** (de genotipo : *MATα, rho*$^{+}$*, GAL2, ura3-52, trp1-Δ63, his3-Δ200, erg5::HYGRO*^{R} *atf2:: G418*^{R}*, ade2::GAL10/CYC1::Δ7Reductasa::PGK1, LEU2::GAL10/CYC1::matADR::PGK1*), y **CA23** (de genotipo: *MATα, rho*$^{+}$*, GAL2, ura3-52, trp1-Δ63, his3-Δ200, erg5:: HYGRO*^{R} *, are1::G418*^{R}*, are2::HIS3, ade2::* GAL10/CYC1::*Δ7*Reductasa::PGK1, LEU2::GAL10/CYC1::matADR::PGK1), así como sus construcciones se describen en la referencia de Duport *et al.* Estas cepas producen y contienen en sus membranas esteroles no naturales (como se ha descrito en la solicitud de patente europea EP 0727489) y en particular el ergosta-5-enol (campesterol).

Estas tres cepas no expresan el producto del gen *ERG5* que es no funcional por inserción en su secuencia codificadora del gen de resistencia a la higromicina. Además estas cepas expresan el cADN que codifica para la Δ7-reductasa de planta (la solicitud de patente europea EP0727489 describe principalmente la clonación de la Δ7-reductasa de la planta *Arabidopsis thaliana*, siendo el número de entrada GenBank de esta secuencia ATU49398). La cepa CA14 se deriva de la cepa CA10 por ruptura del gen *ATF2.* El producto de este gen lleva a una acetilación de la pregnenolona en la posición 3 (como se describe en la solicitud de patente WO99/40.203).

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

EJEMPLO 3: Construcción del plásmido de expresión de la Δ24-25 reductasa de origen humano (plásmido pYES_Delta24)

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

El promotor GAL1 puede además ser inducido con galactosa.

EJEMPLO 4: Construcción del plásmido pAG1 que expresa la Δ7-reductasa de A. thaliana.

Se ha construido un plásmido específicamente para la expresión de la Delta-7-reductasa de *A. thaliana* sobre un vector monocopia. Para esta construcción se ha utilizado el plásmido pAM1. Este plásmido, cuya construcción se ha descrito en la solicitud PCT WO02/061.109 (véase el ejemplo 9.b de dicha solicitud) es un plásmido lanzadera E. coli/ S. cerevisiae basado en una secuencia de replicación autónoma y un centrómero (ARS CEN). El marcador de selección es el gen ADE2. Este plásmido es compatible y por lo tanto puede replicarse al mismo tiempo que un plásmido basado en un origen de replicación de 2 micrones. Este plásmido posee en particular un sitio único *Not*I que permite clonar las casetes de expresión, tal como se ha descrito en la solicitud PCT anterior.

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

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

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

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

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

El fragmento de PCR se digiere a continuación con la enzima *Not*I, se purifica sobre gel de agarosa y luego se clona de forma clásica al nivel del sitio único *Not*I del plásmido pAM1. El plásmido así obtenido se ha denominado pAG1.

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

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

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

a) Condiciones de extracción de los esteroles libres:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1) Análisis por HPLC con detección UV :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Las cepas que se van a analizar se han cultivado en un volumen de 50 mL de medio de Kappeli (Kappeli et al., 1985) que contiene 2% de D-glucosa normal o de D-glucose-U-$^{13}C_6$ [para los experimentos de marcación, (véase la figura 10)].

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

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

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

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

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

<u>EJEMPLO 9</u>: Identificación de los esteroles presentes en las cepas analizadas:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los dos dobles enlaces 5,7 conjugados presentan un espectro típico con dos picos de absorción entre 265 y 280 nm mientras que los dobles enlaces 22, 24 conjugados presentan un pico de absorción a 235nm. El último doble enlace conjugado en 8, 14 se puede identificar por un pico de absorción a 245 nm.

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

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

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

Se ha determinado así que esta cepa acumula más de 80% de los esteroles libres en forma de ergosterol (ergosta5,7,22-trienol) (véase la Figura 8). Esta cepa produce otros esteroles minoritarios detectables, se trata del ergosta-5,7-dienol (sustrato del producto del gen ERG5) (12%) y el cimosterol (ergosta-8,24-dienol) (5%). No se detecta ninguna traza de colesterol (el límite de detección del método es de aproximadamente 0,5% de los esteroles observables). Igualmente son detectables pequeñas cantidades de lanosterol (únicamente al nivel de los análisis de los esteroles totales).

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

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

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

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

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

La cepa WGIF02 ha sido obtenida por transformación de la cepa WGIF01 mediante el plásmido pYES2 que contiene el casete de expresión de la Δ24 Reductasa (pYES_Delta24, véase el ejemplo 3). Los clones se han elegido sobre un medio desprovisto de uracilo y la presencia y la expresión del cADN de la Δ24reductasa se verifican analizando los esteroles de estos transformantes por el procedimiento 1[véase el ejemplo 5-1)].

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

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

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

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

<u>EJEMPLO 13:</u> Construcción de la cepa WGIF03 e identificación de los esteroles presentes en esta cepa:

La cepa WGIF03 se ha obtenido por transformación de la cepa WGIF01 con el plásmido pAG1. Este plásmido lanzadera entre la *E. coli* y la *S. cerevisiae* contiene un casete de expresión para la Δ7reductasa cuyo cADN correspondiente se encuentra bajo control del promotor GAL10/CYC1. La cepa WGIF01 ha sido transformada por la técnica del cloruro de litio y los transformantes se han seleccionado en un medio que no contenía adenina. La expresión de la Delta7-reductasa se ha verificado por la aparición en el perfil esterólico de clones adecuados del colesta-5,24(25)-dienol. Se ha elegido más especialmente un clon que responde a estos criterios y se ha denominado WGIF03.

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

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

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

Esta actividad se señala igualmente por la aparición de un pico mayoritario identificado como el descrito anteriormente para el colesta-5, 24-dienol o desmosterol. Las cantidades de colesta-8, 24-dienol pasan de 12 a 48%. El colesta-5, 7, 24-trienol detectado pasa de 30 a 3% y el colesta-5, 7, 22,24-tetraenol detectado de 23 a 4%, respectivamente para las cepas WGIF01 y WGIF03. Estas observaciones indican, de forma inesperada, que la esterol delta-7-reductasa reduce los colesta-5,7-dienoles de forma casi independiente de la naturaleza de las insaturaciones que contiene la cadena lateral de los esteroles. Este resultado se opone al observado con la esterol delta-24-reductasa. De forma inesperada, la expresión de la esterol delta-7-reductasa lleva igualmente a la acumulación (12%) de una molécula co-migrante con el colesta-5,7-dienol. Sin embargo, parece poco probable, aunque no excluido, que esta molécula sea colesta-5,7-dienol cuyo nivel teórico debería disminuir y no aumentar en estas condiciones. La aparición de una pequeña cantidad de colesta-5,22,24-trienol (8%) es también interesante. Este último esterol es el producto esperado de la acción de la esterol 22-desaturasa sobre el colesta-5,24-dienol, esterol mayoritario (60%) en la cepa WGIF03 (resultante de la reducción del colesta-5,7,24-trienol por la esterol delta 7-reductasa). La pequeña acumulación de colesta-5,22,24-trienol indica de forma inesperada que el colesta-5,24-dienol no es un buen sustrato para la esterol 22-desaturasa. Gracias a los resultados obtenidos en la cepa WGIF02 (véase el ejemplo 12), se puede deducir que la presencia de una insaturación en 24 (colesta-5, 24-dienol o colesta-5,7,24-trienol) hace que los esteroles sean difícilmente metabolizables por la esterol 22-desaturasa. La acción de la enzima ERG6p transformando los colesta- insaturados en 24 en ergosta- lleva, por lo tanto, a transformar los malos sustratos del gen ERG5 (22-desaturasa) en buenos sustratos.

<u>EJEMPLO 14:</u> Construcción de la cepa WGIF04 e identificación de los esteroles presentes en esta cepa:

La cepa WGIF04 se ha obtenido por transformación de la cepa WGIF02 mediante el plásmido pAG1 por la técnica del cloruro de litio y los transformantes se han seleccionado en un medio que no contenía ni adenina ni uracilo. Los buenos transformantes se han confirmado entonces en base a la detección de acumulación de colesterol. Se ha seleccionado más especialmente un clon que responde a estos criterios y se ha denominado WGIF04. Una muestra de la cepa WGIF04 ha sido depositada ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) Instituto Pasteur, calle Docteur Roux 25, 75724 París Cedex 15, Francia, el 22 de abril de 2004 con el número de registro I-3203.

También se pueden obtener las cepas indistinguibles de WGIF04 transformando la cepa WGIF03 mediante el pYES_Delta24 y aplicando la misma selección.

