

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 259**

51 Int. Cl.:

**C12P 33/00** (2006.01)

**C07J 9/00** (2006.01)

**C07C 401/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2015 PCT/JP2015/050755**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15108058**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2015 E 15737840 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3095874**

54 Título: **Método de fabricación de 7-deshidrocolesterol y vitamina D3**

30 Prioridad:

**17.01.2014 JP 2014006698**

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

**07.07.2020**

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO BIO CO., LTD. (100.0%)  
1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**UJIHARA, TETSURO y  
MITSUHASHI, SATOSHI**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 772 259 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**

Método de fabricación de 7-deshidrocolesterol y vitamina D3.

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir 7-deshidrocolesterol (en adelante, se hace referencia asimismo como "7DHC") utilizando microorganismos de Labyrinthulea, y a un procedimiento para producir vitamina D3 que comprende irradiar, con luz ultravioleta, el 7DHC producido mediante el procedimiento de producción.

**Antecedentes de la técnica**

La vitamina D3 es una vitamina que participa en diversas funciones, incluyendo el metabolismo y el mantenimiento de la homeostasis del calcio y del fósforo, y la formación ósea, y en el cuerpo humano se produce a partir del colesterol. Sin embargo, debido a que la cantidad de vitamina D3 producida en el cuerpo es más pequeña que las cantidades requeridas, la vitamina D3 necesita ingerirse en alimentos, productos farmacéuticos o complementos.

La vitamina D3 contenida en productos farmacéuticos y complementos se produce principalmente mediante irradiación ultravioleta de 7DHC producida mediante transformación química a partir de colesterol obtenido a partir de lana. Sin embargo, la utilización de materiales de origen animal a modo de materiales de origen de productos farmacéuticos y complementos tiende a evitarse debido a inquietudes sobre la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y las zoonosis, y existe una necesidad de vitamina D3 de origen no animal. La vitamina D3 de origen no animal puede producirse mediante irradiación ultravioleta de 7DHC de origen no animal.

Generalmente, los esteroides producidos por microorganismos son ergosteroides. Sin embargo, algunos oomicetos y el microorganismo de Labyrinthulea es conocido que producen colesterol (documentos no de patente nº 1 a nº 3). El 7DHC se convierte en colesterol mediante la acción de la 7DHC reductasa. Por lo tanto, teóricamente resulta posible producir 7DHC de origen no animal mediante la reducción o eliminación de la actividad reductora de 7DHC en dichos microorganismos y utilizando los mismos para la producción fermentativa o similar.

Sin embargo, existen informes de que no se acumula una cantidad significativa de 7DHC en el ser humano, ratones y levaduras en gemación. Específicamente, existen informes de que en seres humanos y en ratones, la producción de 7DHC que implica una pérdida de actividad reductora de 7DHC causa la descomposición de la HMG-CoA reductasa, que cataliza la etapa limitadora de la velocidad de síntesis del colesterol, y reduce significativamente la acumulación de 7DHC (documentos no de patente nº 4 a nº 6). Respecto a las levaduras en gemación, existe un informe de que la producción de 7DHC que implica la introducción de 7DHC reductasa reduce significativamente la acumulación de 7DHC (documento no de patente nº7).

Además, existen informes de que una pérdida de la actividad reductora de 7DHC causa el síndrome de Smith-Lemli-Opitz en seres humanos (documento no de patente nº 8) y la expresión de un fenotipo enano en plantas (documento no de patente nº 9). Es decir, se cree que una reducción o una pérdida de la actividad reductora de 7DHC presenta un efecto adverso sobre el crecimiento del organismo hospedante.

**45 Técnica relacionada**

Documento no de patente

Documento no de patente nº 1: Exp. Mycol. 13:183-195, 1989.  
 Documento no de patente nº 2: Lipids 32:839-845, 1997.  
 Documento no de patente nº 3: J. Am. Oil Chem. Soc. 89:135-143, 2012.  
 Documento no de patente nº 4: J. Clin. Invest. 108:905-915, 2001.  
 Documento no de patente nº 5: J Lipid Res. 41:1437-1447, 2000.  
 Documento no de patente nº 6: J. Lipid Res. 41: 637-646, 2000.  
 Documento no de patente nº 7: Yeast Lipid Conference, resúmenes (2007), Internet <URL: <http://aperto.unito.it/handle/2318/209#.Uq5WatJdW4E>>  
 Documento no de patente nº 8: Am. J. Hum. Genet. 63:55-62, 1998.  
 Documento no de patente nº 9: Plant J. 21:431-443, 2000.

**60 Divulgación de la invención**

Problemas que debe resolver la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir eficientemente 7DHC mediante la utilización de un microorganismo de Labyrinthulea, y un procedimiento para producir vitamina D3 que comprende irradiar con luz ultravioleta el 7DHC producido mediante el procedimiento de producción.

**Medios para resolver los problemas**

La presente invención se refiere a (1) a (3) a continuación.

(1) Un procedimiento para producir 7-deshidrocolesterol (en adelante, "7DHC"), que comprende:

cultivar, en un medio, un microorganismo de Labyrinthulea productor de 7DHC en el que la actividad reductora de 7DHC está reducida o se ha perdido en comparación con una cepa madre, por supresión, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen que está presente en el ADN cromosómico de la cepa madre y que codifica una proteína que presenta actividad reductora de 7DHC, y en el que el microorganismo produce 7DHC,

dejar que se produzca 7DHC y se acumule en el cultivo, y recoger el 7DHC a partir del cultivo, en el que el gen codificante de la proteína con actividad reductora de 7DHC es un gen que presenta cualquiera de los ADN [1] a [6] a continuación:

[1] un ADN codificante de una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 2,

[2] un ADN codificante de una proteína mutada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 2 por supresión, sustitución o adición de 1 a 20 aminoácidos y que presenta actividad reductora de 7DHC,

[3] un ADN codificante de una proteína homóloga que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 2 y que presenta actividad reductora de 7DHC,

[4] un ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID nº 1,

[5] un ADN que se hibrida con ADN que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína homóloga que presenta actividad reductora de 7DHC, y

[6] un ADN que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia de bases representada por SEC ID nº 1 y codificante de una proteína homóloga que presenta actividad reductora de 7DHC.

(2) El procedimiento de producción indicado en (1), anteriormente, en el que el microorganismo es un microorganismo de Labyrinthulea del género *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Parietichytrium*, *Labyrinthula*, *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Japonochytrium*, *Labyrinthuloides*, *Ulkenia*, *Oblongichytrium*, *Botryochytrium* o *Sicyoidochytrium*.

(3) Un procedimiento para producir vitamina D3, que comprende (i) producir 7DHC según el método indicado en cualquiera de (1) a (2) anteriormente, y (2) irradiar el 7DHC con luz ultravioleta.

**Efectos de la invención**

Según la presente invención, puede proporcionarse un procedimiento para producir eficientemente 7DHC utilizando un microorganismo de Labyrinthulea y un procedimiento para producir vitamina D3 que comprende irradiar, con luz ultravioleta, el 7DHC producido mediante el procedimiento de producción.

**Formas de realización para poner en práctica la invención****1. Microorganismo de Labyrinthulea utilizado en el procedimiento de producción de la presente invención**

El microorganismo de Labyrinthulea utilizado en el procedimiento de producción de la presente invención es un Labyrinthulea productor de 7DHC en el que la actividad reductora de 7DHC está reducida o se ha perdido en comparación con una cepa madre por supresión, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen que está presente en el ADN cromosómico de la cepa madre y que codifica una proteína que presenta actividad reductora de 7DHC, y el microorganismo produce 7DHC.

En la presente memoria, "cepa madre" se refiere a una cepa original sometida a modificación génica, transformación y similar. Una cepa original sometida a transformación mediante introducción génica asimismo se denomina "cepa hospedante".

La cepa madre no se encuentra particularmente limitada, con la condición de que sea un microorganismo de Labyrinthulea capaz de producir colesterol en una medida en que pueda recolectarse de las células o del medio después del cultivo en un medio. Entre los ejemplos preferentes se incluyen microorganismos de Labyrinthulea de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Parietichytrium*, *Labyrinthula*, *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Japonochytrium*, *Labyrinthuloides*, *Ulkenia*, *Oblongichytrium*, *Botryochytrium*, o *Sicyodochytrium*. Entre más ejemplos preferidos se incluyen microorganismos de Labyrinthulea de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium*, o *Parietichytrium*. Entre los ejemplos preferidos adicionales se incluyen *Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381, *Thraustochytrium aureum* ATCC34304, *Thraustochytrium* sp. ATCC26185, *Schizochytrium* sp. AL1Ac, *Schizochytrium aggregatum* ATCC28209, *Ulkenia* sp. ATCC 28207, *Schizochytrium* sp. SEK210 (NBRC 102615), *Schizochytrium* sp. SEK345 (NBRC 102616), *Botryochytrium radiatum* SEK353 (NBRC 104107), y *Parietichytrium sarkarianum* SEK364 (FERM ABP-11298). Entre los ejemplos más preferidos se incluye *Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381.

