



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-112008

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

CEPAS DE LEVADURA QUE PRODUCEN COLESTEROL
Y SUS APLICACIONES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A 61 K 51/04

71. SOLICITANTE

AVENTIS PHARMA S.A.

DOMICILIO

92160 ANTONY, FRANCIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

53



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-112008- -00000-0000
Fee: 2008-11-02 17:34:52 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/II
Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 140

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 06-12-06

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **AVENTIS PHARMA S.A.**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Francia .

Dirección: 20 Avenue Raymond Aron
92160 Antony
Francia

Domicilio: 92160 Antony
Francia

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camvp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. Denis POMPON
9 place du Marché Neuf
91190 Gif Sur Yvette
Francia

3. Roberto SPAGNOLI
39 rue des Vignes
75018 Paris
Francia

2. Bruno DUMAS
15 rue de Versailles
91300 Massy
Francia

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/FR2005/001090Fecha: 2 de mayo de 2005Publicación Internacional No. WO 2005/121315 A1Fecha: 22 de diciembre de 2005

6

Título (54)

CEPAS DE LEVADURA QUE PRODUCEN COLESTEROL Y SUS APLICACIONES

7

Clasificación Internacional (51) C12N 1/18

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐FR6 de mayo de 20040404890

9

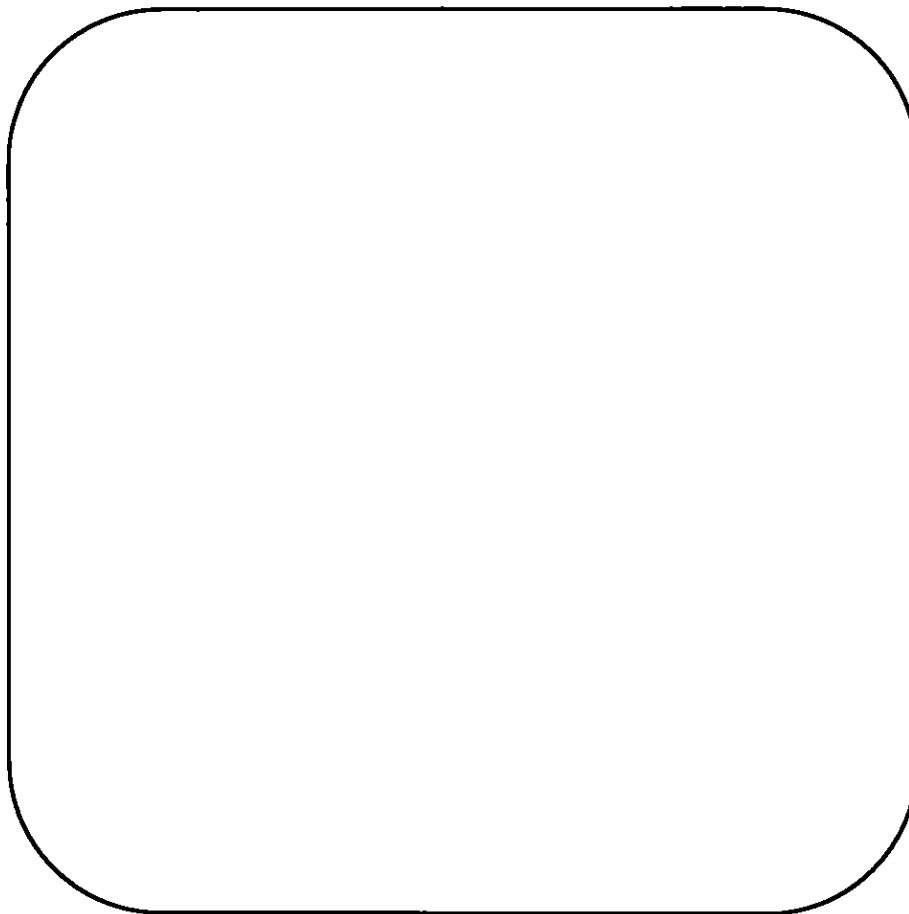
Comprobante de pago No.: 06-83,732Fecha: 30 de Octubre de 2006

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☒ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2005/121315 A1
2. ☒ **Forma PCT/ISA/210**. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN
FASE INTERNACIONAL**

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

BOGOTÁ, D. C. COLOMBIA

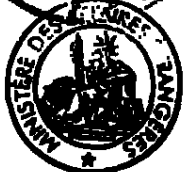
REPRESENTACION Y PODER

LE MINISTRE DES AFFAIRES ÉTRANGÈRES

ECCELSAIRE que la présente certification de signature

a été effectuée conformément à la loi française

Pour le Ministre et par délégation



AVENTIS PHARMA S.A.

résidant (s) à/ domiciliado (s) en Antony, France

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; CONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas; y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposición, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistirse, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

Je soussigné M^r Henri POMMERY

Notaire à Paris

Certifie matériellement

la signature de

Madame Magali LE PENNEC

Apposée sur la présent document

[Signature]

CAVELIER ABOGADOS

WPODERE-6 (MINUTA N° 12.1.1.3.2.f)

Pour brevets, modèles d'utilité, dessins industriels; marques de fabrique, de service, noms commerciaux, enseñas, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, de servicio, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTATION ET POUVOIR

29 NOV 2000

4576

12454

1825

par cet Instrument désigne à GERMAN CAVELIER, tpa. 832; CONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; et LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliés à Bogotá, Colombie, Carrera 4ª N° 72-35, conformément au paragraphe 1 de l'Article 543 du Code de Commerce, le premier comme principal et les autres comme suppléants, dans leur ordre, comme (mes) (nos) représentants dans toutes les affaires concernant la propriété industrielle ayant la faculté de recevoir les notifications et de nommer des mandataires judiciaires ou extrajudiciaires. Le premier représentant suppléant remplacera le principal en cas d'absence ou d'empêchement temporaire ou définitif de celui-ci. La même règle sera appliquée quand il faudra que le deuxième représentant suppléant remplace le premier, ou le troisième au deuxième. Dans ces cas, le représentant principal, ou le premier ou le deuxième suppléant dans leur cas, ou les deux, déclareront leur intention de ne pas exercer la représentation moyennant déclaration par devant Notaire Public en Colombie, ou par devant Notaire ou tout autre Fonctionnaire Public ou Consul de la Colombie à l'étranger; et s'il s'agit d'empêchement, avec le certificat respectif. Si un des nommés venait à manquer définitivement, le suivant prendra sa place. Quand l'absence ou l'empêchement du représentant principal, ou de son premier ou second suppléant dans leur cas, aura cessé, ils pourront exercer leur représentation dans leur ordre, l'un ou les autres, suivant le cas, l'assumant par le seul fait de l'exercer, cessant à ce moment-là l'exercice de la représentation par le premier, deuxième ou troisième suppléant dans leur cas.

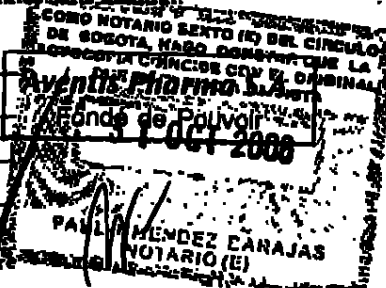
Par ailleurs je (nous) octroi (octroyons) pouvoir aux avocats ci-avant mentionnés pour obtenir la protection de ma (notre) propriété industrielle et contre la concurrence déloyale; à cet effet, autorisons (ons) les dits fondés de pouvoir à me (nous) représenter devant toutes entités ou personnes, avec ou sans juridiction; particulièrement devant celles de l'ordre administratif, contentieux-administratif et judiciaire, ainsi que devant les Tribunaux d'Arbitrage, pour tout ce qui concerne les affaires suivantes: a) l'obtention de brevets d'invention, modèles d'utilité, dessins industriels; le dépôt de marques de fabrique, collectives, défensives, de service, slogans, noms commerciaux enseñas, et dénominations d'origine; leur renouvellement, transfert, changement de nom ou domicile, radiation volontaire, et l'enregistrement des contrats de licence; b) les actions de concurrence déloyale, protection du consommateur, opposition, radiation administrative ou judiciaire, annulation, contrefaçon, licences, la tutelle, protection des secrets industriels, et les procès civils, pénaux, administratifs ou contentieux-administratifs ayant trait à ces droits; actions et procès établis par moi (nous) ou contre moi (nous); et c) afin que pour toutes les questions mentionnées ci-dessus, ils puissent substituer ce pouvoir, transiger, concilier, admettre les faits du procès, renoncer, et ratifier les actes des agents officiels ou personnes sans mandat.