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

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

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

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

Por otro lado, se ha podido demostrar que la formación del colesterol necesita de la inducción de los promotores de la delta-7-reductasa y la delta-24-reductasa (véanse las figuras 4 y 5). Las cepas que contienen los genes no producen colesterol en ausencia de inducción, la figura 5 indica que el nivel máximo de colesterol se alcanza después de aproximadamente 24 horas de inducción. Paralelamente a la formación del colesterol (colesta-5-enol) se observa igualmente la formación de colesta-5,22-dienol. El análisis de la figura 4 y de la figura 5 indica que la formación de este último compuesto se produce más rápidamente después de la inducción que la formación del colesterol y comienza incluso antes que la inducción (véase la figura 5A: m/z = 367). Sin embargo, este compuesto está totalmente ausente si la cepa no contiene los dos plásmidos pAG1 y pYES_Delta24. La formación del 22-deshidrocolesterol es por lo tanto un proceso más rápido que el de la formación del colesterol, pero este proceso implica un precursor que desaparece rápidamente después de la inducción, dando lugar a la formación del colesterol. El colesterol se puede formar a partir del colesta-5,24 vía la Δ24-reductasa o a partir del colesta-5,7 vía la Δ7-reductasa. Por tanto, se ha demostrado que el colesta-5,7-dienol no se puede acumular debido a su conversión inmediata en colesta-5,7,22-trienol. La fuente de colesterol es por lo tanto el colesta-5,24-dienol que está ausente en el momento de la inducción y se acumula aproximadamente a las 4 a 8 horas de inducción antes de disminuir a aproximadamente las 24 horas (figura 5). Esto explica la aparición tardía del colesterol, ya que es necesaria la síntesis previa del colesta-5,24-dienol. Por el contrario, los dos precursores posibles del colesta-5,22-dienol son el colesta-5,7,22-trienol y el colesta-5,22,24-trienol. Este último está ausente al comienzo de la inducción (figura 4) mientras que el primero está presente y luego disminuye rápidamente en paralelo con la estabilización de la formación del colesta-5,22-dienol. Por lo tanto, se puede concluir que la fuente de colesterol es la reducción del 5,24-dienol por la Δ24-reductasa, mientras que la formación del colesta-5,22-dienol resulta de la reducción del 5,7,22-trienol por la Δ7reductasa. La formación del colesta-5,22-dienol por acción de la Δ22-desaturasa sobre el colesterol no está totalmente excluida, pero parece un proceso minoritario en base a la acumulación preferencial del colesterol en comparación con el colesta-5,22-dienol para tiempos largos (24 horas) de la cinética (figura 4 y 5).

<u>EJEMPLO 15</u>: Optimización de la vía de biosíntesis del colesterol, papel de la Δ22-desaturasa:

Para tiempos de inducción de la cepa WGIF04 del orden de 24 horas, la acumulación del colesta-5,22-dienol representa aproximadamente 50% de la del colesterol a niveles de los esteroles libres (figura 4). La ruptura del gen de la Δ22-desaturasa es una opción para optimizar la producción de colesterol. Se puede considerar perfectamente la construcción de una cepa con ruptura doble a nivel de la Δ 22-desaturasa (gen *erg5*) y del gen *erg6* y que expresa la Δ7-reductasa y la Δ24-reductasa. Se ha realizado una cepa que contiene el subconjunto: ruptura de la Δ22-desaturasa, expresión de la Δ7-reductasa y expresión de la Δ24-reductasa.

Esta cepa se ha obtenido por transformación de la cepa CA10 mediante el plásmido pYES_Delta24 por la técnica del cloruro de litio y por selección mediante la prototrofia hacia el uracilo. La cepa obtenida se ha denominado CA10/Δ24.

La cepa CA10 que expresa la Δ24-esterol reductasa produce una cantidad relativamente pequeña de colesterol (véanse las figura 6 y 7) y acumula de forma principal el ergosta 5-enol y de forma intermedia el ergosta-5,7-dienol. La acumulación del colesta-5,7-dienol es muy pequeña en tal cepa lo que indica que la ruptura del gen *erg6* es indispensable para la acumulación importante de derivados de la serie colesta-. La actividad de la Δ24-reductasa es por tanto, de forma inesperada, poco competitiva con la del producto del gen erg6. Se puede concluir por lo tanto de estos resultados que la ruptura simultánea de los genes *erg5* y *erg6* es importante con el fin de optimizar la producción de colesterol.

La ruptura del gen *erg5* en la cepa WGIF04 permitiría al experto aumentar de forma importante la producción de colesterol. La viabilidad de tal cepa se establece por la construcción de las cepas WGIF04 y CA10/Δ24 y por el hecho de que esta cepa no es sino una combinación genética evidente que se puede realizar de las dos cepas anteriores. Los datos procedentes de WGIF04 indican la desaparición de colesta 5,24 durante la expresión de la Δ 24-reductasa (comparando los resultados obtenidos con WGIF03 y los obtenidos con WGIF04). Esto permite predecir una síntesis muy eficaz de colesterol en una cepa con ruptura simultáneamente por los genes *erg5* y erg6, y que expresa conjuntamente la Δ7-reductasa y la Δ24-reductasa, siendo entonces el colesterol el único esterol terminal.

En conclusión, el mínimo requerido para la producción de colesterol con un umbral superior o igual a 20% de los esteroles totales es la ruptura del gen erg6 y la expresión de la Δ7-reductasa y de la Δ24-reductasa. La ruptura complementaria de la Δ22-desaturasa permitiría mejorar la productividad en colesterol y eliminar la formación parásita del colesta-5,22-dienol como esterol terminal.

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

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

A continuación las células se recuperan por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos. El residuo de las células se pone en suspensión en 50 mL de medio de Kappelli reciente que contiene 2% de galactosa no marcado con carbono ^{13}C. Los cultivos se finalizan 2 horas, 4 horas, 8 horas o 24 horas después del paso en galactosa, los esteroles se extraen y luego se analizan (véase el ejemplo 7). El paso de glucosa a galactosa provoca la inducción de los promotores GAL10/CYC1 que controlan a la vez el gen de la Δ7-reductasa y el de la Δ24-reductasa. Simultáneamente hay cambio de marcación isotópica de la fuente de carbono. Sigue la síntesis *de novo* de intermedios metabólicos y luego de esterol, incluyendo el colesterol, y que comprende un cambio progresivo de marcación. Este cambio de marcación puede caracterizarse por el perfil de masas de cada esterol intermedio. En efecto, la incorporación de cada átomo de ^{13}C induce un desplazamiento de la masa en una unidad de masa atómica (UMA). Así, por ejemplo, el colesterol aparece con una masa molar que varía de 386 a 413 dalton según el nivel de marcación. En el análisis por HPLC-masas, utilizando ionización positiva por electropulverización, esta corresponde a m/z (masa/carga) que varía de 369 a 396 (ión $M + H^+ - H_2O$, es decir M + 1 -18 = 385 - 17 = 369). Los tiempos de retención de los esteroles por HPLC no dependen de la forma detectable del nivel de marcación, el espectro de masas de un pico de HPLC correspondiente a un esterol «X» único, corresponde a una distribución de masas que es, por lo tanto, la superposición (la suma) de las distribuciones de masa del esterol «X» sintetizado a diferentes tiempos después de la marcación. Se trata por lo tanto de un perfil complejo (figura 11) pero perfectamente determinable experimentalmente, que representa una firma isotópica única que depende a la vez:

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

Este perfil isotópico tiene varias propiedades únicas:

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

En resumen, se ha inventado un «alfabeto isotópico» infalsificable, de uso general e incorporable en todo tipo de productos, incluidos los consumibles. Las «palabras isotópicas» que se pueden constituir a partir de tal alfabeto tienen un número casi ilimitado sacando provecho a la vez los perfiles de marcación y los diferentes tipos de esteroles. La incorporación de tales firmas en el seno de productos muy variados constituye por lo tanto un método

único de marcación infalsificable, contrariamente por ejemplo a las firmas de ADN que pueden reproducirse una vez que se conocen. Por otro lado, la firma se puede leer de forma no destructiva, por ejemplo por ionización láser seguida de análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF o similar).

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

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

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

La cepa CDR07 Mata se describe en la solicitud de patente publicada con el número WO02.061.109 y ha sido registrada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), calle Docteur Roux 25, 75.724 Paris Cedex 15, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest, en la CNCM el 24 de enero de 2001 con el número de orden I-2616.

La cepa CDR07 MATa (marcadores pertinentes: ade2::GAL10/$CYC1_p$::Δ^7 ; *erg5::PGK1*$_p$::hygro^R ; *ERG6*) se ha cruzado con la cepa WGIF01 descrita en el ejemplo 1 (marcadores pertinentes: *ERG5; erg6 ::TRP1*).

Después de la esporulación del diploide, se determina la composición en esteroles de las esporas para encontrar las esporas que producen desmosterol que es el precursor del colesterol como se ha descrito en el ejemplo 6. Se ha identificado así una espora que produce desmosterol y que posee un gen *TRP1* funcional y que contiene el cADN de la Δ7reductasa de la *Arabidopsis thaliana,* así como se ha indicado para el análisis por PCR. Además, esta cepa denominada YIM59, es sensible a la higromicina indicando que el gen *ERG5* es funcional.

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

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

La secuencia que corresponde al NH_2 terminal de la DHCR24 reductasa en fusión con el promotor CYC1 se ha modificado como sigue:

tagcgtggatggccaggcaactttagtgctgacacatacaggcatatatatatgtgtgcgacgacacatgatcatatggcatg

catgtgctctgtatgtatataaaactcttgttttcttcttttctctaaatattctttccttatacattaggtcctttgtagcataaattacta

tacttctatagacacgcaaacacaaaggaattgacaagtttgtacaaaaaagcaggctaaaaaATGGAACCTGCC

GTGTCGCTGGCCGTGTGCG (SEQ ID N° 7).

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

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

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

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

Depósito de material biológico

Los organismos siguientes se han depositado el 22 de abril de 2004 ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), calle Docteur Roux 25, 75724 París Cedex 15, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest.