La actividad reductora de 7DHC es la actividad que reduce el doble enlace en la posición 7 del 7DHC para producir colesterol.

En la presente invención, la "proteína que presenta actividad reductora de 7DHC" no se encuentra limitada, con la condición de que sea una proteína codificada por un gen en un cromosoma genómico de un microorganismo de Labyrinthulea y que presente actividad reductora de 7DHC, aunque preferentemente es cualquiera de las proteínas [1] a [3], a continuación:

[1] una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n° 2,

[2] una proteína mutante que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n° 2 por supresión, sustitución o adición de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10, todavía más preferentemente de 1 a 5 aminoácidos y que presenta actividad reductora de 7DHC, y

[3] una proteína homóloga que presenta una identidad de por lo menos 95%, preferentemente de por lo menos 97%, más preferentemente de por lo menos 98%, todavía más preferentemente de por lo menos 99% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 2 y que presenta actividad reductora de 7DHC.

La "proteína homóloga" se refiere a una proteína que poseen organismos naturales y que está codificada por un gen que se cree que comparte el mismo origen evolutivo que un gen codificante de una proteína original debido a que la proteína homóloga presenta una estructura y funciones similares a las de la proteína original.

La identidad de las secuencias de aminoácidos y de las secuencias de bases puede determinarse utilizando el algoritmo BLAST [Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873, 1993] por Karlin y Altschul, y FASTA [Methods Enzymol., 183, 63, 1990]. Se han desarrollado los programas BLASTN y BLASTX basados en el algoritmo BLAST [J. Mol. Biol. 215, 403, 1990]. Para el análisis de las secuencias bases con BLASTN basado en BLAST, los parámetros son, por ejemplo, Puntuación=100 y longitud de palabra=12. Para el análisis de las secuencias de aminoácidos con BLASTX basado en BLAST, los parámetros son, por ejemplo, puntuación=50 y longitud de palabra=3. Al utilizar los programas BLAST y BLAST con huecos, los programas se utilizan con sus parámetros por defecto. Se conocen técnicas específicas para dichos métodos de análisis.

La "proteína mutada" se refiere a una proteína obtenida tras suprimir o sustituir artificialmente un residuo aminoácido en la proteína original o tras añadir un residuo aminoácido a la proteína.

En la proteína mutada anteriormente indicada, "supresión", "sustitución", "inserción" o "adición" de un aminoácido pueden significar "supresión", "sustitución" o "adición" de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10, todavía más preferentemente de 1 a 5 aminoácidos en cualesquiera posiciones en la misma secuencia.

El aminoácido suprimido, sustituido o añadido puede ser un aminoácido natural o un aminoácido no natural. Entre los ejemplos de aminoácidos naturales se incluyen L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspartico, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-arginina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina y L-cisteína.

Se presentan a continuación unos ejemplos de aminoácidos mutuamente sustituibles. Los aminoácidos del mismo grupo pueden sustituirse mutuamente entre sí.

Grupo A: leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-aminobutanoico, metionina, O-metilserina, t-butilglicina, t-butilalanina y ciclohexilalanina.

Grupo B: ácido aspártico, ácido glutámico, ácido isoaspártico, ácido isoglutámico, ácido 2-aminoadípico y ácido 2-aminosubérico.

Grupo C: asparagina y glutamina.

Grupo D: lisina, arginina, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropiónico. Grupo E: prolina, 3-hidroxiprolina y 4-hidroxiprolina.

Grupo F: serina, treonina y homoserina.

Grupo G: fenilalanina y tirosina.

10 El "gen que codifica una proteína que presenta actividad reductora de 7DHC" no se encuentra limitado, con la condición de que sea un gen presente en un cromosoma genómico de un microorganismo de Labyrinthulea , y codifique una proteína que presenta actividad reductora de 7DHC, aunque preferentemente es cualquiera de los ADN [4] a [7], a continuación:

15 [4] un ADN que codifica cualquiera de las proteínas [1] a [3], anteriormente,

[5] un ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID nº 1,

20 [6] un ADN que se hibrida con ADN que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína homóloga que presenta actividad reductora de 7DHC, y

25 [7] un ADN que presenta una identidad de por lo menos 95%, preferentemente de por lo menos 97%, más preferentemente de por lo menos 98%, todavía más preferentemente de por lo menos 99% respecto a la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1 y codificante de una proteína homóloga que presenta actividad reductora de 7DHC.

30 El "gen" se refiere a ADN que puede comprender, además de una región codificante de proteína, una región reguladora de la transcripción, una región de promotor, una región de terminador y similares.

35 El término "hibridar" se refiere a que un ADN que presenta una secuencia de bases específica, o una parte del ADN, forma un conjugado con otro ADN de una manera complementaria. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un ADN de una secuencia de bases específica, o una secuencia de bases parcial del ADN, puede ser un ADN que resulta útil como sonda para análisis de transferencia Northern o transferencia Southern, o un ADN de una longitud que puede utilizarse como cebador oligonucleótido para el análisis de PCR. Entre los ejemplos del ADN utilizado como sonda se incluye ADN de por lo menos 100 bases, preferentemente de por lo menos 200 bases, más preferentemente de por lo menos 500 bases. Entre los ejemplos del ADN utilizado como cebador se incluye ADN de por lo menos 10 bases, preferentemente de por lo menos 15 bases.

40 Las técnicas experimentales de hibridación de ADN son bien conocidas. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo experimentos tras fijar las condiciones de hibridación según los libros de texto estándares, incluyendo Molecular Cloning, segunda edición, tercera edición, 2001; Methods for general and molecular Bacteriology, ASM Press, 1994, y Immunology methods manual, Academic press (Molecular).

45 Además, asimismo según el manual de instrucciones que acompaña a un kit de hibridación disponible comercialmente, puede obtenerse un ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas. Entre los kits de hibridación disponibles comercialmente pueden incluirse, por ejemplo, el kit 'Random Primed ADN Labeling kit' (fabricado por Roche Diagnostics GmbH), con el que se produce una sonda con un método de cebado aleatorio y se lleva a cabo la hibridación bajo condiciones restrictivas, y similares.

50 Las condiciones restrictivas anteriormente indicadas pueden incluir condiciones en las que un filtro sobre el que se ha inmovilizado un ADN y un ADN sonda se incuban durante la noche a 42°C en una solución que contiene formamida al 50%, 5x SSC (cloruro sódico 750 mM y citrato sódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7.6), 5x solución de Denhardt, dextrán sulfato al 10% y 20 µg/l de un ADN de esperma de salmón desnaturalizado y después se lava el filtro en, por ejemplo, una solución 0,2x SSC a aproximadamente 65°C.

55 Las diversas condiciones anteriormente indicadas asimismo pueden fijarse mediante adición o modificación de un reactivo de bloqueo que debe utilizarse para suprimir el fondo en el experimento de hibridación. La adición del reactivo de bloqueo puede acompañarse de un cambio en las condiciones de hibridación para adaptar las condiciones.

60 El ADN que puede hibridarse bajo las condiciones restrictivas anteriormente indicadas puede incluir un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos que presenta por lo menos 95%, o más preferentemente 97% o más, más preferentemente 98% o más, y todavía más preferentemente 99% o más, identidad respecto a la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1 al llevar a cabo el cálculo basándose en los parámetros anteriormente indicados, utilizando, por ejemplo, un programa tal como BLAST o FASTA, indicado anteriormente.

Con respecto a la introducción de una supresión, sustitución o adición de por lo menos una base en el gen que codifica una proteína que presenta actividad reductora de 7DHC, el número y tipo de bases no se encuentran limitados, con la condición de que la supresión, sustitución o adición de por lo menos una base provoque que la actividad reductora de 7DHC sea más débil que en la cepa madre, o elimine la actividad reductora de 7DHC. Sin embargo, entre los ejemplos de la misma se incluyen en el promotor, y en la región reguladora de la transcripción, la supresión de por lo menos una base, preferentemente por lo menos 10 bases, más preferentemente por lo menos 20 bases, todavía más preferentemente la región entera; en la región codificante, una supresión de por lo menos una base, preferentemente de por lo menos 10 bases, más preferentemente de por lo menos 20 bases, todavía más preferentemente de por lo menos 100 bases, particularmente preferentemente de por lo menos 200 bases, todavía más preferentemente la región codificante entera.