Signé le/Dado y firmado hoy 31 octobre 2000

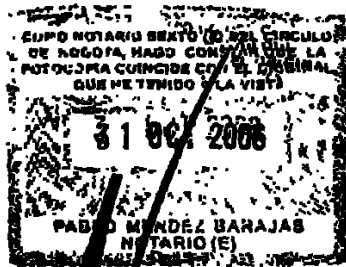
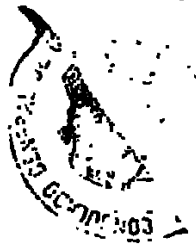
à/en Antony

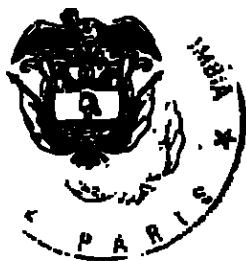
AVENTIS PHARMA S.A.

Firma



Magali LE PENNEC





CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
PARIS, FRANCIA

No. 4576

París, Noviembre 30 de 2000

El suscrito Cónsul General de Colombia en París, vistos los documentos presentados por los interesados,

CERTIFICA:

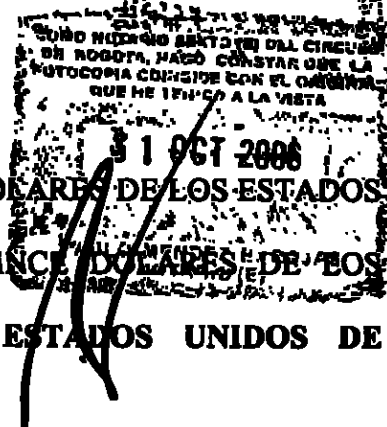
Que el señor Richard REQUENA, quien constató que la autenticación de la firma del signatario del poder precedente fue efectuada de conformidad con la ley francesa, ejercía en la fecha las funciones de Adjunto Administrativo de la Administración Central de la Dirección de los Franceses en el Exterior y de los Extranjeros en Francia del Ministerio de Asuntos Exteriores de Francia, y que su firma corresponde con la registrada en este Consulado;

Que la compañía AVENTIS PHARMA S.A. es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes de la República Francesa y que cumple con su objeto conforme a las mismas;

Que la señora Magali LE PENNEC quien en su calidad de Apoderada de la citada compañía otorga el poder precedente está legal y expresamente facultada para hacerlo.

El Cónsul General no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.


Alejandro Borda Rojas
Cónsul General



Pagado Impuesto de Timbre por valor de US\$7,00 (SIETE DOLARES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA)

Pagados Derechos Consulares por valor de US\$15 (QUINCE DOLARES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA)

Total: US\$22 (VEINTIDOS DOLARES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA).

070 121 1-11-01-7

Traducción Oficial No.
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Interpreté Oficial
FRANCOIS - ESPANOL
Reg. Minipetice No. 2680/91

264/00

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

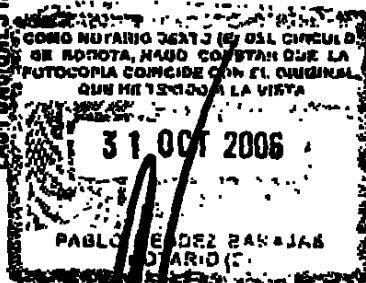
2000 DEC 22 A 10 21

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

608553

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS



6

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 264/00 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCÉS, EL CUAL PARA SU IDENTIFICACIÓN SE SELLA CON EL SELLO DEL TRADUCTOR. ESTA ES UNA TRADUCCIÓN OFICIAL EFECTUADA EL DIA 14 DE DICIEMBRE DEL AÑO 2000 POR JEAN-JACQUES TURPIN, C.E.: 193849 DE BOGOTÁ, TRADUCTOR OFICIAL SEGUN RESOLUCIÓN No. 2680/91 DEL 19 DE DICIEMBRE DE 1991, EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA.

Autenticaciones que se hallan a continuación de un documento de representación y poder conferido en francés y en español por AVENTIS PHARMA S.A. domiciliada en Antony, Francia, y otorgado a los Doctores Germán Cavelier TPA 832, Gonzalo Perdomo TPA 831, Emilio Ferrero TPA 31929 y Luz Clemencia de Paez, TPA 23555, todos domiciliados en Bogotá, Colombia, Carrera 4 No 72-35.

Dado en Antony, el 31 de octubre del 2000. Firma ilegible de Magali LE PENNEC.

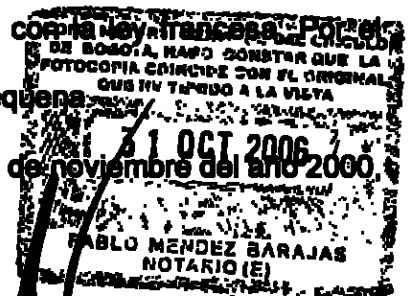
Sello: AVENTIS PHARMA S.A. Apoderada.

Legalización de la firma Magali LE PENNEC por el Señor Hervé Pommery, Notario en Paris. Firma del Notario.

Sello seco: Hervé Pommery – Notario asociado en Paris – Corte de apelación – República Francesa.

Sello en tinta del Ministerio de Relaciones Exteriores. Hace constar que la presente certificación de firma se ha efectuado de conformidad con la Ley 1712 de 2014, por el Ministro y por delegación. Firmado (ilegible): Richard Requena

Otro sello del Ministerio de Relaciones Exteriores del 29 de noviembre del año 2000, bajo el No.018302 - República Francesa 010.



**Traducción Oficial No. 264/00
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Interpreté Oficial
FRANCOIS - ESPANOL
Res. Ministerio No. 2680/91**

7

ANEXO EN ESPAÑOL

Certificación, por parte del Consulado General de Colombia en París, Francia, No.4576, del 30 de noviembre del año 2000, de la firma de Richard Requena quien desempeña las funciones de Adjunto Administrativo de la Administración Central de la Dirección de los Francéses en el Exterior y de los Extranjeros en Francia del Ministerio de Asuntos Exteriores de Francia. Además, certifica la existencia y representación de la compañía AVENTIS PHARMA S.A. y certifica que la Señora Magali LE PENNEC desempeña el cargo de Apoderada de dicha compañía y está facultada legal y expresamente para conferir el presente poder. Sello del Consulado General de Colombia en París. Pagado el impuesto de timbre por valor de veintidós dólares (US\$22.00). Sello y firma del Cónsul General, Alejandro Borda Rojas.

Legalización de la firma de Alejandro Borda Rojas por el Ministerio de Relaciones Exteriores en Bogotá No. 608553 del 12 de diciembre del año 2000. Firma y sello del Jefe de legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para confrontación y a la cual me remito.

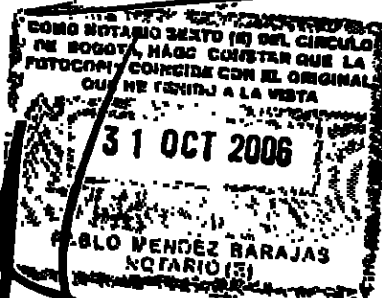
Traducción oficial No. 264/00.

Colo: 12457-801-001-7

Traductor: Jean-Jacques Turpin.

Santafé de Bogotá, D.C., 14 de diciembre del año 2000.