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

Bibliografía:

- Adams, A.K., y C. Holm. 1996. Mol Cell Biol. 16: 4.614-20.
- Ausubel Fred M., Brent Roger, Kingston Robert E., Moore David D., Seidman J. G., Smith John A., Struhl Kevin (Editores). Current Protocols in Molecular Biology, publicado por John Wiley & Sons Inc. Current Protocols Customer Service, 605 Third Avenue, 9th Floor Nueva York, NY 10158 EE.UU. (edición actualizada en Marzo de 2002).
- Baudin-Baillieu, A., E. Guillemet, C. Cullin, y F. Lacroute. 1997. Yeast. 13: 353-6.
- Bonneaud, N., O. Ozier-Kalogeropoulos, G.Y. Li, M. Labouesse, L. Minvielle-Sebastia, y F. Lacroute. 1991. Yeast. 7: 609-15.
- Bowman, S. et al.. 1997. *Nature.* 387: 90-3.
- Duport, C., B. Schoepp, E. Chatelain, R. Spagnoli, B. Dumas, y D. Pompon. 2.003. Eur J Biochem. 270: 1.502-14.
- Gietz, R.D., R.H. Schiest1, A.R. Willems, y R.A. Woods. 1995. Yeast. 11: 355-60.
- Goffeau, A., et al.. 1996. *Science.* 274: 546.563.-7
- Jensen-Pergakes, K.L., M.A. Kennedy, N.D. Lees, R. Barbuch, C. Koegel, y M. Bard. 1998. Antimicrob Agents Chemother. 42:1160-7.
- Kaneshiro, E.S., J.A. Rosenfeld, M. Basselin-Eiweida, J.R. Stringer, S.P. Keely, A.G. Smulian, y J.L. Giner. 2002. Mol Microbiol. 44: 989-99.
- Kappeli, O., M. Arreguin, y M. Rieger. 1985. J Gen Microbiol. 131: 1411-6.
- Kelly, S.L., D.C. Lamb, B.C. Baldwin, A.J. Corran, y D.E. Kelly. 1997. J Biol Chem. 272: 9.986-8.
- Lecain, E., X. Chenivesse, R. Spagnoli, y D. Pompon. 1996. J Biol Chem. 271: 10.866-73.
- McCammon, M.T., M.A. Hartmann, C.D. Bottema, y L.W. Parks. 1984. J Bacteriol. 157:475-83.
- Moebius, F.F., B.U. Fitzky, J.N. Lee, Y.K. Paik, y H. Glossmann. 1998. Proc Natl Acad Sci U S A. 95: 1899-902.
- Noda, H., y Y. Koizumi. 2.003. Insect Biochem Mol Biol. 33: 649-58.
- Ozier-Kalogeropoulos, O., A. Malpertuy, J. Boyer, F. Tekaia, y B. Dujon. 1998. Nucleic Acids Res. 26:5511-24.
- Skaggs, B.A., J.F. Alexander, C.A. Pierson, K.S. Schweitzer, K.T. Chun, C. Koegel, R. Barbuch, y M. Bard. 1996. *Gene.* 169: 105-9.
- Sturley, S.L. 2000. Biochim Biophys Acta. 1529: 155-63.
- Szczebara, F. M., et al.. 2.003. Nat Biotechnol. 21: 143-9.

- Tait, E., M.C. Simon, S. King, A.J. Brown, N.A. Gow, y D.J. Shaw. 1997. Fungal Genet Biol. 21: 308-14.
- Taton, M., y A. Rahier. 1991. Biochem Biophys Res Commun. 181:465-73.
- Taylor, F.R., y L.W. Parks. 1.978. J Bacteriol. 136:531-7.
- Waterham, H.R., J. Koster, G.J. Romeijn, R.C. Hennekam, P. Vreken, H.C. Andersson, D.R. FitzPatrick, R.I. Kelley, y R.J. Wanders. 2001. Am J Hum Genet. 69:685-94.
- Wood, V., et al. 2002. *Nature.* 415: 871-80.

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

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

LISTADO DE SECUENCIA

<110> Aventis Pharma S.A.

<120> Cepas de levadura que producen colesterol y sus aplicaciones

<130> PRJ02025

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<400> 1

cctagcgacg aaaagcatca ttggagtgaa taacttggac ttaccattct tagcattttg 60

acg 63

<210> 2
<211> 68

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<400> 2

gcataagagt gaaacagaat tgagaaaaag acaggcccaa ttcaaattcg ggtcgaaaaa 60

agaaaagg 68

<210> 3
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<400> 3

agggccgaac aaagccccga tcttc 25

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<400> 4

ggcaaaccga ggaactcttg 21

<210> 5
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<400> 5

tatatagcgg ccgctttcgc tgattaatta ccccag 36

<210> 6
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<400> 6

tatatagcgg ccgcgagaag tgacgcaagc atca 34

<210> 7
<211> 270
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<400> 7

tagcgtggat ggccaggcaa ctttagtgct gacacataca ggcatatata tatgtgtgcg 60

acgacacatg atcatatggc atgcatgtgc tctgtatgta tataaaactc ttgttttctt 120

cttttctcta aatattcttt ccttatacat taggtccttt gtagcataaa ttactatact 180

tctatagaca cgcaaacaca aaggaattga caagtttgta caaaaaagca ggctaaaaaa 240

tggaacctgc cgtgtcgctg gccgtgtgcg 270

REIVINDICACIONES

1. Cepa de levadura que produce demosterol, caracterizada por que no posee copia funcional del gen que codifica la enzima 24-C-metiltransferasa (erg6) y por que expresa la enzima heteróloga 7-dehidrocolesterol reductasa.

2. Cepa de levadura según la reivindicación 1 en la que el gen que codifica la enzima 24-C-metiltransferasa está inactivado.

3. Utilización de una cepa según una de las reivindicaciones 1 o 2, para producir demosterol.

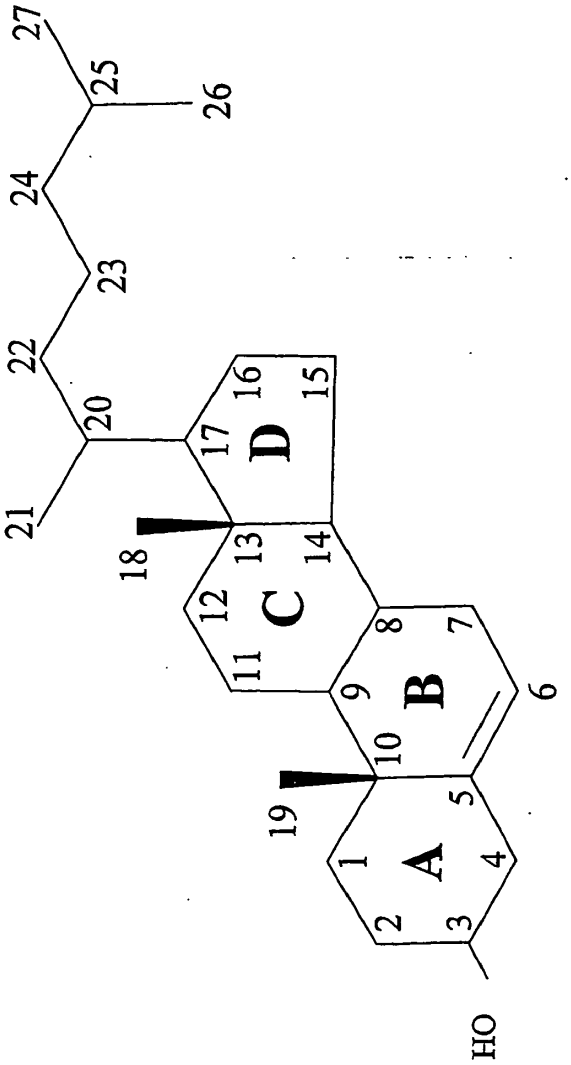
HO
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
A
B
C
D

FIG. 1

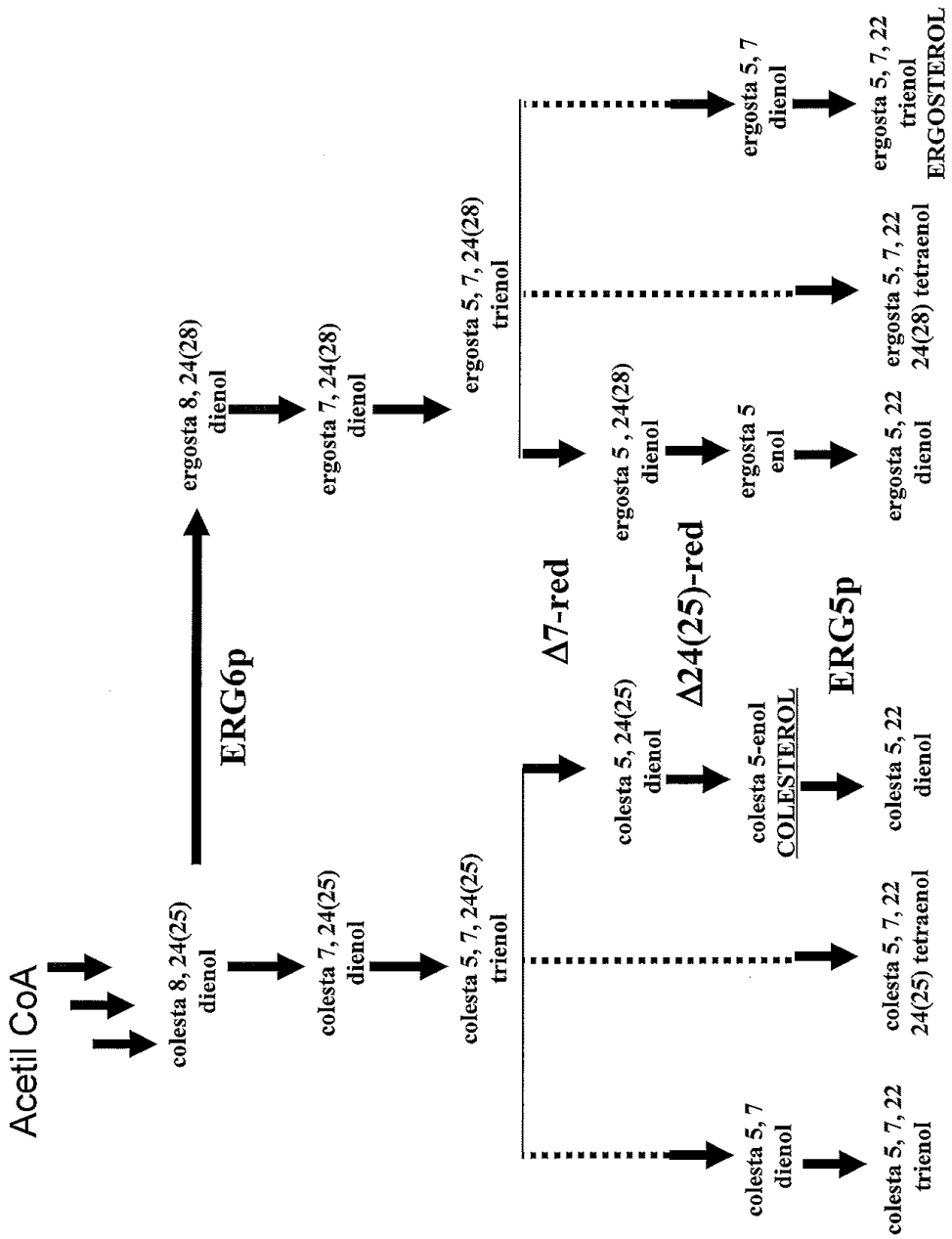
Acetil CoA
colesta 8, 24(25) dienol
ERG6p
ergosta 8, 24(28) dienol
colesta 7, 24(25) dienol
ergosta 7, 24(28) dienol
colesta 5, 7, 24(25) trienol
ergosta 5, 7, 24(28) trienol
colesta 5, 7 dienol
colesta 5, 7, 22 trienol
colesta 5, 7, 22 24(25) tetraenol
colesta 5, 24(25) dienol
Δ7-red
ergosta 5 , 24(28) dienol
colesta 5-enol
COLESTEROL
Δ24(25)-red
ergosta 5 enol
colesta 5, 22 dienol
ERG5p
ergosta 5, 22 dienol
ergosta 5, 7 dienol
ergosta 5, 7, 22 24(28) tetraenol
ergosta 5, 7, 22 trienol
ERGOSTEROL