La sustitución de una o más bases puede ser una sustitución que introduzca un codón sin sentido mediante sustitución de por lo menos una base a 150 bases, preferentemente 100 bases, más preferentemente 50 bases, particularmente preferentemente 30 bases, todavía más preferentemente 20 bases del extremo 5' de la región codificante.

La adición de por lo menos una base puede ser una adición de un fragmento de ADN de por lo menos una base, preferentemente de por lo menos 50 bases, más preferentemente de por lo menos 100 bases, todavía más preferentemente de por lo menos 200 bases, particularmente preferentemente de por lo menos 500 bases, todavía más preferentemente de por lo menos 1 kb, inmediatamente después de una base a 150 bases, preferentemente 100 bases, más preferentemente 50 bases, particularmente preferentemente 30 bases, todavía más preferentemente 20 bases del extremo 5' de la región codificante. Todavía más preferentemente, la adición de una o más bases es una inserción de un gen, tal como un gen de resistencia a higromicina.

Una reducción de la actividad reductora de 7DHC en comparación con la de la cepa madre puede confirmarse mediante, por ejemplo, la cuantificación de la cantidad de transcrito del ADN de [4] a [7], anteriormente, mediante análisis Northern o RT-PCR, y comparación del resultado con la cepa madre, o la cuantificación del rendimiento de la proteína de cualquiera de [1] a [3], anteriormente, mediante SDS-PAGE o un ensayo que utilice un anticuerpo, y la comparación del resultado con la cepa madre.

Una reducción de la actividad específica de la proteína de cualquiera de [1] a [3], anteriormente, en comparación con la cepa madre asimismo puede considerarse una confirmación. Puede confirmarse una reducción de la actividad específica de la proteína respecto a la cepa madre mediante el cultivo del microorganismo de *Labyrinthulea* utilizando el método en la sección 3, posteriormente, y comparando el 7DHC acumulado en el cultivo con el 7DHC en la cepa madre.

Ser capaz de producir 7DHC significa posesión de la capacidad de producir 7DHC en la medida en que puede recogerse 7DHC de las células o medio de un microorganismo de *Labyrinthulea* en cultivo en el que se ha reducido o perdido la actividad reductora de 7DHC en comparación con la de la cepa madre por supresión, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen que se encuentra presente en el ADN cromosómico de la cepa madre y codifica una proteína que presenta actividad reductora de 7DHC.

## 2. Método de producción del microorganismo de *Labyrinthulea* utilizado en el procedimiento de producción de la presente invención

El microorganismo de *Labyrinthulea* utilizando en el procedimiento de producción de la presente invención puede producirse mediante reducción o eliminación de la actividad reductora de 7DHC en comparación con la de la cepa madre por supresión, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen que está presente en el ADN cromosómico de la cepa madre y que presenta el ADN según cualquiera de [4] a [7].,

El método para introducir la supresión, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen que está presente en el ADN cromosómico de la cepa madre no se encuentra limitado, y pueden utilizarse métodos ordinarios, tales como mutagénesis común, métodos de sustitución génica utilizando técnicas de ADN recombinante y similares, con la condición de que la mutación pueda introducirse en el ADN cromosómico del microorganismo de *Labyrinthulea*.

La cepa madre puede ser una cepa de tipo salvaje, con la condición de que sea un microorganismo de *Labyrinthulea* capaz de producir colesterol y que presente actividad reductora de 7DHC. En el caso de que la cepa de tipo salvaje no presente la capacidad de producción de colesterol, la cepa madre puede ser una cepa reproductora que ha sido dotada artificialmente de la capacidad de producción de colesterol.

El microorganismo de *Labyrinthulea* puede dotarse artificialmente de la capacidad de producción de colesterol mediante la utilización de, por ejemplo, los métodos siguientes:

(a) un método que debilita o cancela por lo menos uno de los mecanismos que controlan la biosíntesis del colesterol,

5 (b) un método que potencia la expresión de por lo menos uno de los enzimas que participan en la biosíntesis del colesterol,

(c) un método que incrementa el número de copia de por lo menos uno de los genes de enzima que participan en la biosíntesis del colesterol,

10 (d) un método que atenúa o bloquea por lo menos una de las rutas metabólicas que se ramifican en la ruta de biosíntesis del colesterol para la producción de metabolitos diferentes de la sustancia diana, y

(e) un método que selecciona una estirpe celular que presenta una resistencia más elevada a análogos de colesterol que la cepa de tipo salvaje.

15 Estos métodos conocidos pueden utilizarse solos o en combinación.

La cepa madre que puede utilizarse para preparar el microorganismo de *Labyrinthulea* que presenta una capacidad de producción de colesterol puede ser cualquier cepa con la condición de que sea un microorganismo de *Labyrinthulea* en el que sean aplicables los métodos (a) a (e) anteriores. Entre los ejemplos preferidos se incluyen microorganismos de *Labyrinthulea* de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Parietichytrium*, *Labyrinthula*, *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Japonochytrium*, *Labyrinthuloides*, *Ulkenia*, *Oblongichytrium*, *Botryochytrium* y *Sicyoidochytrium*. Entre los ejemplos más preferidos se incluyen los microorganismos de *Labyrinthulea* de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium* y *Parietichytrium*. Entre los ejemplos preferidos adicionales se incluyen *Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381, *Thraustochytrium aureum* ATCC34304, *Thraustochytrium* sp. ATCC26185, *Schizochytrium* sp. AL1Ac, *Schizochytrium aggregatum* ATCC28209, *Ulkenia* sp. ATCC 28207, *Schizochytrium* sp. SEK210 (NBRC 102615), *Schizochytrium* sp. SEK345 (NBRC 102616), *Botryochytrium radiatum* SEK353 (NBRC 104107), y *Parietichytrium sarkarianum* SEK364 (FERM ABP-11298). Entre los ejemplos más preferidos se incluye *Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381.

La mutagénesis puede conseguirse mediante, por ejemplo, un método que utiliza N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (Microorganism Experiment Manual, p. 131, Kodansha Scientific, 1986), mediante irradiación ultravioleta, o similar.

35 A título de ejemplo de métodos de sustitución génica utilizando técnicas de ADN recombinante, se crea un ADN recombinante mediante la introducción de una sustitución, supresión o adición de por lo menos una base a un gen in vitro, y el ADN recombinante se introduce en la cepa madre para sustituir el gen originalmente presente en el cromosoma mediante, por ejemplo, recombinación homóloga o similar.

40 Los ADN de [4] a [7], anteriormente, pueden obtenerse mediante, por ejemplo, PCR, utilizando un oligo de ADN diseñado y sintetizado a partir de una secuencia de bases representada mediante la SEC ID nº 1, y utilizando un ADN cromosómico de molde preparado a partir de un microorganismo de *Labyrinthulea*, según el método de Saito et al. [BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 72:619-629, 1963].

45 Entre los ejemplos del ADN específico que puede obtenerse se incluye ADN que presenta la secuencia de bases representada mediante la SEC ID nº 1.

50 El ADN puede obtenerse además mediante la utilización de un método de hibridación que utiliza una parte o la totalidad del ADN como sonda, un método que sintetiza químicamente ADN que presenta la secuencia de bases utilizando técnicas conocidas, o similar.

55 El ADN de [4], anteriormente, que codifica la proteína homóloga de [3], anteriormente, y los ADN que codifican las proteínas homólogas de [6] y [7], pueden obtenerse mediante, por ejemplo, la búsqueda de diversas bases de datos de secuencias génicas para una secuencia de bases que presenta una identidad de por lo menos 95%, preferentemente por lo menos 97%, más preferentemente por lo menos 98%, todavía más preferentemente por lo menos 99% respecto a la secuencia de bases representada mediante la SEC ID nº 1, o la búsqueda en diversas bases de datos de secuencias de proteínas para una secuencia de aminoácidos que presente una identidad de por lo menos 95%, preferentemente de por lo menos 97%, más preferentemente de por lo menos 98%, todavía más preferentemente de por lo menos 99% respecto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 2, y llevar a cabo los mismos métodos utilizados para obtener los ADN, anteriormente, utilizando un ADN sonda o un ADN cebador que puede diseñarse a partir de la secuencia de bases o la secuencia de aminoácidos obtenida después de la búsqueda, y un microorganismo que presenta el ADN.