Traducción Oficial No. 264/00
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Interpreté Oficial
FRANCOIS - ESPANOL
Res. Ministerio No. 2680/91



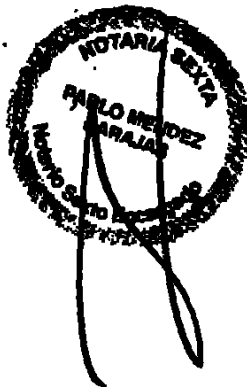
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA. HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

Jean Jacques H. Turpin

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA 15 DIC. 2000



NO SE ACORDA
RESPONSABILIDAD DEL NOTARIO

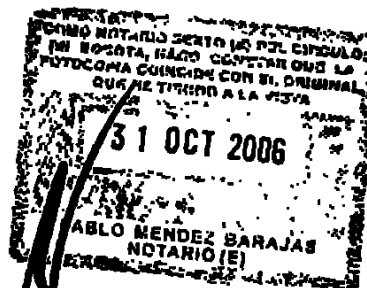
1000 DIC 18

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Jean Jacques H. Turpin
495453

COYA FIRMADA APARECE EN EL
DOCUMENTO DE SAMPANA
LAS FUNCIONES INDELEGADAS



CAVELIER

AB GAD S

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com
E-MAIL: cavaller@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: AVENTIS PHARMA S.A.

Poder conferido el: 31-10-2000

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929; con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,



GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

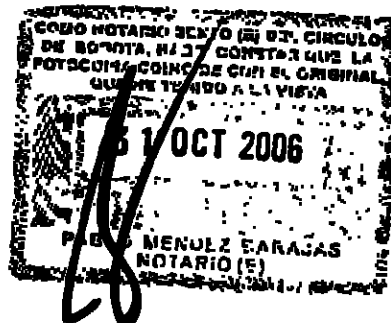
Acepto:



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Sede de Bogotá D. C. 09 NOV. 2000

Ante mí JUAN MANUEL BOTERO MEDINA

NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA

Compareció(eron) personalmente, German

Cavelier y Emilio

Ferrero

quien(es) exhibió(aron) la(s) C. C. # 2.877.924 Bta

Cc # 438.019.45 a g.

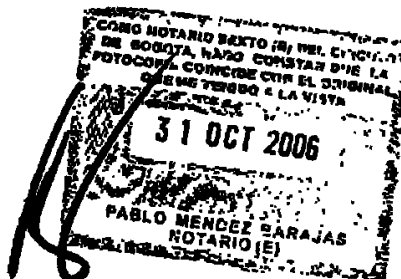
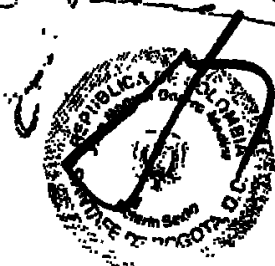
y la(s) Licencia(s) Militar(es), TP # 832

TP # 31.929

domicillado(s) en Bogotá, y declaró(aron) que la(s) firma(s) que
aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s), y que
el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

German Cavelier

Emilio Ferrero



(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 décembre 2005 (22.12.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/121315 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 1/18,
A61K 51/04, C07B 59/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/001090

(22) Date de dépôt international : 2 mai 2005 (02.05.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0404890 6 mai 2004 (06.05.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : AVEN-
TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20 Avenue Raymond Aron,
F-92160 ANTONY (FR).

(72) Inventeurs; et

(73) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : POMPON,
Denis [FR/FR]; 9 place du Marché Neuf, F-91190 GIF
SUR YVETTE (FR). DUMAS, Bruno [FR/FR]; 15 rue de
Versailles, F-91300 MASSY (FR). SPAGNOLI, Roberto
[IT/FR]; 39 rue des Vignes, F-75016 PARIS (FR).

(74) Mandataire : BOUVET, Philippe; AVENTIS PHARMA
S.A., Direction Brevets, 20 Avenue Raymond Aron,
F-92165 ANTONY CEDEX (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO;
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: CHOLSTEROL-PRODUCING YEAST STRAINS AND USES THEREOF

(54) Titre : SOUCHES DE LEVURE PRODUISANT DU CHOLESTEROL ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns the production of cholesterol in organisms of the *Fungi* kingdom. More particularly, the invention concerns genetically modified *Fungus* independently producing cholesterol from a simple carbon source. The invention also concerns the use of the inventive *Fungus* for producing non-marked and marked cholesterol.

(57) Abrégé : La présente invention concerne la production de cholestérol chez des organismes du règne des *Fungi*. Plus particu-
lièrement, l'invention concerne des *Fungus* génétiquement modifiés produisant de manière autonome du cholestérol à partir d'une
source de carbone simple. L'invention concerne également l'utilisation de *Fungus* selon l'invention pour la production de cholestérol
non-marqué et marqué.

WO 2005/121315 A1

SOUCHES DE LEVURE PRODUISANT DU CHOLESTEROL ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention concerne la production de cholestérol chez des organismes du règne des *Fungi*.

5 Le cholestérol (cf. figure 1) est le stérol animal le plus important. Il est un composant fondamental des membranes cellulaires, dont il contrôle la fluidité, et est présent dans tous les tissus animaux et particulièrement dans le tissu nerveux.

Le cholestérol est un produit d'intérêt industriel important. Ainsi, il est communément utilisé dans l'industrie cosmétique. Il est également utilisé dans
10 l'industrie pharmaceutique par exemple dans l'administration de médicament (« Drug delivery ») ainsi que dans la culture cellulaire.

Le cholestérol est aussi utilisé dans la synthèse industrielle de vitamine D₃. Cette vitamine est ensuite utilisée pour compléter la nourriture humaine (dans les produits laitiers par exemple) et animal. Le cholestérol est également avantageusement
15 utilisé comme additif dans la nourriture animal, notamment dans la nourriture destinée aux crevettes d'élevages.

Actuellement, l'immense majorité du cholestérol commercialisé est extrait à partir de tissu animal (une infime quantité est produite par synthèse chimique). Deux grandes sources de départ sont utilisées pour l'extraction du cholestérol : la moelle
20 épinière de bovins et la lanoline qui est la graisse naturelle de la laine de mouton.

L'utilisation de tissu animal comme produit de départ n'est pas sans poser de problèmes. Ainsi, les récents problèmes liés à la transmission du prion responsable de la tremblante du mouton aux bovins (maladie appelée ESB (Encéphalopathie Spongiforme Bovine) chez les bovins) ont rappelé la nécessité de prudence lors de
25 l'utilisation de tissu animal comme matière première. Cependant, malgré les mesures prises, le risque de transmission d'agent pathogène ne peut pas être totalement exclu. Il

serait donc extrêmement avantageux de disposer d'une source de cholestérol ne provenant pas d'un tissu animal.

La présente invention a pour but de fournir une source de cholestérol abondante et sûre d'un point de vue sanitaire. Les inventeurs ont montré de manière surprenante qu'il est possible de détourner la production naturelle d'ergostérol chez les *Fungi* pour produire du cholestérol.

Description générale de l'invention

Un premier aspect de l'invention concerne un organisme du règne des *Fungi* produisant de manière autonome du cholestérol.

10 Un second aspect de l'invention concerne un organisme du règne des *Fungi* tel que défini ci-dessus caractérisé en ce que ce dernier est génétiquement modifié.

Un troisième aspect de l'invention concerne un organisme du règne des *Fungi* tel que défini ci-dessus caractérisé en ce que ce dernier produit du cholestérol à partir d'une source de carbone simple.

15 L'invention concerne également un organisme du règne des *Fungi* tel que défini ci-dessus, exprimant les enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase. Plus particulièrement, l'invention concerne un organisme tel que défini ci-dessus dans lequel l'enzyme stérol 24-C-méthyltransferase a été inactivée et/ou l'enzyme C-22 stérol désaturase a été inactivée.

20 Un autre aspect de l'invention concerne un organisme du règne des *Fungi* tel que défini ci-dessus caractérisé en ce que l'expression des enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase est obtenue par transformation de l'organisme.

L'invention concerne également un organisme du règne des *Fungi* tel que
25 défini ci-dessus caractérisé en ce que l'inactivation de l'enzyme stérol 24-C-

méthyltransférase est réalisée par inactivation génique et/ou l'inactivation de l'enzyme C-22 stérol désaturase est réalisée par inactivation génique.