FIG. 2

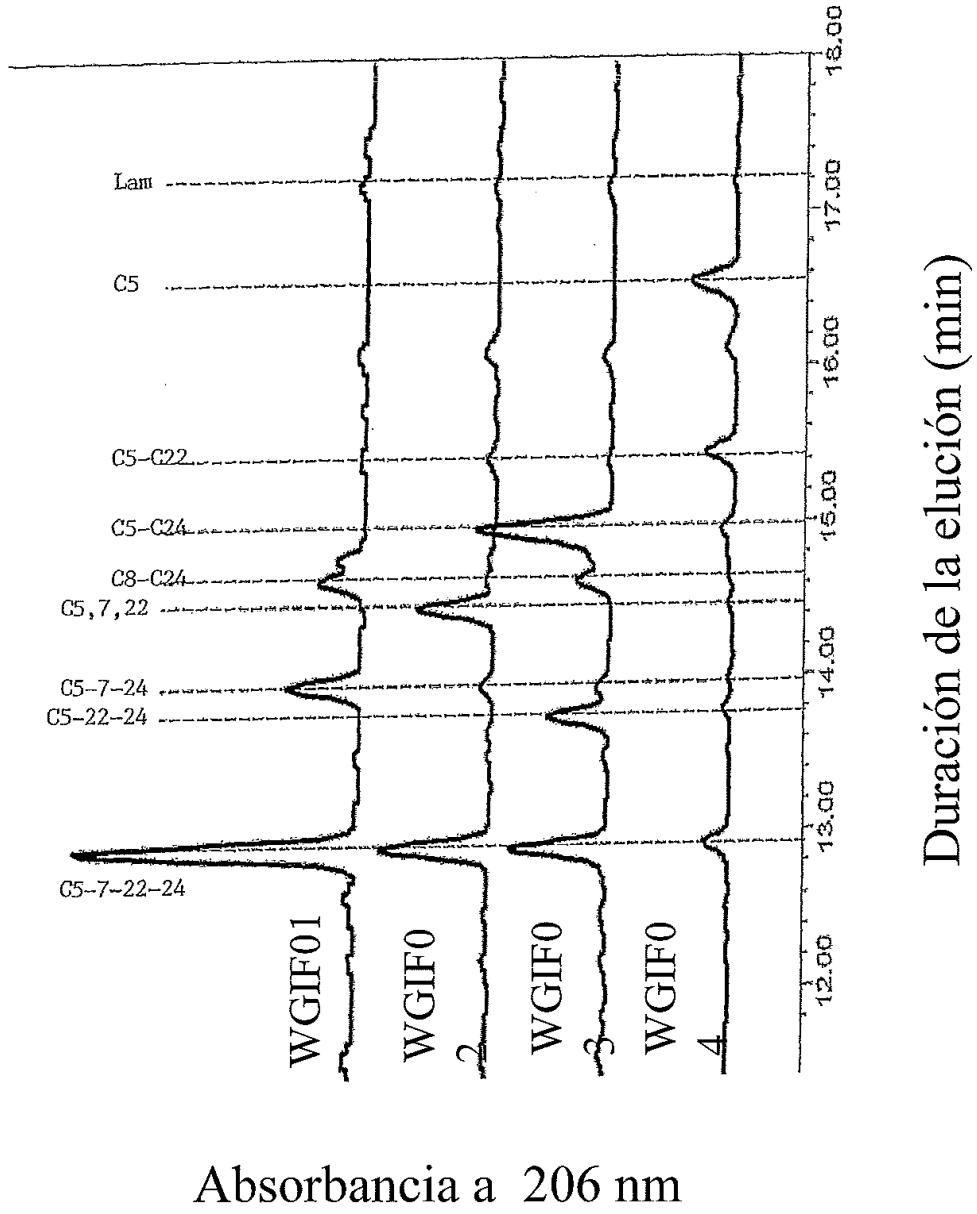
Lam
C5
C5-C22
C5-C24
C8-C24
C5,7,22
C5-7-24
C5-22-24
C5-7-22-24
WGIF01
WGIF0 2
WGIF0 3
WGIF0 4
12.00
13.00
14.00
15.00
16.00
17.00
18.00
Duración de la elución (min)
Absorbancia a 206 nm

FIG. 3

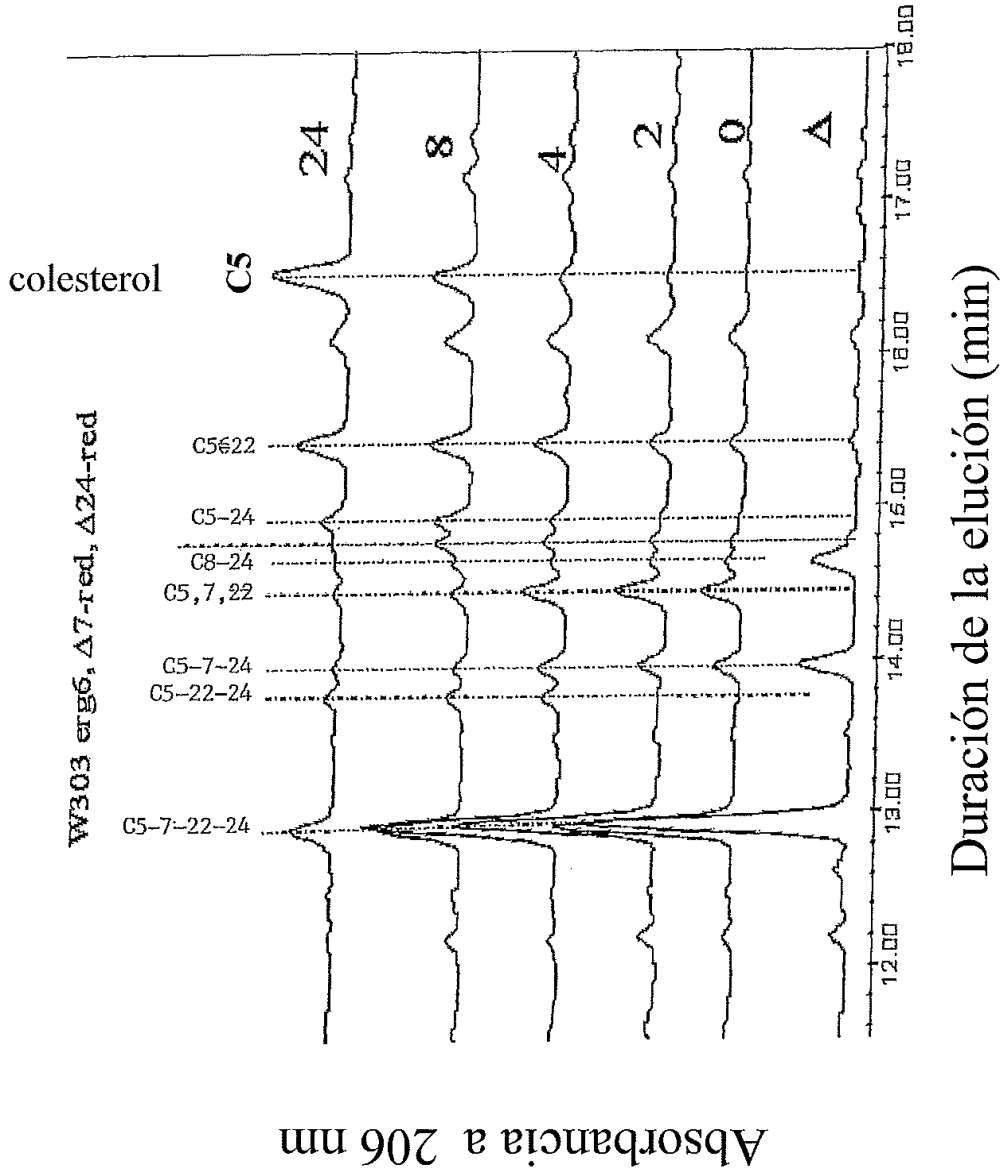
W303 erg6, Δ7-red, Δ24-red
colesterol
C5
C5-7-22-24
C5-7-24
C5-22-24
C5,7,22
C8-24
C5-24
C5-22
24
8
4
2
0
Δ
12.00
13.00
14.00
15.00
16.00
17.00
18.00
Absorbancia a 206 nm
Duración de la elución (min)