65 La secuencia de bases de ADN puede determinarse mediante análisis con un analizador de secuencias de bases, tal como un secuenciador de ADN 373A (fabricado por PerkinElmer Co., Ltd.), utilizando un método de análisis de

secuencias de bases ordinario, por ejemplo tal como el método dideoxi [PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 74(12):5463-5467, 1977].

5 En el caso de que se encuentre que el ADN obtenido es un ADN de longitud parcial tras la determinación de su secuencia de bases, puede obtenerse un ADN de longitud completa mediante la utilización de técnicas tales como la hibridación Southern con una biblioteca de ADN cromosómico, utilizando el ADN de longitud parcial como sonda.

10 Dichas técnicas se describen en, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [en adelante, simplemente "Molecular Cloning, 3a ed."]; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997 (en adelante, simplemente "Current Protocols in Molecular Biology"; Nucleic Acids Research, 10, 6487 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409, 1982; Gene, 34, 315, 1985; Nucleic Acids Research, 13, 4431, 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488, 1985; J. Bacteriol., 182, 6884, 2000; Gene 77: 61-68, 1989, y similares.

15 Puede utilizarse cualquier método para la introducción del ADN recombinante en la cepa madre, con la condición de que el ADN pueda introducirse en un microorganismo de Labyrinthulea. Entre los ejemplos de dichos métodos se incluyen la electroporación [Appl. Microbiol. Biotech., 52, 541, 1999], y el método del protoplasto [J. Bacteriol., 159, 306, 1984].

20 Aunque la sustitución génica en un cromosoma de la cepa madre puede conseguirse con métodos tales como los indicados anteriormente, el método no se encuentra limitado a ellos, y asimismo pueden utilizarse otros métodos de sustitución génica, con la condición de que pueda sustituirse un gen en un cromosoma de un microorganismo de Labyrinthulea.

25 Mediante la introducción de una supresión, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen en un cromosoma de la cepa madre, muy probablemente podrá reducirse o eliminarse la actividad de la proteína codificada por el gen [An Introduction to Genetic Analysis. 7a edición, 2000; Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT et al., New York: W. H. Freeman].

30 La producción y acumulación de 7DHC en un medio de cultivo de un microorganismo de Labyrinthulea creado mediante la utilización de los métodos anteriores puede confirmarse mediante homogeneización del microorganismo de Labyrinthulea mediante, por ejemplo, ultrasonidos o un molino Dyno-Mill tras separar las células del cultivo y detectar el 7DHC presente en el extracto mediante cromatografía de gases tras la extracción con solvente, con por ejemplo, cloroformo, hexano, butanol o similar.

### 35 3. Procedimiento de producción de 7DHC de la presente invención

40 Un procedimiento de producción de 7DHC de la presente invención es un procedimiento para producir 7DHC que comprende cultivar el microorganismo de Labyrinthulea creado mediante la utilización de los métodos en la sección 2, anteriormente, en un medio y dejar que se produzca y acumule el 7DHC en el medio, y recoger el 7DHC a partir del cultivo.

45 El microorganismo de Labyrinthulea puede cultivarse mediante inoculación en un medio adecuado, y el cultivo de las células siguiendo un método ordinario.

50 El medio puede ser cualquier medio conocido. Entre los ejemplos de fuentes de carbono se incluyen, además de carbohidratos, tales como glucosa, fructosa y galactosa, aceites y grasas, tales como ácido oleico y aceite de soja, y glicerol y acetato sódico. La fuente de carbono puede utilizarse en una concentración de, por ejemplo, 20 a 300 g por litro de medio. En una forma de realización particularmente preferida, la fuente de carbono puede alimentarse a un cultivo continuo después de consumirse la totalidad de las fuentes de carbono originalmente contenidas en el medio. Llevando a cabo el cultivo bajo dichas condiciones, puede consumirse más de la fuente de carbono y puede incrementarse el rendimiento de 7DHC.

55 Entre los ejemplos de fuentes de nitrógeno se incluyen nitrógeno orgánico, tal como extractos de levadura, licor de maceración del maíz, polipeptona, glutamato sódico y urea, y nitrógeno inorgánico, tal como acetato amónico, sulfato amónico, cloruro amónico, nitrato sódico, nitrato amónico o amonio.

Pueden utilizarse sales minerales, tales como fosfato potásico, en combinaciones apropiadas.

60 Preferentemente, después de preparar el medio, se ajusta el pH del medio al intervalo de 4.0 a 9.5 mediante la adición de un ácido o base adecuada, seguido de la esterilización del medio con un autoclave.

65 Preferentemente, la temperatura del cultivo del microorganismo de Labyrinthulea se controla a una temperatura que permita la producción de 7DHC. Típicamente, la temperatura del cultivo es de 10°C a 45°C, preferentemente de 20°C a 37°C.

Durante el cultivo, el pH es típicamente de 3.5 a 9.5, preferentemente de 4.5 a 9.5, todavía más preferentemente de 5.0 a 8.0.

5 El periodo de cultivo puede ser de, por ejemplo, 2 a 7 días, y el cultivo puede llevarse a cabo bajo condiciones de agitación y aireación.

10 El microorganismo de *Labyrinthulea* que ha acumulado una concentración elevada de 7DHC durante el cultivo puede obtenerse a alta concentración, típicamente de aproximadamente 20 a 100 g en términos de peso celular seco por litro de medio. La separación del medio de cultivo y el microorganismo de *Labyrinthulea* del cultivo pueden llevarse a cabo mediante la utilización de un método ordinario conocido por el experto en la materia, por ejemplo, tal como centrifugación y filtración.

15 El microorganismo de *Labyrinthulea* separado del cultivo se homogeneiza mediante, por ejemplo, ultrasonidos o un molino Dyno-Mill, y puede obtenerse 7DHC tras la extracción con solvente utilizando, por ejemplo, cloroformo, hexano o butanol. El método para extraer 7DHC y otros esteroides a partir de las células de los microorganismos se describe en L. Parks et al. [Methods in Enzymology 111, editado por L Rilling, L. Parks, C. Bottema, R. Rodriguez y Thomas Lewis, páginas 333-339, 1985].

20 El 7DHC en bruto obtenido de esta manera puede purificarse adicionalmente mediante la utilización de un método conocido por el experto en la materia, en particular el método descrito en Boselli E, Velazco V, CaboniMf y Lercker G J, Chromatogr. A. 917 (1-2): 239-44; 11 de mayo, 2001.

25 Asimismo resulta posible utilizar otros métodos, tales como los métodos utilizados para extraer colesterol a partir de lana. En particular, el experto en la materia puede referirse a los métodos descritos en las patentes US nº 2.688.623 o nº 2.650.929, o las patentes británicas nº GB690879, nº GB646227 o nº GB613778.

30 En una forma de realización preferida de la presente invención, 7DHC se encuentra presente en las células de *Labyrinthulea* en una proporción superior a 20%, preferentemente superior a 35% del esteroide total producido en el microorganismo de *Labyrinthulea* creado mediante la utilización del método indicado en la sección 2, anteriormente.

#### 4. Procedimiento de producción de vitamina D3 de la presente invención

35 El procedimiento de producción de vitamina D3 de la presente invención. Es un procedimiento para producir vitamina D3 que comprende irradiar el 7DHC producido mediante el procedimiento de producción de la sección 3, anteriormente, con luz ultravioleta.

40 La vitamina D3 puede producirse mediante irradiación del 7DHC obtenido mediante la utilización del procedimiento de producción de la sección 3, anteriormente, con luz ultravioleta, tal como con una lámpara de mercurio, seguido de calentamiento. La temperatura de calentamiento es preferentemente de 50°C a 100°C, todavía más preferentemente de 80°C a 100°C. El tiempo de calentamiento es preferentemente de 5 a 300 minutos, más preferentemente de 10 a 100 minutos.

45 La vitamina D3 obtenida puede concentrarse mediante la utilización de técnicas tales como la cromatografía líquida de alto rendimiento y la cromatografía de fluidos supercríticos, y recogerse para obtener vitamina D3 purificada altamente concentrada.