Un autre aspect de l'invention concerne un organisme du règne des *Fungi* tel que défini ci-dessus caractérisé en ce qu'il est choisi dans le phylum des *Ascomycete*,
5 plus particulièrement dans le sous-phylum des *Saccharomycotina*, encore plus particulièrement dans la classe des *Saccharomycetes* ou des *Schizosaccharomycetes*, encore plus particulièrement dans l'ordre des *Saccharomycetales* ou des *Schizosaccharomycetales*, encore plus particulièrement dans la famille des *Saccharomycetaceae* ou des *Schizosaccharomycetaceae*, encore plus particulièrement
10 dans le genre *Saccharomyces* ou *Schizosaccharomyces*.

Un autre aspect de l'invention concerne un organisme du règne des *Fungi* tel que défini ci-dessus caractérisé en ce qu'il s'agit d'une levure de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*.

L'invention concerne également un procédé de production de cholestérol d'origine non animal comprenant la culture d'un organisme tel que défini ci-dessus.
15 Plus particulièrement, ce procédé est caractérisé en ce que l'étape de culture de l'organisme est suivie d'une étape d'extraction du cholestérol. De manière préférée, l'extraction du cholestérol est effectuée par un solvant non miscible dans l'eau.

Plus particulièrement, le procédé tel que défini ci-dessus est caractérisé en ce
20 que l'on effectue une étape de saponification avant l'extraction du cholestérol. Encore plus particulièrement, le procédé tel que défini ci-dessus est caractérisé en ce que l'on effectue une étape de broyage mécanique des cellules avant la saponification ou l'extraction du cholestérol.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation d'un organisme du règne des *Fungi* telle que défini ci-dessus pour la production de cholestérol, ou de l'un de ses d'intermédiaires métaboliques, ou d'un mélange de stérols marqué au ^{13}C ou au ^{14}C .

L'invention est également relative à un procédé de production de cholestérol, ou de l'un de ses intermédiaires métaboliques, ou d'un mélange de stérols marqué au ^{13}C ou au ^{14}C comprenant les étapes suivantes :

- culture d'un organisme du règne des *Fungi* telle que défini ci-dessus sur un substrat marqué au ^{13}C ou au ^{14}C et,
- extraction dudit cholestérol, ou de l'un de ses intermédiaires métaboliques, ou du mélange de stérols.

L'invention concerne également un procédé de fabrication d'un mélange isotopique de cholestérol, d'intermédiaires ou de métabolites du cholestérol, marquées en différentes positions à l'aide de marqueurs isotopiques, comprenant la mise en culture d'un organisme du règne des *Fungi* telle que défini ci-dessus sur un substrat marqué puis sur un substrat non marqué, les durées de culture sur chacun de ces substrats étant choisies afin d'obtenir un profil isotopique défini. L'invention concerne également un échantillon de molécules de cholestérol, d'intermédiaires ou de métabolites du cholestérol marquées en différentes positions à l'aide de marqueurs isotopiques présentant un profil isotopique défini et susceptible d'être obtenu par ce procédé de fabrication.

L'invention concerne également une composition contenant, à titre de marqueur de traçabilité, un mélange isotopique de cholestérol, d'intermédiaires ou de métabolites du cholestérol, marquées en différentes positions à l'aide de marqueurs isotopiques et présentant un profil isotopique défini. Plus particulièrement, cette composition est destinée au domaine de l'alimentation ou de la thérapie humaine ou animale.

Description détaillée de l'invention

La présente invention concerne la production de cholestérol chez des organismes du règne des *Fungi*. Chez les *Fungi*, on ne trouve pas de cholestérol à l'état naturel, ce dernier étant un stérol animal. Le stérol majoritaire des membranes cellulaires de ces organismes est l'ergostérol.

14

La présente invention permet de réaliser la synthèse de cholestérol, par la multiplication de *Fungi*, en présence d'une source de carbone simple. La méthode proposée par la présente invention permet donc d'obtenir une grande quantité de cholestérol, à faible coût, puisque le procédé met en œuvre la culture d'organismes du règne des *Fungi* et l'ajout d'une source de carbone simple, facilement disponible dans le commerce.

Par source de carbone simple, selon la présente invention, on entend des sources de carbone utilisables par l'homme du métier pour la croissance normale d'un *fungus* et notamment d'une levure. On entend désigner notamment les différents sucres assimilables, tels le glucose, le galactose ou le saccharose, ou les mélasses, ou les sous-produits de ces sucres. Une source de carbone simple tout particulièrement préférée est l'éthanol et le glycérol.

Le fait que la production soit effectuée de manière autonome signifie qu'il n'est pas besoin de rajouter de substrats pour obtenir le cholestérol, mais que l'organisme peut le produire uniquement à partir de la source de carbone simple de départ. Il est aussi clair que la souche peut produire le cholestérol, par utilisation d'un substrat situé en amont dans la voie métabolique, dans la mesure où la souche de l'organisme selon la présente invention contient tous les gènes nécessaires à la complétion de la voie métabolique de production du cholestérol.

20 L'invention concerne notamment un organisme du règne des *Fungi* (un *Fungus*) génétiquement modifié produisant de manière autonome du cholestérol à partir d'une source de carbone simple.

Un certain nombre de modifications génétiques du *fungus* peuvent être effectuées afin de détourner la voie métabolique naturelle de production de l'ergostérol vers la production de cholestérol. La présente invention concerne ainsi un organisme du règne des *Fungi* génétiquement modifié exprimant les enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase. La souche d'organisme du règne des *Fungi* ainsi modifiée produit du cholestérol. La

15 demanderesse a en effet pu modéliser, grâce aux résultats obtenus (cf. la partie
exemplé de la présente demande), la voie métabolique conduisant à l'ergostérol et à
certains de ses dérivés (cf. figure 2). L'expression des enzymes 7-déhydrocholestérol
réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase chez le *fungus S. cerevisiae* peut
5 permettre la production de cholestérol, en détournant une partie de la voie de
biosynthèse de l'ergostérol.

L'enzyme 7-déhydrocholestérol réductase porte le numéro EC: 1.3.1.21 dans la
classification internationale des enzymes (Enzyme Classification). Elle est également
dénommée delta-5,7-stérol-delta-7-réductase, 7-DHC réductase ou Stérol delta-7-
10 réductase et sera également dénommée Delta-7 stérol réductase, Delta-7Red, Delta 7
Réductase ou Δ 7-réductase dans la suite de ce document. Cette enzyme catalyse à
l'état naturel chez les plantes par exemple la réduction NADPH dépendante du delta
5, 7 cholestadienol en delta 5 cholestanol ou la réduction d'intermédiaires stéroliques
possédant la double liaison en 7-8 (Taton and Rahier, 1991). Le gène codant pour
15 l'enzyme 7-déhydrocholestérol réductase a été isolé pour la première fois chez la
plante *Arabidopsis thaliana*, l'isolement du gène correspondant et l'expression de
cette enzyme chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est décrite dans le brevet EP
727 489. Les séquences de ce gène et de la protéine sont accessibles au numéro
d'accession GenBank suivant : U49398 (Lecain et al., 1996).

20 Un certain nombre d'homologues de ce gène ont été décrits chez d'autres
espèces. Il s'agit par exemple du gène homologue chez l'homme (dont la séquence
nucléotidique est accessible au numéro GenBank AF034544, la séquence protéique au
numéro GenBank : AAC05086) (Moebius et al., 1998). Du gène homologue chez le
rat *Rattus norvegicus* (dont la séquence nucléotidique est accessible au numéro
25 GenBank : AB016800, la séquence protéique au numéro GenBank : BAA34306). Des
gènes homologues ont été également identifiés chez la poule *Gallus gallus* avec la
référence Genbank BM490402 ou chez le crapaud *Xenopus laevis* avec la référence
Genbank BE315007 ou le poisson zèbre *Danio rerio* avec la référence Genbank
BQ132664. On trouve également un gène codant pour une activité delta7 stérol

réductase chez les plantes comme le riz *Oryza sativa* avec la référence Genbank CA753545, la pomme de terre *Solanum tuberosum* avec la référence Genbank BF342071. Ce gène codant pour une activité delta7 stérol réductase peut être également trouvé chez le protiste *Mastigomoeba balamuthi* avec la référence Genbank BE636562.