FIG. 4

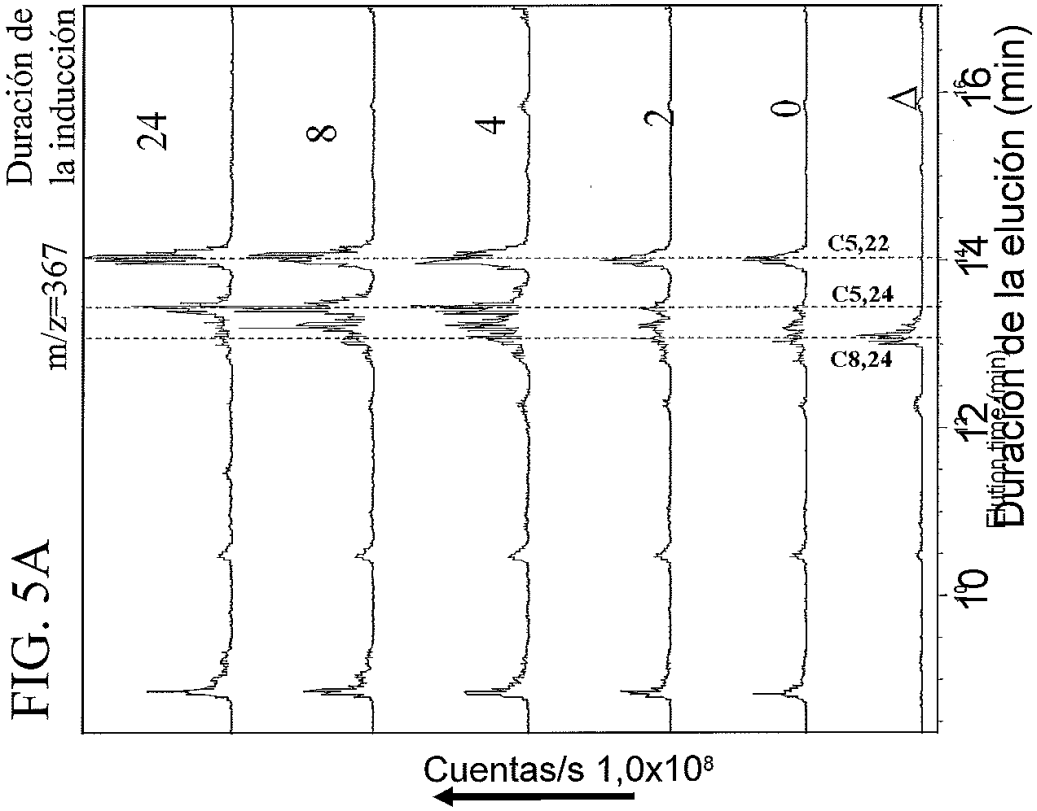
FIG. 5A
m/z=367
Duración de la inducción
24
8
4
2
0
Δ
C5,22
C5,24
C8,24
10
12
14
16
Duración de la elución (min)
Cuentas/s 1,0x10⁸

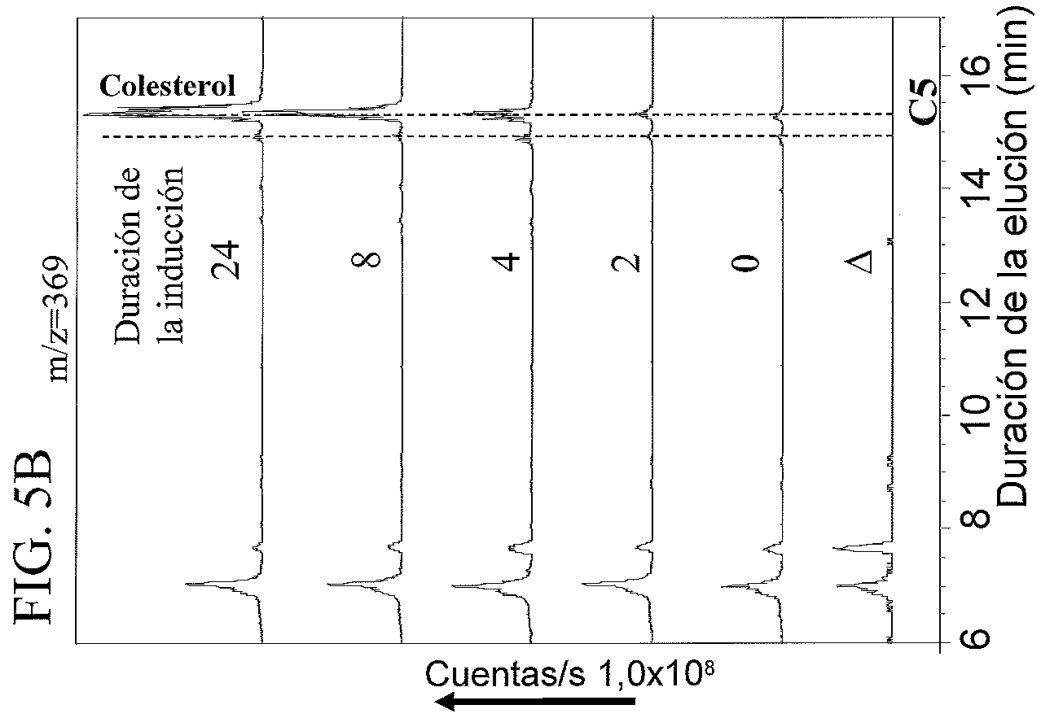
FIG. 5B
m/z=369
Duración de la inducción
Colesterol
24
8
4
2
0
Δ
C5
6
8
10
12
14
16
Duración de la elución (min)
Cuentas/s 1,0x10⁸

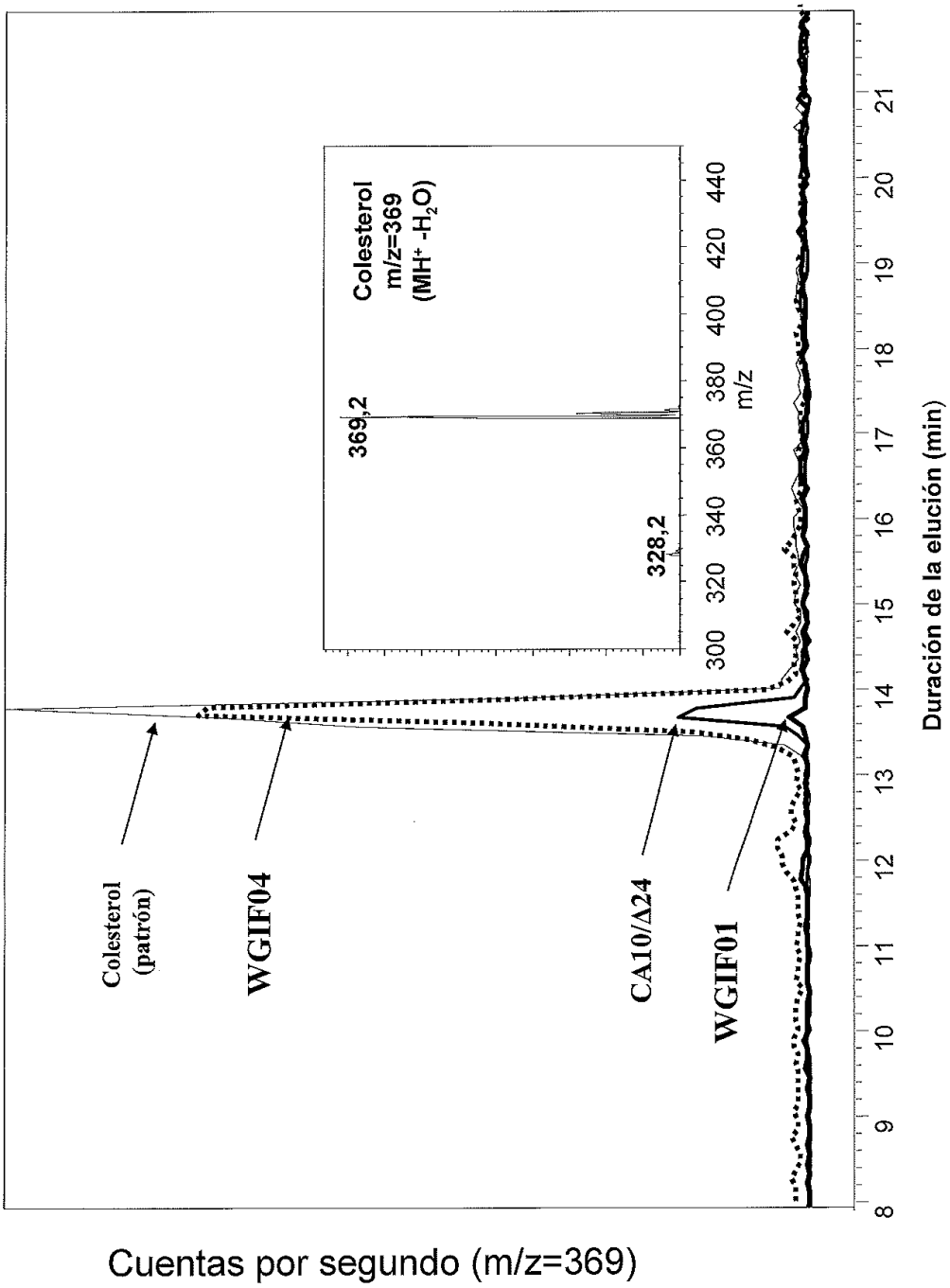
Colesterol (patrón)
WGIF04
CA10/Δ24
WGIF01
Colesterol m/z=369 (MH+ -H2O)
369,2
328,2
300 320 340 360 380 400 420 440
m/z
8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
Duración de la elución (min)
Cuentas por segundo (m/z=369)