#### **[Ejemplo de referencia]**

##### Búsqueda de un microorganismo de *Labyrinthulea* que acumule una cantidad significativa de colesterol

55 El 7DHC presenta una estructura en la que se ha introducido un doble enlace en el carbono 7 del colesterol. Con el fin de crear un microorganismo de *Labyrinthulea* que produzca cantidades significativas de 7DHC mediante modificación metabólica, resulta deseable por consiguiente que la cepa madre sea un microorganismo de *Labyrinthulea* que acumule una cantidad significativa de colesterol.

Con este fin, en el contexto de la presente invención se ha examinado la productividad de colesterol de los microorganismos de *Labyrinthulea* depositados en las instituciones oficiales siguientes:

60 Se cultivaron en medio líquido de evaluación (9% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 1% de peptona, 50% de agua marina artificial) a 30°C durante 72 horas, *Aurantiochytrium* sp. NBRC103268, *Aurantiochytrium* sp. NBRC103269, *Parietichytrium sarkarianum* NBRC104108, *Schizochytrium* sp. ATCC20888 y *Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381.

65 Se extrajeron los lípidos de cada cultivo según el método de Bligh y Dyer [Bligh EG y Dyer WJ, Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911, 1959] y se secaron bajo presión reducida. Los lípidos secos se disolvieron en KOH 0.1 N-metanol

y se procesaron a 60°C durante 30 minutos para la saponificación. Para la extracción de los esteroides libres obtenidos después del procedimiento de saponificación, se añadió una cantidad igual de agua y la solución se extrajo tres veces con hexano utilizado en dos veces el volumen de agua. La fracción de hexano extraída se concentró bajo presión reducida y se analizó mediante cromatografía de gases. Para la cuantificación, se añadió 5 $\alpha$ -colestano (fabricado por Sigma) en una etapa temprana de la extracción y se utilizó como estándar interno. Para la identificación del colesterol, se utilizó colesterol (fabricado por Tokyo Chemical Industry) como estándar externo.

Se presentan los resultados en la tabla 1. Tal como puede apreciarse en la tabla 1, se descubre que *Aurantiochytrium limacunum* ATCC MYA-1381 presenta una elevada capacidad de producción de colesterol.

[Condiciones de la cromatografía de gases]

Columna: HR-52 (Shinwa Chemical Industries Ltd.) 0.25 mm  $\times$  30 cm, 0.25 mm  
 Gas portador: N<sub>2</sub>, 31 ml/min  
 Temperatura de la columna: 280°C  
 Detección: FID

Tabla 1: Producción de colesterol por microorganismos de Labyrinthulea

Microorganismos de Labyrinthulea	Crecimiento (DO 660)	Colesterol (mg/l)
NBRC103268	14 $\pm$ 3.2	58 $\pm$ 18
NBRC103269	30 $\pm$ 7.4	161 $\pm$ 19
NBRC104108	3.6 $\pm$ 0.2	7.6 $\pm$ 3.5
ATCC MYA-1381	35 $\pm$ 5.7	205 $\pm$ 37
ATCC 20888	21 $\pm$ 4.9	151 $\pm$ 4,2

Se muestran ejemplos de la presente invención a continuación, aunque la presente invención no se encuentra limitada a los mismos.

**Ejemplo 1**

Creación de microorganismo de Labyrinthulea en el que se ha perdido la actividad reductora de 7DHC

Se eliminó la actividad reductora de 7DHC en *Aurantiochytrium limacunum* ATCC MYA-1381 (en adelante, "MYA-1381"), que se encontró que acumulaba una cantidad significativa de colesterol en el ejemplo de referencia, de la manera siguiente.

Se preparó el ADN genómico de MYA-1381 mediante la utilización de un método ordinario. Se amplificaron fragmentos de ADN mediante PCR utilizando ADN que consistían en las secuencias de bases indicada como "juego de cebadores" en la tabla 2, y el ADN genómico como molde.

Tabla 2

Juego de cebadores (SEC ID nº)	Fragmento de ADN amplificado
7 y 8	Promotor piruvato cinasa (SEC ID nº 3)
9 y 10	Terminador de actina (SEC ID nº 4)

Además, se amplificó el gen de resistencia a higromicina (SEC ID nº 5) mediante PCR, utilizando ADN de las secuencias de bases representadas mediante las SEC ID nº 11 y 12 como un juego de cebadores, y un casete de expresión génica de resistencia a fármaco (fabricado por Genebridges) como molde.

Mediante la utilización de una mezcla de dichos tres fragmentos de ADN amplificados como molde, se llevó a cabo la PCR utilizando ADN de las secuencias de bases representadas por las SEC ID nº 7 y nº 10 como juego de cebadores. Debido a que las SEC ID nº 8 y nº 11, y las SEC ID nº 9 y nº 12 presentan secuencias complementarias en los extremos 5', los tres fragmentos de ADN pueden unirse en la PCR. Es decir, se llevó a cabo la PCR para preparar un fragmento de casete de expresión de un gen de resistencia a higromicina que presentaba un promotor de piruvato cinasa derivado de MYA-1381 y un terminador de actina (SEC ID nº 6).

Se amplificó cada fragmento de ADN mediante PCR utilizando ADN de las secuencias de bases indicadas como "juego de cebadores" en la tabla 3, y el ADN genómico de MYA-1381 como molde. La secuencia del enzima de restricción indicado en "secuencia de enzima de restricción" de la tabla 3 se añadió a cada fragmento de ADN.

Tabla 3

Juego de cebadores (SEC ID nº)	Fragmento de ADN amplificado	Secuencias de enzima de restricción
13 y 14	Región en dirección 5' de ADN que consiste en la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1	EcoRI y BamHI
15 y 16	Región en dirección 3' de ADN que consiste en la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1	Sse8387I y BamHI

5 El fragmento amplificado en la región en dirección 5' se trató con EcoRI y BamHI, y el fragmento amplificado en la región en dirección 3' se trató con Sse8387I y BamHI, y estos se ligaron en pUC18 tratado con EcoRI y Sse8387I [J. Methods in Enzymology 101:20-78, 1983] a fin de obtener un plásmido.

10 El plásmido se trató con BamHI y se ligó al casete de expresión del fragmento génico de resistencia a higromicina obtenido anteriormente (SEC ID nº 6) que se trató con BamHI. Lo anterior produjo un plásmido en el que se había introducido el casete de expresión del gen de resistencia a higromicina en las regiones en dirección 5' y en dirección 3' del ADN de la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1. El plásmido se denominó pUCDHCR-hyg.

15 Se trató el plásmido pUCDHCR-hyg con NotI para obtener un fragmento de ADN que presentase el casete de expresión del gen de resistencia a higromicina insertado en las regiones en dirección 5' y en dirección 3' del ADN que consistía en la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1.

20 El fragmento de ADN se introdujo en MYA-1381 mediante electroporación a fin de obtener una cepa resistente a la higromicina. Dicha cepa se denominó MYA-1381Δ7DHCR. Se confirmó mediante PCR que MYA-1381Δ7DHCR presentaba una sustitución del ADN consistente en la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1 por el fragmento de ADN que presentaba el casete de expresión del gen de resistencia a higromicina insertado en las regiones en dirección 5' y en dirección 3' del ADN que consistía en la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 1.

25 Además, tal como se expone a continuación, en el ejemplo 2, ya que la cepa MYA-1381Δ7DHCR no produjo el colesterol producido por la cepa madre sino que produjo por el contrario 7DHC, se concluyó que MYA-1381Δ7DHCR había perdido la actividad reductora de 7DHC.

## Ejemplo 2

### 30 Producción de 7DHC

35 Se cultivaron las cepas MYA-1381 (cepa madre) y MYA-1381Δ7DHCR de la misma manera que en el ejemplo de referencia, utilizando un medio líquido (12% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 1% de peptona, 50% de agua marina artificial). Tras el cultivo, se recogieron las células y se llevó a cabo un análisis de cromatografía de gases tal como en el ejemplo de referencia. Se muestran los resultados en las tablas 4 y 5.

40 MYA-1381Δ7DHCR no produjo el colesterol que era producido por la cepa madre sino que en su lugar produjo 7DHC.

Tabla 4

Microorganismos de Labyrinthulea	Crecimiento (DO 660)	Colesterol (mg/l)
MYA-1381	54 ± 9.3	435 ± 41

Tabla 5

Microorganismos de Labyrinthulea	Crecimiento (DO 660)	7DHC (mg/l)
MYA-1381Δ7DHCR	66 ± 6.8	325 ± 37

45 Los resultados fueron mucho más deseables que los resultados de los que se informó anteriormente para levaduras en gemación. Se cree que lo anterior se debe a la utilización del microorganismo de Labyrinthulea productor de colesterol como cepa madre.