L'homme du métier pourra isoler aisément d'autres gènes homologues codant pour l'enzyme 7-déhydrocholestérol réductase dans d'autres organismes. Il pourra notamment se référer à la méthode de clonage décrite à l'exemple 1 du brevet EP 727 489, qui décrit une méthode de clonage permettant d'isoler un ADNc codant pour une protéine ayant une activité delta-5,7-stérol-delta-7-réductase. L'homme du métier pourra également aisément déterminer l'activité 7-déhydrocholestérol réductase des protéines correspondantes notamment en utilisant le test d'activité également décrit à l'exemple 1 du brevet EP 727 489.

L'expression de l'enzyme 7-déhydrocholestérol réductase chez un organisme du règne des *Fungi* selon l'invention peut être obtenue par tout moyen connu de l'homme du métier. Il peut s'agir en particulier de la transformation de l'organisme par une construction comportant une cassette d'expression constituée d'un promoteur de transcription de préférence homologue, de la phase ouverte de lecture codant pour l'enzyme 7-déhydrocholestérol réductase et d'un terminateur de transcription adapté selon les règles habituelles connues de l'homme du métier. Comme promoteur homologue, on utilisera en général un promoteur adéquat pour permettre une expression suffisante et fonctionnelle de la protéine hétérologue. Le promoteur peut être par exemple le promoteur PGK, le promoteur ADH, le promoteur CYC1, le promoteur GAL10/CYC1, le promoteur TDH3 ou le promoteur TPL. Le terminateur peut être par exemple le terminateur du gène de la phosphoglycérate kinase (PGK). La dite cassette d'expression peut être intégrée sous forme d'une ou de plusieurs copies dans le génome nucléaire ou mitochondrial de l'hôte, ou porté par une structure artificielle du type chromosome artificiel de levure (YAC) ou être portée par un élément génétique épisomale comme un plasmide. Pour réaliser ce type d'expression,

des levures du type *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* ou *Pichia pastoris* peuvent par exemple être utilisées.

Préférentiellement, l'enzyme 7-déhydrocholestérol réductase exprimée est l'enzyme de la plante *Arabidopsis thaliana* (un exemple de mode d'expression de cette enzyme chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est décrit dans le brevet EP 727 489). Il peut cependant s'agir de toute enzyme homologue ou non, naturelle ou artificielle présentant la même activité enzymatique.

L'enzyme 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase, également dénommée DHCR24 ou 24-déhydrocholesterol réductase, catalyse à l'état naturel la réduction du desmostérol (cholesta 5, 24 diénol) ou des dérivés du lanostérol possédant une double liaison en 24-25 sur la chaîne latérale (par exemple le 14 desméthyl-lanostérol, le zymostérol ou le cholesta 7, 24 diénol), réduction nécessaire à la biosynthèse de cholestérol chez l'homme notamment (Waterham HR. *et al.*, 2001). Cette enzyme sera également dénommée delta 24-(25) stérol réductase, delta 24 stérol Réductase ou Δ 24-réductase dans la suite de ce document.

Le gène codant pour l'enzyme 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase a été isolé pour la première fois chez l'homme, l'isolement du gène correspondant et l'expression de cette enzyme chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est décrite dans la publication Waterham HR. *et al.*, 2001. Les séquences de ce gène et de la protéine sont accessibles aux numéros d'accès GenBank suivant : NM_014762 et NP_055577.

Un certain nombre d'homologues de ce gène ont été décrits chez d'autres espèces. Il s'agit par exemple du gène homologue chez la souris (*Mus musculus*) (dont la séquence nucléotidique est accessible au numéro GenBank : NM_053272, la séquence protéique au numéro GenBank : NP_444502). Des homologues ont été décrits chez le ver *Caenorhabditis elegans* et notamment un ADN complémentaire avec la référence Genbank AF026214. Des séquences homologues ont également été décrites chez les plantes comme le coton *Gossypium hirsutum* avec la référence

Genbank AAM 47602.1, le riz *Oryza sativa* avec la référence Genbank AAP53615, le pois *Pisum sativum* avec la référence Genbank AAK15493.

L'homme du métier pourra isoler aisément d'autres gènes homologues codant pour l'enzyme 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase dans d'autres organismes. Il pourra notamment se référer à la méthode de clonage décrite dans la publication Waterham HR. *et al.*, 2001. L'homme du métier pourra également aisément déterminer l'activité 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase des protéines correspondantes notamment en utilisant le test d'activité également décrit dans la publication (Waterham *et al.*, 2001).

L'expression de l'enzyme 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase chez un organisme du règne des *Fungi* selon l'invention peut être obtenue par tout moyen connu de l'homme du métier. Il peut s'agir en particulier des moyens décrits ci-dessus en ce qui concerne l'expression de l'enzyme 7-déhydrocholestérol réductase.

Préférentiellement, l'enzyme 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase exprimée est l'enzyme humaine. Un exemple d'isolement du gène correspondant et d'expression de cette enzyme chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est décrit dans la publication Waterham HR. *et al.*, 2001. Il peut cependant s'agir de toute enzyme homologue ou non, naturelle ou artificielle présentant la même activité enzymatique.

Avantageusement, les organismes du règne des *Fungi* selon la présente invention expriment les enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase et présentent en outre une inactivation de l'enzyme stérol 24-C-méthyltransferase.

L'enzyme stérol 24-C-méthyltransferase porte le numéro EC-2.1.1.41 dans la classification internationale des enzymes (Enzyme Classification). Elle est également dénommée ERG6p, Delta(24)-methyltransferase, Delta(24)-stérol methyltransferase, Zymostérol-24-methyltransferase, S-adenosyl-4-méthionine:stérol delta(24)-methyltransferase, SMT1, 24-stérol C-methyltransferase, S-adenosyl-L-méthionine:delta(24(23))-stérol methyltransferase ou Phytostérol methyltransferase.

Cette enzyme catalyse à l'état naturel la méthylation en C-24 du zymostérol, conduisant à la formation de fécostérol.

Le gène codant pour l'enzyme stérol 24-C-méthyltransférase a été dénommé *Erg6* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La séquence de ce gène est accessible au numéro d'accèsion GenBank suivant : NC_001145. La séquence de la protéine correspondante est accessible au numéro d'accèsion GenBank suivant : NP_013706 (Bowman et al., 1997), (Goffeau et al., 1996).

Un certain nombre d'homologues de ce gène ont été décrits chez d'autres *Fungi*. Il s'agit par exemple du gène homologue chez *Schizosaccharomyces pombe* (dont la séquence nucléotidique est accessible au numéro GenBank Z99759, la séquence protéique au numéro GenBank : CAB16897) (Wood et al., 2002). Du gène homologue chez *Neurospora crassa* (dont la séquence nucléotidique est accessible au numéro GenBank : NCB24P7, la séquence protéique au numéro GenBank : CAB97289). Du gène homologue chez *Candida albicans* (dont la séquence nucléotidique est accessible au numéro GenBank : AF031941, la séquence protéique au numéro GenBank : AAC26626) (Jensen-Pergakes et al., 1998). Des gènes codant pour une enzyme homologue à *ERG6* ont également été décrits chez *Candida lusitanae* avec la référence Genbank AA021936.1 et également chez *Pneumocystis carinii* (Kaneshiro et al., 2002) ou chez *Kluyveromyces lactis* (Ozier-Kalogeropoulos et al., 1998).

L'homme du métier pourra isoler aisément d'autres gènes homologues du gène *Erg6* dans les organismes du règne *Fungi*. L'homme du métier pourra également aisément déterminer l'activité stérol 24-C-méthyltransférase des protéines correspondantes notamment en utilisant comme test d'activité la complémentation fonctionnelle d'une souche de levure disruptée pour ces gènes. La complémentation est alors attestée par la formation de stérols branchés en position 24 en particulier de stérols de type ergosta- portant un groupement méthylène en position 24-28. La présence d'une activité biologique stérol 24-C-méthyltransférase de type *ERG6* sera également déterminée *in vitro* grâce aux techniques développées par (McCammon et al., 1984) ou par Taylor et Parks (Taylor and Parks, 1978). D'autre part les stérols

produits et substrat de l'enzyme ERG6 seront séparés par chromatographie en phase gazeuse selon la technique développée par Nes in (Methods in Enzymology Steroids and Isoprenoids Volume 111 part B, 1985 «A comparison of Methods for the Identification of Sterols » pp3-37).