FIG. 6

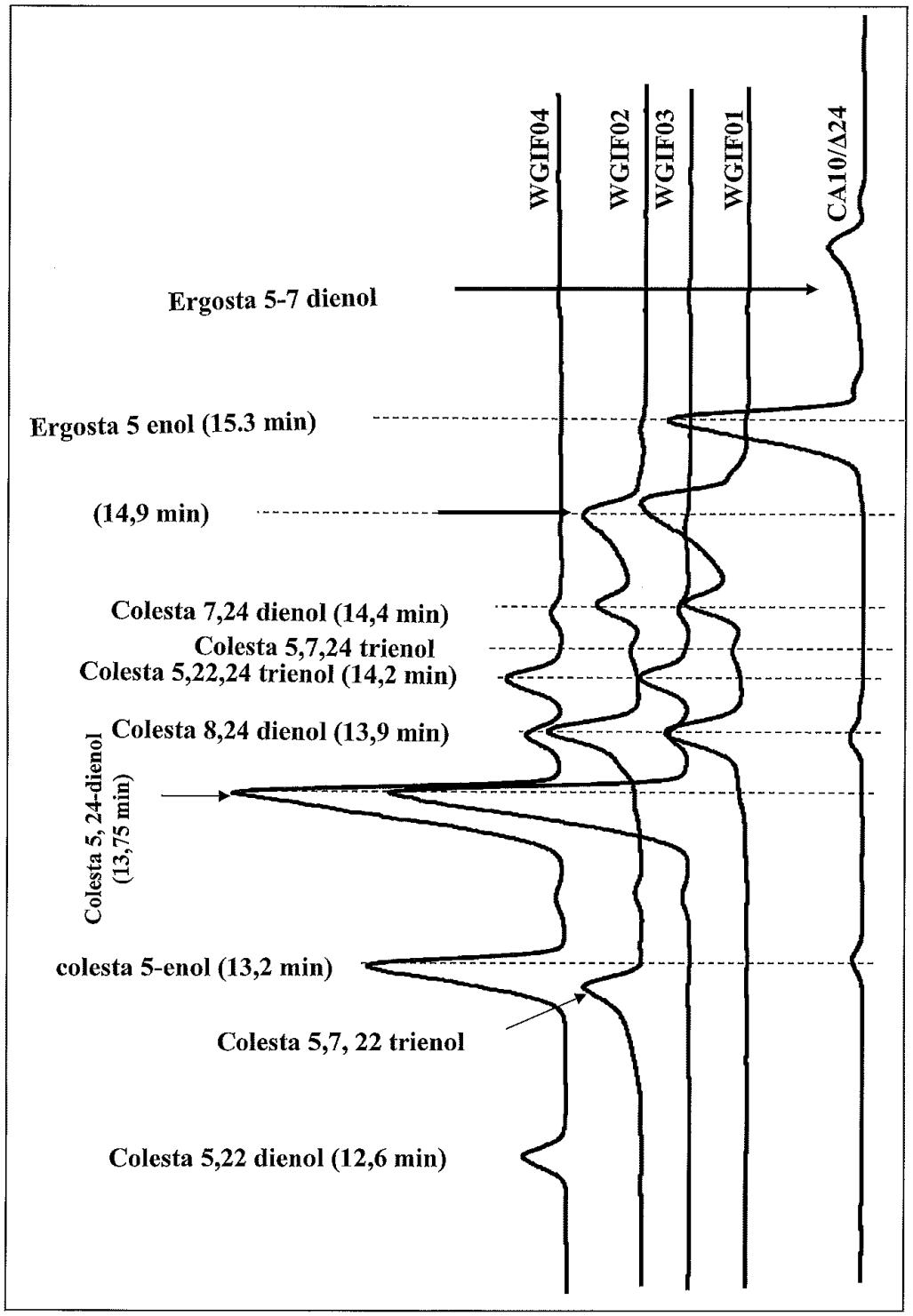
WGIF04
WGIF02
WGIF03
WGIF01
CA10/Δ24
Ergosta 5-7 dienol
Ergosta 5 enol (15.3 min)
(14,9 min)
Colesta 7,24 dienol (14,4 min)
Colesta 5,7,24 trienol
Colesta 5,22,24 trienol (14,2 min)
Colesta 8,24 dienol (13,9 min)
Colesta 5, 24-dienol (13,75 min)
colesta 5-enol (13,2 min)
Colesta 5,7, 22 trienol
Colesta 5,22 dienol (12,6 min)