50 Se cree a partir de los resultados anteriores (documentos no de patente nº 4 a nº 9) que la reducción o la eliminación de la actividad reductora de 7DHC en un microorganismo de Labyrinthulea presentaría un efecto perjudicial sobre el crecimiento y reduciría en gran medida la cantidad de 7DHC acumulado. Sin embargo, la cepa MYA-1381Δ7DHCR presentaba el mismo nivel de crecimiento que la cepa madre y acumulaba una cantidad significativa de 7DHC.

55

**Ejemplo 3**

Producción de vitamina D3

5 El 7DHC fabricado en el ejemplo 2 se irradió con luz UV de 300 nm y se procesó a 100°C durante 30 minutos. A continuación, se analizó el producto mediante cromatografía de gases de la manera indicada en el ejemplo de referencia.

10 Como resultado, se confirmó que 7DHC era convertido en vitamina D3.

**Aplicabilidad industrial**

15 Según la presente invención, puede proporcionarse un procedimiento para producir eficientemente 7DHC utilizando un microorganismo de Labyrinthulea y un procedimiento para producir vitamina D3 que comprende irradiar, con luz ultravioleta, el 7DHC producido mediante el procedimiento de producción.

**Texto libre de listado de secuencias**

- 20 SEC ID nº 7 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 8 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 9 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 10 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 11 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 12 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- 25 SEC ID nº 13 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 14 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 15 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 16 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético

**Listado de secuencias**

- 30 <110> KYOWA HAKKO BIO CO., LTD. Ujihara, Tetsuro
- <120> Procedimiento para producir 7-deshidrocolesterol y vitamina D3
- 35 <130> 1000P12327
- <160> 16
- 40 <150> JP 2014-006698
- <151> 2014-01-17
- <170> PatentIn version 3.5
- 45 <210> 1
- <211> 1437
- <212> ADN
- <213> *Aurantiochytrium limacinum*
- 50 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1437)
- <400> 1

ES 2 772 259 T3

atg gcg ccc aaa tca aag gca gcg cct gct gtg ggg gcg tca ggc act	48
Met Ala Pro Lys Ser Lys Ala Ala Pro Ala Val Gly Ala Ser Gly Thr	
1 5 10 15	
gcc cca acc aag aag ctt agc ggc aaa tca tca tct agc aca ggc ggt	96
Ala Pro Thr Lys Lys Leu Ser Gly Lys Ser Ser Ser Ser Thr Gly Gly	
20 25 30	
atg tgg tca ggt gag aac tcc tcg gag agt gtt ggc att ggc cct ttg	144
Met Trp Ser Gly Glu Asn Ser Ser Glu Ser Val Gly Ile Gly Pro Leu	
35 40 45	
tgg att cgc aca gcc ttt ctc ccg gca ttt ttg gtc ctg gcc aca ccg	192
Trp Ile Thr Arg Thr Ala Phe Leu Pro Ala Phe Leu Val Leu Ala Thr Pro	
50 55 60	
ttg act agc atc att ctt ggt cgc gcc gtc acg tct acc gac cct aat	240
Leu Thr Ser Ile Ile Leu Gly Arg Ala Val Thr Ser Thr Asp Pro Asn	
65 70 75 80	
gtt ggt ttt ctc agt atg ggc cag gaa gtg atc cag gag atc att gac	288
Val Gly Phe Leu Ser Met Gly Gln Glu Val Ile Gln Glu Ile Ile Asp	
85 90 95	
acc ggt cta att gcc act tat act cgc gac gcc atg aac cct tac gtg	336
Thr Gly Leu Ile Ala Thr Tyr Thr Arg Asp Ala Met Asn Pro Tyr Val	
100 105 110	
tgg aag atg att ggc ctt tac tgc cta gtg cag ctt ttg ctc atg cgc	384
Trp Lys Met Ile Gly Leu Tyr Cys Leu Val Gln Leu Leu Leu Met Arg	
115 120 125	
ttc atg ccc ggt gag ata tac gag ggc cca aag agc ccc atg gga aac	432
Phe Met Pro Gly Glu Ile Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Pro Met Gly Asn	
130 135 140	

ES 2 772 259 T3

gtt ccc atc tat aaa gat aac gcg ttt gcc tgc tat gta gcg tcg ttt Val Pro Ile Tyr Lys Asp Asn Ala Phe Ala Cys Tyr Val Ala Ser Phe 145 150 155 160	480
gtt ctc tac ggc ctt ggc atg tac ttt ggc ctt tac aat ggt ggt gtg Val Leu Tyr Gly Leu Gly Met Tyr Phe Gly Leu Tyr Asn Gly Gly Val 165 170 175	528
gtc ttt gac cac ttt cat gag tgg gtc gcc acg atg aat att gtt gct Val Phe Asp His Phe His Glu Trp Val Ala Thr Met Asn Ile Val Ala 180 185 190	576
att atc ctc tgc tcc atc ctc tat gtc aag ggt gct gtg gct ccc tct Ile Ile Leu Cys Ser Ile Leu Tyr Val Lys Gly Ala Val Ala Pro Ser 195 200 205	624
agc act gac tct ggt ctg tct ggc aac ttt cct ttc gac tac tac tgg Ser Thr Asp Ser Gly Leu Ser Gly Asn Phe Pro Phe Asp Tyr Tyr Trp 210 215 220	672
ggc acc gag ctt tac cca cgc att ttt ggc tgg gac gtc aag gtc tat Gly Thr Glu Leu Tyr Pro Arg Ile Phe Gly Trp Asp Val Lys Val Tyr 225 230 235 240	720
acc aac tgc cgc tat ggc atg act ggc tgg gcc ttg ctt tgt gta tct Thr Asn Cys Arg Tyr Gly Met Thr Gly Trp Ala Leu Leu Cys Val Ser 245 250 255	768
ttt gct tgc gcc cag tac gag cgt ttt ggt gag att agc aac agc atg Phe Ala Cys Ala Gln Tyr Glu Arg Phe Gly Glu Ile Ser Asn Ser Met 260 265 270	816
ctc atc tct gct gtc ctt cag gtc att tac ctt gcc aag ttc cat att Leu Ile Ser Ala Val Leu Gln Val Ile Tyr Leu Ala Lys Phe His Ile 275 280 285	864
tgg gag cgt ggc tac atg ttt acc att gat atc atg cac gac cgc gct Trp Glu Arg Gly Tyr Met Phe Thr Ile Asp Ile Met His Asp Arg Ala 290 295 300	912
ggt cac tac att tgc tgg ggc tgt ctc gtc tgg gtc ccg tct gtg tac Gly His Tyr Ile Cys Trp Gly Cys Leu Val Trp Val Pro Ser Val Tyr 305 310 315 320	960
tgc tgc ccc ccc gcc ttt ctg gtg ctg cac ccg tac aac ttc cca acc Cys Cys Pro Pro Ala Phe Leu Val Leu His Pro Tyr Asn Phe Pro Thr 325 330 335	1008
tgg gta gct gtc ggc atg ttt gtt ttc tgt ctt gtg agt atc tac ctc Trp Val Ala Val Gly Met Phe Val Phe Cys Leu Val Ser Ile Tyr Leu 340 345 350	1056
aac tat gac att gat cgt cag cgc cag gag ttc cgt gcc aag gac ggc Asn Tyr Asp Ile Asp Arg Gln Arg Gln Glu Phe Arg Ala Lys Asp Gly 355 360 365	1104
aag atg aaa atc tgg ggt aag gac gcc gag tac ctc gtt gct gac tac Lys Met Lys Ile Trp Gly Lys Asp Ala Glu Tyr Leu Val Ala Asp Tyr 370 375 380	1152
cag acg ggt gat ggc aag aag cac tct tct ctt ctt ctt tac tct ggt Gln Thr Gly Asp Gly Lys Lys His Ser Ser Leu Leu Leu Tyr Ser Gly 1200	1200