- 5 La souche d'organisme du règne des *Fungi* selon la présente invention exprimant les enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase et présentant en outre une inactivation de l'enzyme stérol 24-C-méthyltransferase produit du cholestérol. La demanderesse a en effet pu déterminer que, de manière surprenante, l'inactivation de l'enzyme stérol 24-C-méthyltransferase
- 10 bloque la voie de biosynthèse de l'ergostérol en amont et permet une production accrue en cholestérol par la souche de *fungus* (cf. la partie exemple de la présente demande).

L'expression des enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase est réalisée comme décrit ci-dessus.

- 15 L'inactivation de l'enzyme stérol 24-C-méthyltransferase peut être réalisée par tout moyen connu de l'homme du métier. Il peut s'agir en particulier de l'introduction par mutagenèse d'une mutation non-sens, d'une insertion ou d'une délétion provoquant un changement de cadre de lecture dans le gène codant ladite protéine.

- Il peut s'agir également de l'expression d'un ARN anti-sens complémentaire de
- 20 l'ARN messager codant ladite protéine ou du système d'extinction génique connu de l'homme de l'art sous le nom de RNAi (small interfering RNA) et des systèmes enzymatiques associés si ceux-là n'existent pas naturellement chez l'hôte. La mutagenèse peut être effectuée dans la séquence codante ou dans une séquence non codante de manière à rendre inactive la protéine codée ou à en empêcher son
- 25 expression ou sa traduction. La mutagenèse peut être effectuée *in vitro* ou *in situ*, par suppression, substitution, délétion et/ou addition d'une ou plusieurs bases dans le gène considéré ou par inactivation génique.

Il peut s'agir en particulier de l'introduction d'un ADN exogène dans la séquence codante ou promotrice (par exemple une cassette d'expression avec

promoteur et/ou terminateur homologue et une partie codante hétérologue). La cassette d'expression permet avantageusement l'expression d'un marqueur de sélection. Il est également possible de modifier le promoteur du gène afin de réduire le niveau d'expression. Pour les *fungi*, l'inactivation se fait également par interruption de la séquence codante par la séquence codante d'un gène marqueur hétérologue ou homologue. Les principales techniques pour interrompre un gène de *fungi* sont décrites dans l'article de Johnston et al (2002) (Methods in Enzymology Volume 350 Edited by Christine Guthrie and Gerry Fink ; « Gene Disruption » ; M. Johnston, L. Riles, J. Hegemann pp290-315).

Avantageusement, les organismes du règne des *Fungi* selon la présente invention expriment les enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase et présentent en outre une inactivation de l'enzyme C-22 stérol désaturase.

L'enzyme C-22 stérol désaturase est également dénommée ERG5p, Cyp61, cytochrome p-45061, stérol delta22-désaturase. Cette enzyme catalyse à l'état naturel la conversion de l'ergosta-5,7,24(28)-trienol en ergosta-5,7,22,24(28)-tétraenol en ajoutant une double liaison en position C22 (cf. figure 2).

Le gène codant pour l'enzyme l'enzyme C-22 stérol désaturase a été dénommé *Erg5* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La séquence de ce gène est accessible au numéro d'accèsion GenBank suivant : U34636. La séquence de la protéine correspondante est accessible aux numéros d'accèsion GenBank suivants : AAB06217 (Skaggs et al., 1996) ou P54781 (Bowman et al., 1997).

Un certain nombre d'homologues de ce gène ont été décrits chez d'autres *Fungi*. Il s'agit par exemple du gène homologue chez *Schizosaccharomyces pombe* (dont la séquence nucléotidique est accessible au numéro GenBank Z98974, la séquence protéique au numéro GenBank : CAB11640) (Wood et al., 2002). Du gène homologue chez *Symbiotaphrina buchneri* (dont la séquence nucléotidique est accessible au numéro GenBank : AB086896, la séquence protéique au numéro GenBank :

BAC01142) (Noda and Koizumi, 2003). Du gène homologue chez *Symbiotaphrina kochii* (dont la séquence nucléotidique est accessible au numéro GenBank : AB086890, la séquence protéique au numéro GenBank : BAC01139) (Noda and Koizumi, 2003). Du gène homologue chez *Candida albicans* (dont la séquence nucléotidique est accessible au numéro GenBank : AL033396, la séquence protéique au numéro GenBank : CAA21953) (Tait et al., 1997). Le gène ERG5 a également été décrit chez *Candida lusitanae* avec la référence Genbank AAO48601.

L'homme du métier pourra isoler aisément d'autres gènes homologues du gène *Erg5* dans les organismes du règne *Fungi*. L'homme du métier pourra également aisément déterminer l'activité C-22 stérol désaturase des protéines correspondantes notamment en utilisant le test d'activité décrit par Skaggs, B.A., et al., 1996. Cette activité pourra également être mise en évidence par complémentation fonctionnelle d'une levure *S. cerevisiae* préalablement disruptée au niveau du gène *erg5*. Cette complémentation sera attestée par la présence dans la souche complémentée d'ergosta 5,7,22 trienol. L'activité C-22 stérol désaturase peut être mesurée *in vitro* en utilisant la méthode décrite par Kelly and Baldwin et al JBC (1997) après lyse des levures (Kelly et al., 1997).

La souche d'organisme du règne des *Fungi* selon la présente invention exprimant les enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase et présentant en outre une inactivation de l'enzyme C-22 stérol désaturase produit du cholestérol. La demanderesse a en effet pu déterminer que l'inactivation de l'enzyme C-22 stérol désaturase bloque avantageusement la conversion du cholestérol en cholesta 5, 22 diéneol et permet une stabilisation de la production en cholestérol (cf. la partie exemple de la présente demande). Ce blocage intervient aussi au niveau de la conversion du cholesta 5,7 diéneol, un précurseur du cholestérol en cholesta 5,7,22 triéneol, un précurseur du cholesta 5,22 diéneol. De manière surprenante, l'enzyme C-22 stérol désaturase accepte en effet comme substrat le cholestérol qu'elle convertit en cholesta 5, 22 diéneol. Cette réaction parasite peut être éliminée par

l'inactivation de l'enzyme -22 stérol désaturase, telle qu'il a pu être déterminé par la demanderesse.

L'expression des enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase est réalisée comme décrit ci-dessus. L'inactivation de l'enzyme C-22 stérol désaturase peut être réalisée par tout moyen connu de l'homme du métier. Il peut s'agir en particulier des méthodes décrites ci-dessus concernant l'inactivation de l'enzyme stérol 24-C-méthyltransferase.

Avantageusement, les organismes du règne des *Fungi* selon la présente invention expriment les enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase et présentent en outre une inactivation de l'enzyme C-22 stérol désaturase et une inactivation de l'enzyme stérol 24-C-méthyltransferase. Ces souches présentent en effet les avantages cumulés des deux inactivations et sont des souches productrices de cholestérol.

L'expression des enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase et l'inactivation des enzymes C-22 stérol désaturase et stérol 24-C-méthyltransferase sont réalisées comme décrit ci-dessus.

Dans un mode de réalisation, le cholestérol est présent dans la souche d'organisme selon la présente invention dans une proportion supérieure à 20 %, de préférence 35 %, de façon la plus préférée 50 % ou plus du total des stérols produits par la souche selon l'invention (notamment les intermédiaires de synthèse).