FIG. 7

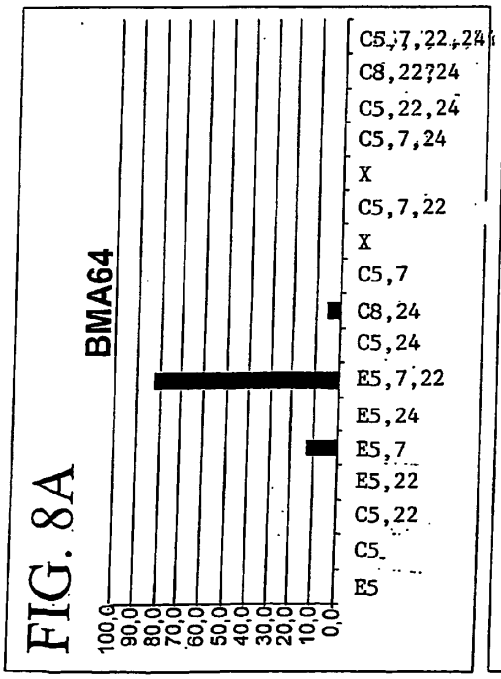

FIG. 8A

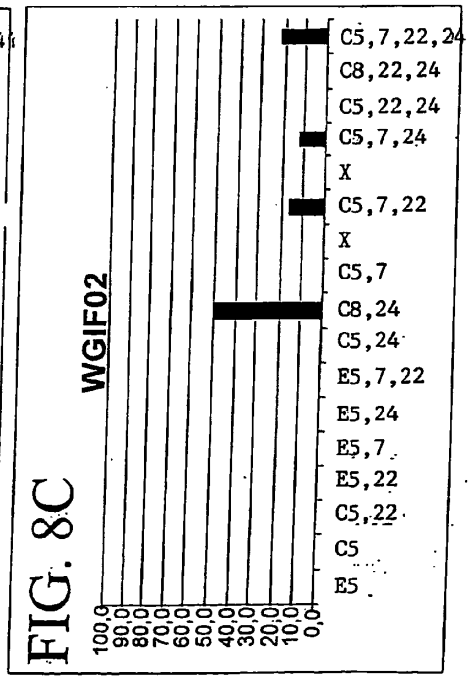

FIG. 8C

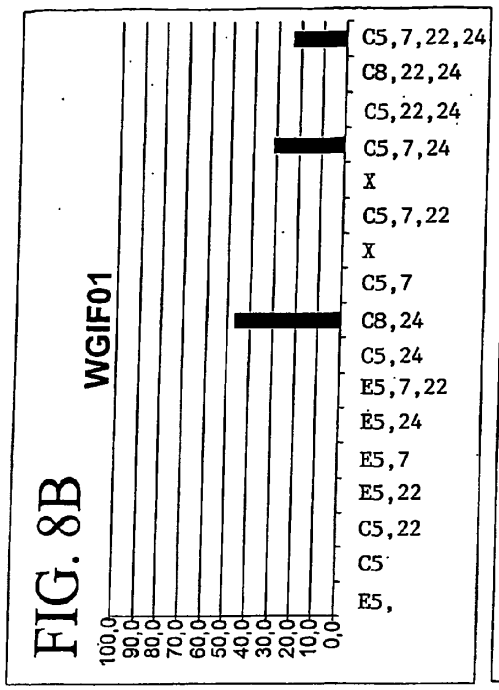

FIG. 8B

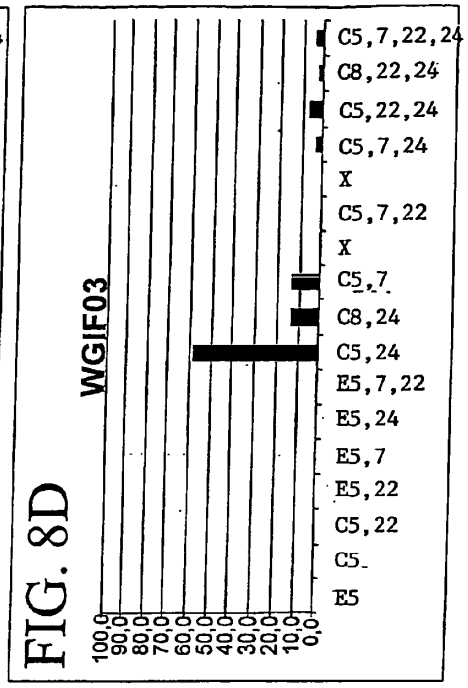

FIG. 8D

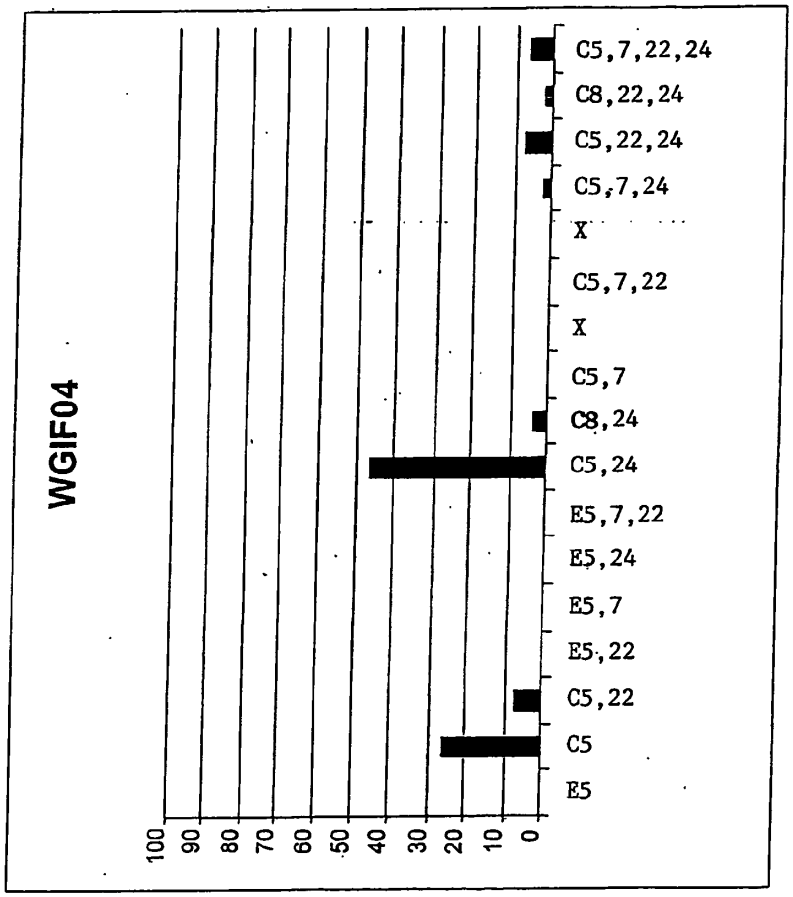
WGIF04
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
C5,7,22,24
C8,22,24
C5,22,24
C5,7,24
X
C5,7,22
X
C5,7
C8,24
C5,24
E5,7,22
E5,24
E5,7
E5,22
C5,22
C5
E5

FIG. 9

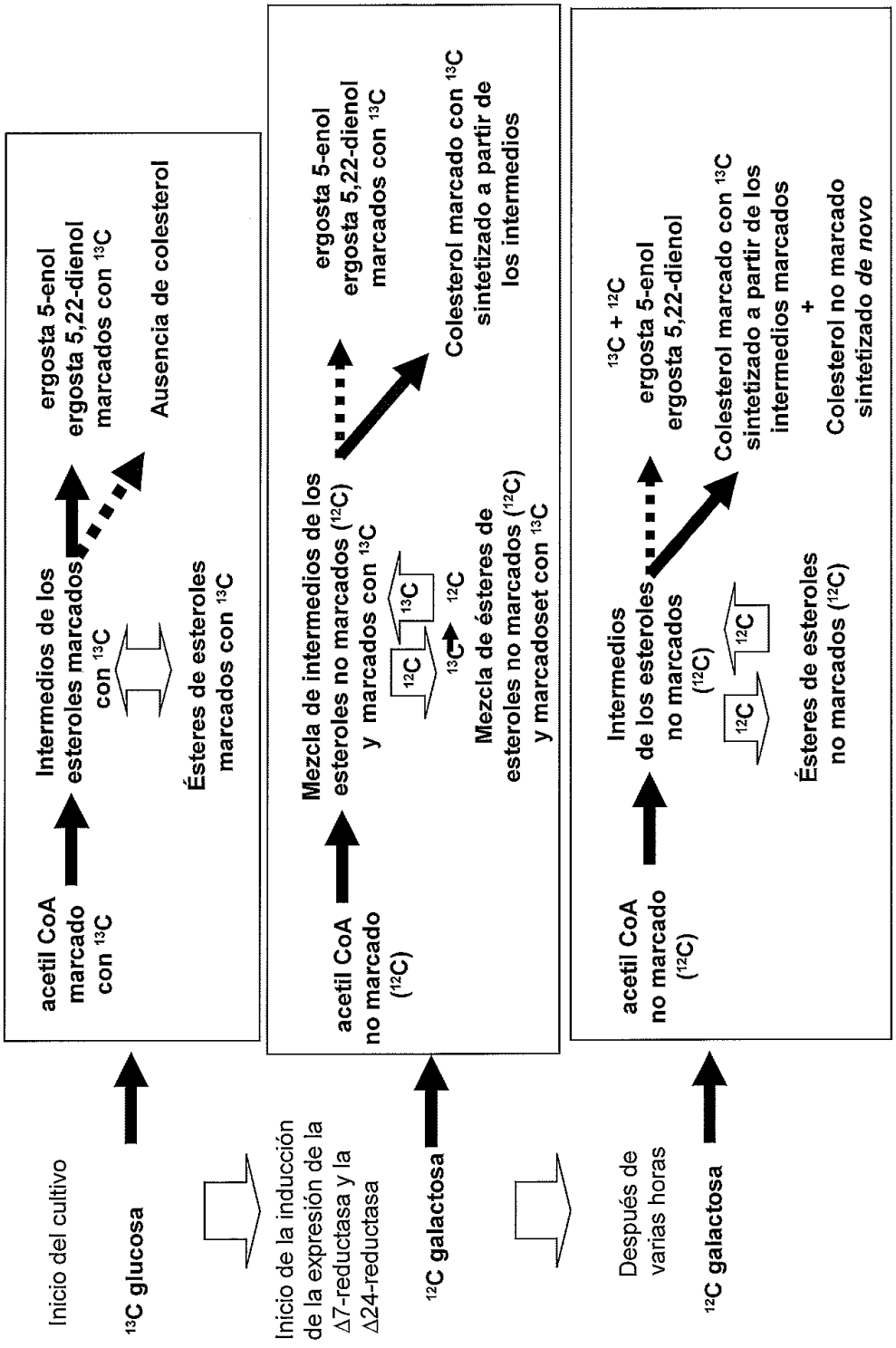
Inicio del cultivo
13C glucosa
acetil CoA marcado con 13C
Intermedios de los esteroles marcados con 13C
ergosta 5-enol ergosta 5,22-dienol marcados con 13C
Ausencia de colesterol
Ésteres de esteroles marcados con 13C
Inicio de la inducción de la expresión de la Δ7-reductasa y la Δ24-reductasa
12C galactosa
acetil CoA no marcado (12C)
Mezcla de intermedios de los esteroles no marcados (12C) y marcados con 13C
ergosta 5-enol ergosta 5,22-dienol marcados con 13C
Colesterol marcado con 13C sintetizado a partir de los intermedios
12C
13C
13C
12C
Mezcla de ésteres de esteroles no marcados (12C) y marcadoset con 13C
Después de varias horas
12C galactosa
acetil CoA no marcado (12C)
Intermedios de los esteroles no marcados (12C)
13C + 12C ergosta 5-enol ergosta 5,22-dienol
Colesterol marcado con 13C sintetizado a partir de los intermedios marcados
+
Colesterol no marcado sintetizado de novo
12C
12C
Ésteres de esteroles no marcados (12C)

FIG. 10

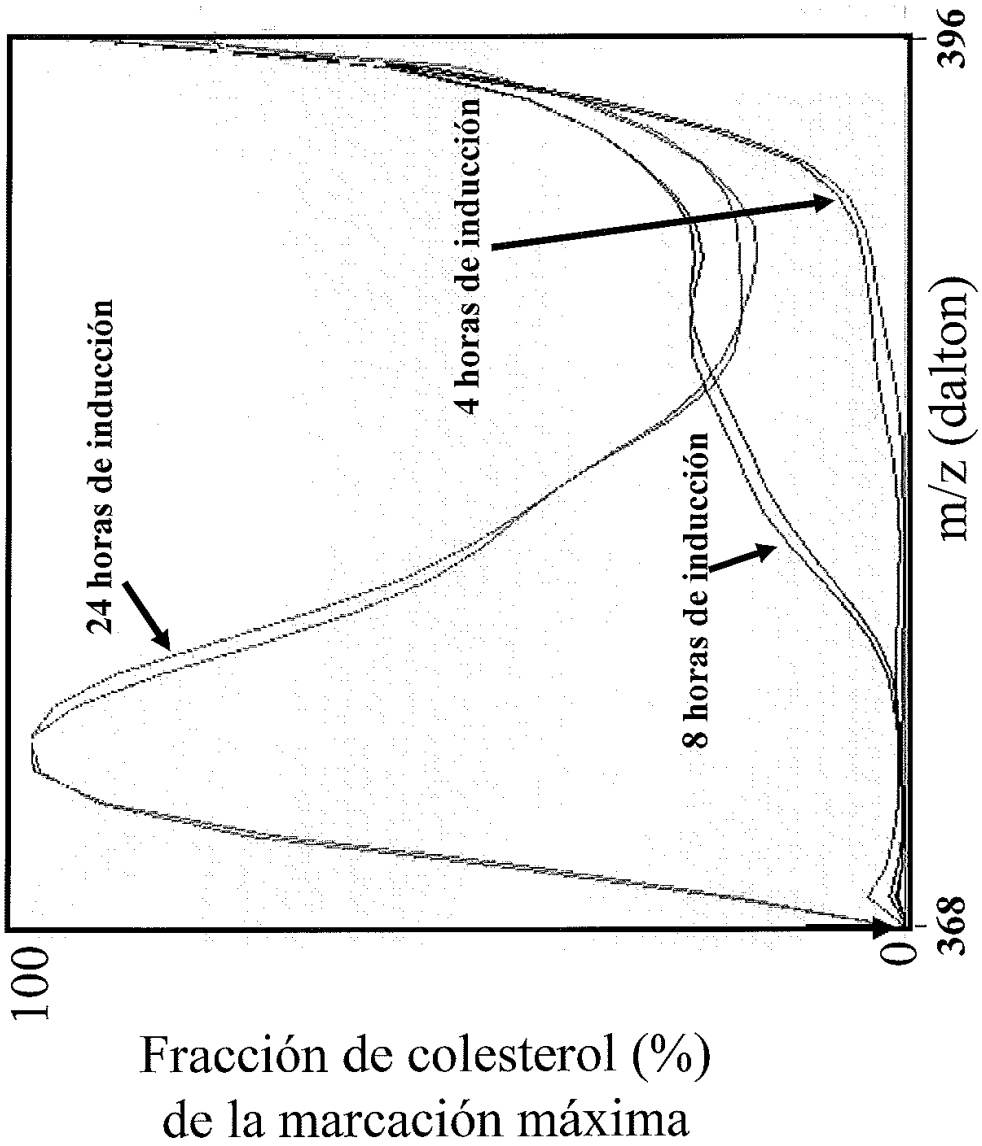
100
Fracción de colesterol (%)
de la marcación máxima
24 horas de inducción
4 horas de inducción
8 horas de inducción
0
368
396
m/z (dalton)