ES 2 772 259 T3

385		390		395		400	
tgg tgg ggc aag gct cgc aag atc aac tac ttc ttc gag ctc tgc gct							1248
Trp Trp Gly Lys Ala Arg Lys Ile Asn Tyr Phe Phe Glu Leu Cys Ala							
		405		410		415	
ggc ttc acc tgg tct tgc att gtt gcg cac cca ttt tgt gcc ctt gca							1296
Gly Phe Thr Trp Ser Cys Ile Val Ala His Pro Phe Cys Ala Leu Ala							
		420		425		430	
tac ccg tat ttc gcc ttc ctt ttc att ctc ctg att gac cgc gca tgg							1344
Tyr Pro Tyr Phe Ala Phe Leu Phe Ile Leu Leu Ile Asp Arg Ala Trp							
		435		440		445	
cgc gat gat gct cgc tgt gcc gac aag tat ggc gaa aag tgg gag gag							1392
Arg Asp Asp Ala Arg Cys Ala Asp Lys Tyr Gly Glu Lys Trp Glu Glu							
		450		455		460	
tac aag aag ctt gtc cct tac ctg atg att cct ggc att atc taa							1437
Tyr Lys Lys Leu Val Pro Tyr Leu Met Ile Pro Gly Ile Ile							
		465		470		475	

<210> 2

<211> 478

<212> PRT

<213> *Aurantiochytrium limacinum*

<400> 2

ES 2 772 259 T3

Met Ala Pro Lys Ser Lys Ala Ala Pro Ala Val Gly Ala Ser Gly Thr  
 1 5 10 15

Ala Pro Thr Lys Lys Leu Ser Gly Lys Ser Ser Ser Ser Thr Gly Gly  
 20 25 30

Met Trp Ser Gly Glu Asn Ser Ser Glu Ser Val Gly Ile Gly Pro Leu  
 35 40 45

Trp Ile Arg Thr Ala Phe Leu Pro Ala Phe Leu Val Leu Ala Thr Pro  
 50 55 60

Leu Thr Ser Ile Ile Leu Gly Arg Ala Val Thr Ser Thr Asp Pro Asn  
 65 70 75 80

Val Gly Phe Leu Ser Met Gly Gln Glu Val Ile Gln Glu Ile Ile Asp  
 85 90 95

Thr Gly Leu Ile Ala Thr Tyr Thr Arg Asp Ala Met Asn Pro Tyr Val  
 100 105 110

Trp Lys Met Ile Gly Leu Tyr Cys Leu Val Gln Leu Leu Leu Met Arg  
 115 120 125

Phe Met Pro Gly Glu Ile Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Pro Met Gly Asn



ES 2 772 259 T3

Gln Thr Gly Asp Gly Lys Lys His Ser Ser Leu Leu Leu Tyr Ser Gly  
385 390 395 400

Trp Trp Gly Lys Ala Arg Lys Ile Asn Tyr Phe Phe Glu Leu Cys Ala  
405 410 415

Gly Phe Thr Trp Ser Cys Ile Val Ala His Pro Phe Cys Ala Leu Ala  
420 425 430

Tyr Pro Tyr Phe Ala Phe Leu Phe Ile Leu Leu Ile Asp Arg Ala Trp  
435 440 445

Arg Asp Asp Ala Arg Cys Ala Asp Lys Tyr Gly Glu Lys Trp Glu Glu  
450 455 460

Tyr Lys Lys Leu Val Pro Tyr Leu Met Ile Pro Gly Ile Ile  
465 470 475

5 <210> 3  
<211> 1000  
<212> ADN  
<213> *Aurantiochytrium limacinum*

<400> 3  
gacggtcggc tgccgctggc ggcttacacg ctgaggactc cagggcctcg aattacttgc 60  
ctacttgtca cctcgaaagt aggggtcaac tcttgccac ttcataaatt cccaccattc 120  
tcacatactt catgcggtt tactgtacca tgtcttggca aggaaatgca atgcaatgca 180  
gtgcaatgca atgtaatgca gtgcaatgca atgcaatgca atgcaatgcc acgctgtgcc 240  
acgagaaggg tattcgcaa gcaagaactt aatgtagata tgtgcaaggg ggattagttg 300  
gatctcatca tgcaaaatgc atgcttgcaa tgcactgccc agctatatgt aggcagtgtg 360  
atgcaatata gccggcctg tgtgcttcaa gtcgctgtgt gaggatgaatc ttattcgtca 420  
accgaatctc tccaatgtct tatcttcttc aattcatcct cttcttccat ctattaccca 480  
agaacaaaca aacaaacaaa caaacaaaca aacaaacaaa caaacaaaca aacaaacaaa 540  
acaacaaac aacaaacaaa acaaacaaac aacaaacac aacagagaa acacaccacg 600  
acaacccaac ccaaatcaac ttgaagtctt atcgacaacg aaccctgaag ccaagaagcc 660  
tactgacga accaagcggc acggtttcca taacagagcc tttgcttgtt tgcctcttta 720  
tctttttgtt tgtctgttgt gttgtttgt tgcctttgtt tatgataaag ttagttaggt 780  
actgattagt tagttatata gtcctgtcgc gttctgttct cagaggtata ggaggtaggg 840  
tctgggacgt cagattactc agcatatcca tatcttgcca actctgcaa ggctcgtgc 900  
gccttgagg gtcgctgtgt tggcggagga tctttggagt ttggcgttgt tttgagaaa 960  
agagttcctt tgaaaagtct gtgcaaaggc ttgctcgaag 1000

10 <210> 4  
<211> 647  
<212> ADN  
<213> *Aurantiochytrium limacinum*

15 <400> 4

ES 2 772 259 T3

attggagtga tggaatgcc tctccgtgtg gtgtatccga ttgacaaatc ttaaactcct 60  
 ccaagtagta ggcttcagtg cttccttgga attgagacat gaaatcatgc aacatcccac 120  
 cgacaggatt tatgtagtat cgcacacctct cttgttttac actctttgcc cataaattca 180  
 tgaacacttt cttctctttt ctctcaaaaa actagcttaa tttcatttaa gtcataaaga 240  
 ctaccaatga caatcttctc aacaacccaa caacagctta agtttcatct aacttaagag 300  
 actaccatga caatcttttc acttagacaa acattatagt gaatgcattg catcataata 360  
 tatttattag gctttgactt caactatgtc caggcttttg ggaccaagg accacagtta 420  
 caaaagcaga agatagttat gttgctatga atcaaatgaa aatgaacaaa aaagatttca 480  
 ggctgatatg tttcgatttg attttttgct caaatgcaat taaaagaaga cagacctcaa 540  
 ggtcaaatgt gattattaga atcttggaac gaatccgcac atatccagtt accaaattgt 600  
 tctcgcgcca ttgtgtaaat tcgctttatg atgtagcaat cacgtcc 647

5 <210> 5  
 <211> 1005  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> Disponible comercialmente

<400> 5  
 atgaaaaagc ctgaaactcac cgcgacgtct gtcgagaagt ttctgatcga aaagtctgac 60  
 agcgtctccg acctgatgca gctctcgag ggccaagaat ctctgtgctt cagcttcgat 120  
 gtaggagggc gtggatattg cctgcccgtta aatagctgag ccgatggttt ctacaaagat 180  
 cgttatggtt atcggcaactt tgcacccgcc gcgctcccga ttccggaagt gcttgacatt 240  
 ggggaattca gcgagagcct gacctattgc atctcccgcc gtgcacaggg tgtcacgttg 300  
 caagacctgc ctgaaaccga actgcccgtt gttctgcagc cggtcgaggg ggccatggat 360  
 gcgatcgtg cggccgatct tagccagacg agcgggttcg gccattcgg accgcaagga 420  
 atcgggtcaat aactacatg gcgtgatttc atatgcgga ttgctgatcc ccatgtgtat 480  
 cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgtccg tcgagcaggc tctcgatgag 540  
 ctgatgctt gggccgagga ctgccccgaa gtccggcacc tcgtgcacgc ggatttcggc 600  
 tccaacaatg tcctgacgga caatggccgc ataacagcgg tcattgactg gagcgaggcg 660  
 atgttcgggg attcccaata cgaggctgcc aacatcttct tctggaggcc gtggttggt 720  
 tgtatggagc agcagacgag ctacttcgag cggaggcatc cggagcttgc aggatcggc 780  
 cggtccggg cgtatattgt ccgatttggc cttgaccaac tctatcagag cttggttgac 840  
 ggcaatttcg atgatgcagc ttgggagcag ggtcgatgag acgcaatcgt ccgatccgga 900  
 gccgggactg tcgggagtac acaaatcgcc cgcagaagcg cggccgtctg gaccgatggc 960  
 tgtgtagaag tactcgcgga tagtggaaac cgacgccccg gatga 1005

15 <210> 6  
 <211> 2490  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido

20

<220>

<223> Gen fusionado

<400> 6

ES 2 772 259 T3

cgggatccaa tgcaatgtaa tgcagtgcaa tgcaatgcaa tgcaatgcaa tgccacgctg 60  
 tgccacgaga agggatattcg caaagcaaga acttaatgta gatatgtgca aggtggatta 120  
 gttggatctc atcatgcaaa atgcatgctt gcaatgcaact gcgcagctat atgtaggcag 180  
 tgtgatgcaa tacagccggc cctgtgtgct tcaagtcgct gtgtgagttg aatcttattc 240  
 gtcaacccaa tctctccaat gtcttatctt cttcaattca tcctcttctt ccatctatta 300  
 cccaagaaca aacaaacaaa caaacaaaaca aacaaacaaa caaacaaaaca aacaaacaaa 360  
 acaaacaaac aaacaacaaa acaaacaaac aaacaacaaa acacaacacag agaaacacac 420  
 cacgacaacc caacccaaat caacttgaag tcttatcgac aacgaaccct gaagccaaga 480  
 agcctcactg acgaaccaag cggcacggtt tccataacag agcctttgct tgtttgcctc 540  
 tttatctttt tgtttgtctg ttgtgtttgt ttgttgcttt tgtttatgat aaagttagtt 600  
 aggtactgat tagttagtta tatcgtcctg tcgctgtctg ttctcagagg tataggaggt 660  
 aggtctggg acgtcagatt actcagcata tccatatctt gcgaactctg cgaaggctcg 720  
 ctgcgccttg gagggctgct gtgttggcgg aggatctttg gagtttggcg ttgttttgag 780  
 aaagagagtt cctttgaaaa gtctgtgcaa aggcttgctc gaagatgaaa aagcctgaac 840  
 tcaccgagac gtctgtcgag aagtttctga tcgaaaagtt cgacagcgtc tccgacctga 900  
 tgcagctctc ggagggcgaa gaatctcgtg ctttcagctt cgatgtagga gggcgtggat 960  
 atgtcctgcg ggtaaatagc tgcgccgatg gtttctacaa agatcgttat gtttatcggc 1020  
 actttgcatc ggccgcgctc ccgattccgg aagtgcttga cattggggaa ttcagcgaga 1080  
 gcctgacctt ttgcatctcc cgccgtgcac aggggtgtcac gttgcaagac ctgcctgaaa 1140  
 ccgaactgcc cgctgttctg cagccggtcg cggaggccat ggatgcgac gctgcggccg 1200  
 atcttagcca gacgagcggg ttcggcccat tcggaccgca aggaatcggc caatacacta 1260

ES 2 772 259 T3

catggcgtga tttcatatgc gcgattgctg atccccatgt gtatcactgg caaactgtga 1320  
 tggacgacac cgtcagtgcg tccgtcgcgc aggctctoga tgagctgatg ctttgggccc 1380  
 aggactgcc cgaagtcgg cacctcgtgc acgcggattt cggctccaac aatgtcctga 1440  
 cggacaatgg cgcataaca gcggtcattg actggagcga ggcgatgttc ggggattccc 1500  
 aatacgaggt cgccaacatc ttcttctgga ggccgtgggt ggcttgtatg gagcagcaga 1560  
 cgcgctactt cgagcggagg catccggagc ttgcaggatc gccgaggctc cgggctata 1620  
 tgctccgcat tggctctgac caactctatc agagcttggg tgacggcaat ttcgatgatg 1680  
 cagcttgggc gcaggtcga tgcgacgcaa tcgtccgatc cggagccggg actgtcgggc 1740  
 gtacacaaat cgcccgcaga agcgcggccg tctggaccga tggctgtgta gaagtactcg 1800  
 ccgatagtgg aaaccgacgc cccggatgac acgtcattgg agtgatggaa tgcctctcc 1860  
 gtgtggtgta tccgattgac aaatcttaaa ctctccaag tagtaggctt cagtgtctcc 1920  
 ttggaattga gacatgaaat catgcaacat cccaccgaca ggatttatgt agtatcgcac 1980  
 cctctcttgt tttacactct ttgccataa attcatgaac actttcttct cttttctctc 2040  
 aaaaaactag cttaatttca ttaagtcat gaagactacc aatgacaatc ttgtcaacaa 2100  
 ccaaacaaca gcttaagttt catctaactt aagagactac catgacaatc ttttactta 2160  
 gacaaacatt atagtgaatg cattgcatca taatatattt attaggcttt gacttcaact 2220  
 atgtccaggc ttttgggcac caaggaccac agttacaaa gcagaagata gttatgttgc 2280  
 tatgaatcaa atgaaaatga acaaaaaaga tttcaggctg atatgtttcg atttgatttt 2340  
 ttgctcaaat gcaattaaaa gaagacagac ctcaaggta aatgtgatta ttagaatctt 2400  
 ggaacgaatc cgcacatatc cagttaccaa attgttctcg cgccattgtg taaattcgtc 2460  
 ttatgatgta gcaatcacgt ccggatcccc 2490

5 <210> 7  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 7  
 cgggatccaa tgcaatgtaa tgcagtcaa tgc 33

15 <210> 8  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 8  
 gcggtgagtt caggctttt catcttcgag caagccttg cacag 45

25 <210> 9  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 772 259 T3

<220>  
 <223> ADN sintético

5 <400> 9  
 cgacgccccg gatgacacgt cattggagtg atggaatgcc ctctc 45

10 <210> 10  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> ADN sintético

20 <400> 10  
 cgggatccgg acgtgattgc tacatcataa agcg 34

25 <210> 11  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> ADN sintético

35 <400> 11  
 gcaaaggctt gctcgaagat gaaaaagcct gaactcaccg cg 42

40 <210> 12  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> ADN sintético

50 <400> 12  
 atcactccaa tgacgtgtca tccggggcgt cggttccac tatcg 45

55 <210> 13  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> ADN sintético

65 <400> 13  
 cgggaattcgc ggccgccgtg aaggatctta gaaggagag 39

70 <210> 14  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

75 <220>  
 <223> ADN sintético

80 <400> 14  
 cgggatccat aacttcgtat agcatacatt atacgaagtt atgacctgac cagtgatcaat 60

85 gatctcctgg 70

90 <210> 15  
 <211> 73  
 <212> ADN

# ES 2 772 259 T3

<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> ADN sintético

<400> 15  
cgggatccat aacttcgtat aatgtatgct atacgaagtt atgttttctc cttgttttgt 60  
gaagtttccg ttc 73

10 <210> 16  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> ADN sintético

<400> 16  
atatgccctg caggcggccg ccaaaaacag aagccatagg tgatg 45

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para producir 7-deshidrocolesterol, 7DHC, que comprende:

5 cultivar, en un medio, un microorganismo de *Labyrinthulea* que produce 7DHC en el que la actividad reductora de 7DHC está reducida o se ha perdido en comparación con una cepa madre mediante supresión, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen que está presente en el ADN cromosómico de la cepa madre y codifica una proteína que presenta una actividad reductora de 7DHC y el microorganismo produce 7DHC;

10 permitir que se produzca y acumule 7DHC en el cultivo; y

recoger el 7DHC del cultivo,

15 en el que el gen que codifica la proteína que presenta una actividad reductora de 7DHC es un gen que presenta cualquiera de los ADN [1] a [6] siguientes:

[1] un ADN que codifica una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 2;

20 [2] un ADN que codifica una proteína mutada que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 por supresión, sustitución o adición de 1 a 20 aminoácidos y que presenta una actividad reductora de 7DHC;

25 [3] un ADN que codifica una proteína homóloga que presenta una identidad de por lo menos 95% con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 2 y que presenta una actividad reductora de 7DHC;

[4] un ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID nº 1;

30 [5] un ADN que se hibrida con ADN que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases representada por SEC ID nº 1 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína homóloga que presenta una actividad reductora de 7DHC; y

35 [6] un ADN que presenta una identidad de por lo menos 95% con la secuencia de bases representada por SEC ID nº 1 y que codifica una proteína homóloga que presenta una actividad reductora de 7DHC.

2. Procedimiento de producción según la reivindicación 1, en el que el microorganismo de *Labyrinthulea* es un microorganismo de *Labyrinthulea* del género *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Parietichytrium*, *Labyrinthula*, *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Japonochytrium*, *Labyrinthuloides*, *Ulkenia*, *Oblongichytrium*, *Botryochytrium* o *Sicyoidochytrium*.

3. Procedimiento para producir vitamina D3, que comprende:

- 45 (i) producir 7DHC de acuerdo con el método según la reivindicación 1 o 2; y  
 (ii) irradiar 7DHC con luz ultravioleta.