Préférentiellement, les organismes du règne des *Fungi* selon la présente invention sont choisis dans le phylum des *Ascomycetes*, de manière plus préférée, ils sont choisis dans le sous-phylum des *Saccharomycotina*, de manière encore plus préférée, ils sont choisis dans la classe des *Saccharomycetes* ou des *Schizosaccharomycetes*, de manière encore plus préférée ils sont choisis dans l'ordre des *Saccharomycetales* ou des *Schizosaccharomycetales*, de manière encore plus préférée ils sont choisis dans la famille des *Saccharomycetaceae* ou des

24
Schizosaccharomycetaceae, de manière encore plus préférée ils sont choisis dans le genre *Saccharomyces* ou *Schizosaccharomyces*, de manière tout à fait préférée les organismes du règne des *Fungi* selon l'invention appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*.

5 La présente invention concerne également un procédé de production de cholestérol d'origine non animal comprenant les étapes suivantes :

- on cultive un organisme du règne des *Fungi* tel que décrit ci-dessus,
- on extrait le cholestérol produit par cet organisme.

L'extraction est basée sur le traitement du *fungus* par un solvant du cholestérol
10 de préférence non miscible dans l'eau. Ce traitement peut être préférentiellement associé à une méthode quelconque de broyage mécanique des cellules. Plus préférentiellement le *fungus* sera traité avant extraction par le solvant, par un mélange de saponification destiné à libérer le cholestérol éventuellement lié à d'autres composants cellulaires comme en particulier les acides gras. Ce mélange de
15 saponification pourra être constitué d'une base par exemple ammoniacque, soude, potasse dissoute dans de l'eau ou plus préférentiellement dans un solvant organique miscible dans l'eau comme par exemple le méthanol ou l'éthanol, ou un mélange solvant-eau. La saponification pourra être effectuée sans ou préférentiellement avec
20 chauffage à une température de 60-120 °C, à pression atmosphérique ou sous-pression. L'extraction par le solvant non miscible dans l'eau pourra être remplacée par une extraction en phase solide sur une résine hydrophobe. Une méthode d'extraction des stérols est décrite par L. Parks et collaborateurs (1985) (Methods in Enzymology 111 Edited by L Rilling, L. Parks, C. Bottema, R. Rodriguez and Thomas Lewis pp333-339).

25 Le cholestérol brut ainsi obtenu pourra être purifié par toutes méthodes connues de l'homme de l'art, en particulier celle décrite par Boselli B, Velazco V, Caboni Mf et Lercker G J Chromatogr A. 2001 May 11;917(1-2):239-44.

25
D'autres méthodes pourront également être utilisées comme celle décrite pour l'extraction du cholestérol à partir de laine de mouton. L'homme du métier pourra notamment se référer aux méthodes décrites dans les brevets américains US 2,688,623 ou US 2,650,929 ou dans les brevets britanniques GB690879, GB646227 ou
5 GB613778.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation des souches selon la présente invention afin d'obtenir le cholestérol ou l'un de ses d'intermédiaires métaboliques, ou un mélange de stérols marqué. On entend par intermédiaire métabolique du cholestérol, notamment les stérols spécifiés dans la figure 2. Il peut
10 s'agir notamment de cholesta 8, 24(25) dieneol, cholesta 7, 24(25) dieneol, cholesta 5, 7, 24(25) trieneol, cholesta 5, 24(25) dieneol, cholesta 5, 22 dieneol.

Le principe de l'obtention d'un cholestérol marqué est décrit à la figure 10. Cette manipulation consiste à tout d'abord faire croître la souche de *fungus* sur un substrat totalement marqué. Les cellules sont ensuite mises en culture sur un substrat
15 non marqué. Il y a ainsi changement de marquage isotopique de la source de carbone, il s'ensuit la synthèse *de novo* d'intermédiaires métaboliques puis de stérol, incluant le cholestérol et comportant un changement progressif de marquage. Il s'agit donc d'un profil complexe, mais parfaitement déterminable expérimentalement, qui représente une signature isotopique unique qui dépend à la fois :

- 20 -1) du protocole de marquage et en particulier des durées et des conditions de culture en substrat marqué et non marqué.
-2) de la structure génétique précise de la souche utilisée
-3) du temps précis d'arrêt des cultures

Une fois la culture arrêtée (par exemple par lyse cellulaire ou par arrêt de la
25 culture en présence de concentration sub-létale de produits antifongiques cytotoxiques ou cytostatiques), le cholestérol marqué ou l'un de ses d'intermédiaires métaboliques, ou un mélange de stérols marqué est extrait et purifié comme décrit ci-dessus.

26
Le profil isotopique du cholestérol marqué ou de l'un de ses intermédiaires métaboliques, ou du mélange de stérols marqué a plusieurs propriétés uniques :

- 1) il est modulable à volonté en jouant sur les conditions de culture, la souche utilisée et le stérol choisi. Un registre de marqueurs unique peut donc être produit.
- 5 -2) il est « combinable » à savoir que plusieurs signatures isotopiques correspondants à plusieurs stérols uniques marqués par des profils isotopiques eux-même modulables peuvent être combinés pour former un « alphabet moléculaire »
- 3) il est reproductible et facile à déterminer expérimentalement.
- 4) il correspond à un mélange moléculaire traceur facile à isoler, stable, incolore et
10 inodore, non volatile, non toxique et incorporable à des aliments, médicament, additifs ou autres produits assimilables par l'homme.
- 5) il est infalsifiable sauf à disposer des souches recombinantes spécifiques et des conditions très précises de marquage, de culture et d'extraction. De plus la connaissance de la signature isotopique ne permet pas de remonter aux paramètres qui
15 ont permis de la produire.

Ainsi, un « alphabet isotopique » infalsifiable, d'usage général et incorporable dans tout type de produits, y compris consommables peut être obtenu facilement grâce à la présente invention. Les « mots isotopiques » constituables à partir d'un tel alphabet
20 sont en nombre quasi illimité en mettant à profit à la fois les profils de marquage et les différents types de stérols. L'incorporation de telles signatures au sein de produits les plus variés constitue donc une méthode unique de marquage infalsifiable, contrairement par exemple aux signatures ADN qui peuvent être reproduites une fois connues. La signature peut être lue par ailleurs de manière non destructive, par
25 exemple par ionisation laser suivie d'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF ou assimilé).

L'utilisation de substrat marqué au ^{13}C en lieu et place des sources de carbone non marquée pour la culture des souches de *fungus* selon l'invention permet la synthèse de stérols et en particulier de cholestérol très fortement marqué (comprenant
30 au moins 95 % de carbone ^{13}C). La préparation de stérols et de cholesterol radioactif

¹⁴C est également possible par la même approche. Le procédé peut aussi être incorporé à des souches de levures produisant des stéroïdes et notamment de l'hydrocortisone (cf. demande de brevet WO 02/061109) pour produire des stéroïdes marqués au ¹³C ou au ¹⁴C par exemple pour des tests RIA.

5 Légende des figures

Figure 1 : Formule chimique du cholestérol, ainsi que la nomenclature généralement utilisée pour la numérotation des différents carbones et le nom des différents cycles. Les quatre cycles de la molécule de cholestérol sont dénommés respectivement A, B, C et D et les carbones sont numérotés de 1 à 27.

- 10 Figure 2 : Schéma simplifié de la partie tardive de la voie de biosynthèse des stérols de types ergosta- et cholesta- dans les levures naturelles ou modifiées. Le schéma n'est pas exhaustif mais permet de définir les étapes faisant intervenir les enzymes citées dans ce document. Les protéines ERG2p, ERG3p, ERG5p et ERG6p sont des protéines de *fungus* ou de levure, tandis que les protéines Delta-7Red (Delta-7 stérol réductase),
- 15 Delta 24-(25)Red (Delta 24-(25) stérol réductase) sont des protéines hétérologues d'origine de mammifères ou de plantes.