FIG. 11

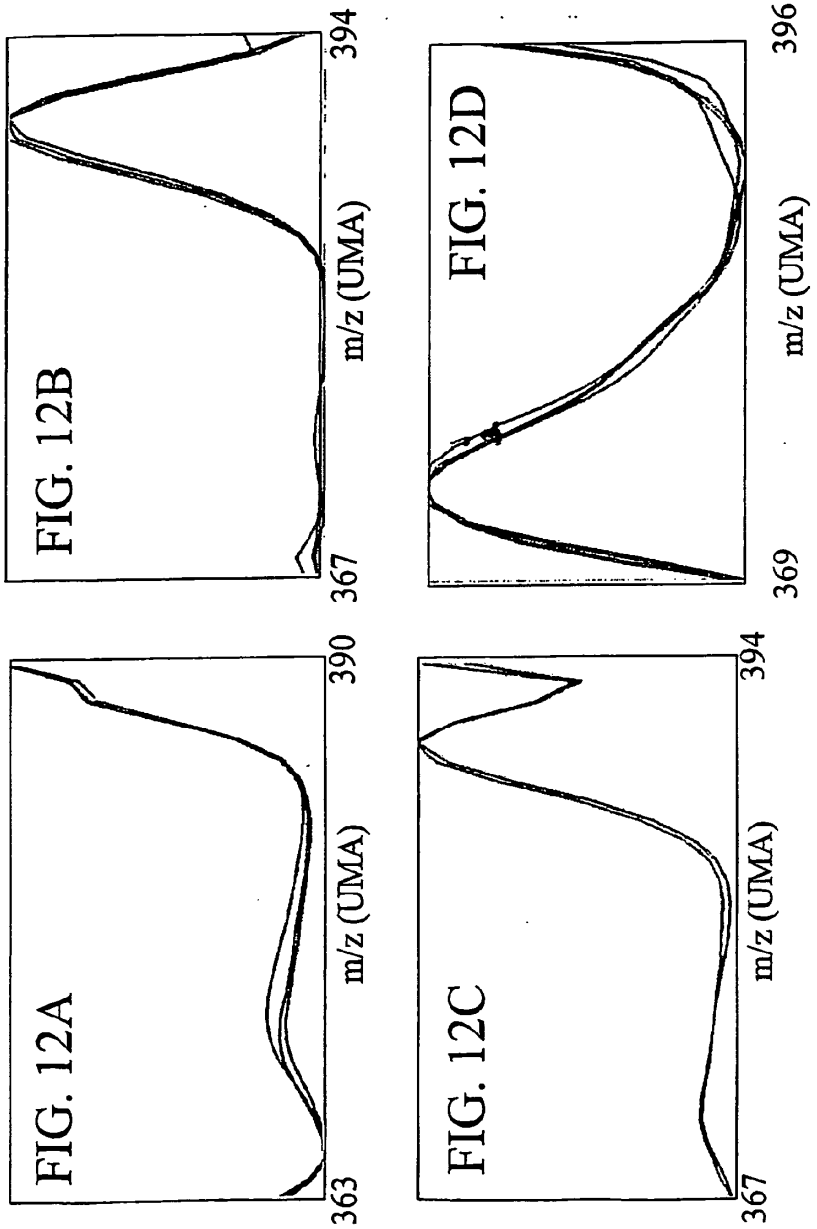
FIG. 12A
363
390
m/z (UMA)
FIG. 12B
367
394
m/z (UMA)
FIG. 12C
367
394
m/z (UMA)
FIG. 12D
369
396
m/z (UMA)

FIG. 12

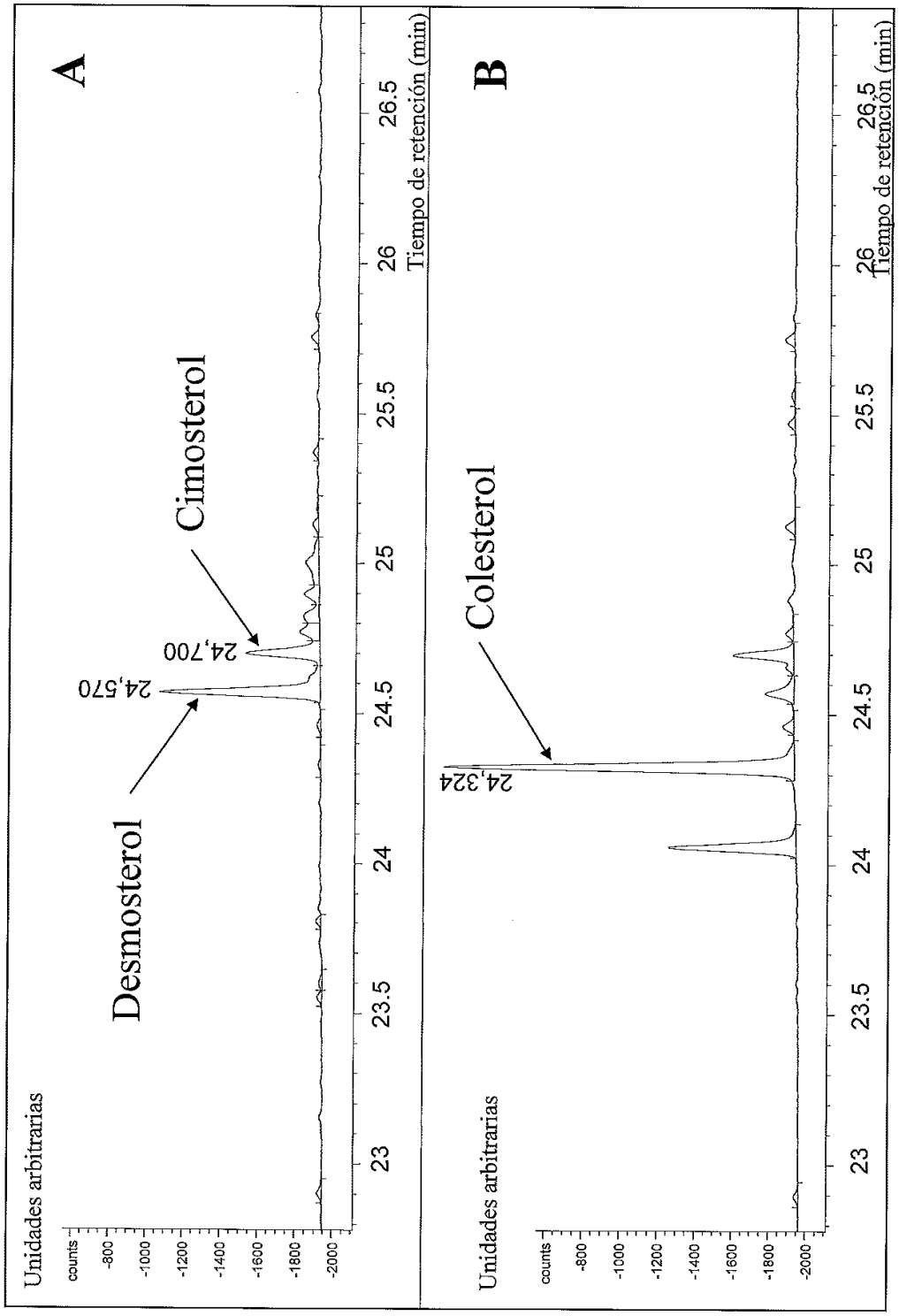
A
Desmosterol
24,570
Cimosterol
24,700
Unidades arbitrarias
counts
-800
-1000
-1200
-1400
-1600
-1800
-2000
23
23.5
24
24.5
25
25.5
26
26.5
Tiempo de retención (min)
B
Colesterol
24,324
Unidades arbitrarias
counts
-800
-1000
-1200
-1400
-1600
-1800
-2000
23
23.5
24
24.5
25
25.5
26
26.5
Tiempo de retención (min)

FIG. 13