Figure 3. Profil comparé en HPLC avec détection UV à 206 nm des stérols libres des souches dérivées de la souche BMA64 et identification de ces stérols. Les souches étudiées sont les suivantes : WGIF01 (souche BMA64 disruptée dans le gène *erg6* (cf. exemple 1)), WGIF02 (souche BMA64 disruptée dans le gène *erg6* et exprimant la Δ24-réductase, Exemple 12), WGIF03 (souche BMA64 disruptée dans le gène *erg6* et exprimant la Δ7-réductase, Exemple 13), WGIF04 (souche BMA64 disruptée dans le gène *erg6* et exprimant la Δ7-réductase et la Δ24-réductase, Exemple 14). C5 : cholesta 5 eneol (cholestérol) ; C5,22: cholesta 5,22 diéneol ; C5, 24: cholesta 5,24 diéneol (desmostérol) ; C8,24: cholesta 8,24 diéneol (zymostérol) ; C5,7,22: cholesta 5,7,22 triéneol ; C5,7, 24: cholesta 5,7,24 triéneol ; C5,22,24: cholesta 5,22,24 triéneol ; C5,7,22,24: cholesta 5,7,22,24 tétraéneol ; lan : lanostérol.

Figure 4. Profil comparé en HPLC avec détection UV à 206 nm des stérols libres de la souche WGIF04 (souche BMA64 disruptée dans le gène *erg6* et exprimant la $\Delta 7$ -réductase et la $\Delta 24$ -réductase, Exemple 14) après 0,2,4,8,24 heures d'induction par le galactose. Δ : souche WGIF01 (Exemple 1). Pour la souche WGIF04, les prélèvements sont effectués 0, 2, 4, 8 et 24 h après le basculement de la source de carbone en galactose. Le profil de la souche BMA64 portant la disruption *erg6* (WGIF01) présenté est celui obtenu immédiatement après le basculement en galactose. Ce profil reste pratiquement inchangé au cours de l'induction (0-24 h). Le signal d'absorption à 206 nm correspond à des coefficients d'absorption variables d'un stérol à l'autre. C5 : cholesta 5eneol (cholestérol) ; C5,22: cholesta 5,22 diéneol ; C5, 24: cholesta 5,24 diéneol (desmostérol) ; C8,24: cholesta 8,24 diéneol (zymostérol) ; C5,7,22: cholesta 5,7,22 triéneol ; C5,7, 24: cholesta 5,7,24 triéneol ; C5,22,24: cholesta 5,22,24 triéneol ; C5,7,22,24: cholesta 5,7,22,24 tétraéneol ; lan : lanostérol.

Figure 5. Profil comparé en HPLC avec détection en electrospray avec ionisation positive (spectrométrie de masse) des stérols libres de la souche WGIF04 (Exemple 14) après 0,2,4,8,24 heures d'induction par le galactose. Δ : souche WGIF01. C5 : cholesta 5eneol (cholestérol) ; C5,22: cholesta 5,22 diéneol ; C5, 24: cholesta 5,24 diéneol (desmostérol) ; C8,24: cholesta 8,24 diéneol (zymostérol). Les profils HPLC proviennent du même essais que ceux de la figure 4.

Figure 5A (gauche) : détection à $m/z = 367$, Figure 5B (droite) $m/z = 369$.

Ordonné : nombre d'ions comptés/ seconde. Abscisse : durée d'élution en minutes.

Figure 6. Détail du profil à $m/z = 369$ en HPLC pour les trois souches : WGIF01, CA10 portant le plasmide d'expression pour la delta 24 stérol Réductase et pour WGIF04, le cholestérol est injecté comme standard interne. Les quantités de stérols totaux injectées pour les trois souches correspondent à des extractions faites à partir des quantités identiques de culture mesurées par l'absorbance à 600nm.

Figure 7 : Profils comparés des stérols totaux (libres et esters) en chromatographie phase gaz des souches WGIF01 (délétion d'*erg6*), WGIF02 (délétion d'*erg6* avec

expression de la $\Delta 24$ -réductase), WGIF03 (délétion d'erg6 avec expression de la $\Delta 7$ -réductase), WGIF04 (délétion d'erg6 avec expression de la $\Delta 24$ -réductase et de la $\Delta 7$ -réductase) et CA10 pYES_Delta24 (fond génétique FY1679, délétion d'erg5 avec expression de la $\Delta 24$ -réductase, $\Delta 7$ -réductase, erg5). Les échelles de réponse (courants d'ionisation de flamme) sont arbitraires. Les profils ne sont à comparer que de manière qualitative d'une souche à l'autre. L'échelle de temps de rétention est néanmoins la même pour toutes les souches (les temps de rétention sont exprimés en minutes). L'identification des stérols est effectuée selon les critères décrits dans la présente demande.

10 Figure 8. Répartition quantitative des principaux stérols libres dans les souches de levure (BMA64 (Figure 8A), WGIF01 (Figure 8B), WGIF02 (Figure 8C) et WGIF03 (Figure 8D)) évaluée sur la base des spectres UV. La répartition est donnée en % de la totalité des espèces présentées dans la figure et qui sont les seules détectables en quantités appréciables. En absence de standard pour plusieurs des stérols
15 intermédiaires la quantification est effectuée sur la base des spectres UV associés à chacun des pics du chromatogramme HPLC en utilisant les coefficients d'absorption évalués donnés ci dessous (cf. table 1, les coefficients d'absorption sont exprimés en mM par litre et par cm.). Pour ce faire les coefficients d'absorption correspondant aux motifs structuraux insaturés présents dans la structure d'un stérol donné sont
20 recherchés dans la table 1 et éventuellement additionnés (si plusieurs motifs sont présents dans une même molécule) pour fournir une évaluation du coefficient d'extinction de chaque type de stérol. L'évaluation est faite en utilisant les valeurs à 280 nm si au moins un motif absorbant à cette longueur d'onde est présent, à défaut la longueur d'onde 235 nm est utilisée, et à défaut d'absorption à cette dernière, la
25 longueur d'onde 206 nm est utilisée pour évaluer les concentrations de chacun des stérols à partir des signaux d'absorption respectifs en HPLC.

Figure 9. Répartition quantitative des principaux stérols libres dans la souche de levure WGIF4 évaluée sur la base des spectres UV. Les quantifications sont effectuées de la même façon que décrite dans la Figure 8.

Figure 10. Principe du marquage isotopique des stérols par substitution de sources de carbone.

Figure 11. Evaluation des profils de marquage isotopique du cholestérol produit dans la souche WGIF04 après 4, 8, et 24 heures d'induction. Les stérols libres sont extraits et séparés par HPLC comme décrit. Un spectre de masse entre les valeurs de m/z 300 et $m/z=450$ est acquis toutes les 0,2 secondes durant l'élution. Ces spectres sont alors moyennés sur des fenêtres de 1,8 secondes puis soumis à une régression multilinéaire, en utilisant comme base de régression un ensemble de 24 vecteurs représentant les distributions théoriques de masse du cholestérol marqué pour une incorporation au hasard par des tirages indépendants du carbone 13 à chacune des 27 positions de la molécule avec une probabilité de marquage sur chaque carbone variable entre 0 et 1 selon le vecteur considéré. Les probabilités de marquage des différents vecteurs utilisés comme base sont choisies de telle façon à ce que le coefficient de cross-correlation des distributions de deux vecteurs consécutifs de la base soit de 0,92, la base démarrant avec un vecteur correspondant à une probabilité de présence de 100 % à toutes les positions pour le carbone 12. L'ajustement multilinéaire est effectué sur un critère statistique de moindre carré en annulant les termes non-diagonaux de la matrice des produits des dérivés partielles de la méthode de Gauss (filtrage numérique maximal). Après analyse, les spectres de masse sont alors reconstruits sur la base optimisée. Les courbes représentées sur les figures représentent donc le résultat de la reconstruction filtrée optimale après normalisation de l'amplitude maximale à la valeur 100.

Pour chaque temps d'induction les deux courbes représentent deux profils indépendants correspondant à des temps d'élution différents de 1.8 secondes et correspondant à des spectres situés dans la zone centrale du pic d'élution du cholestérol. La figure démontre la grande reproductibilité de l'analyse.

Figure 12. Exemple de différentes signatures isotopiques au niveau de différents stérols ou de différents temps d'induction. Même calcul et représentation que pour la figure 11, mais pour différents stérols et différent temps d'induction.

La valeur de RT indique la gamme de temps de rétention utilisée pour le calcul (en minute). Les valeurs de cette gamme sont les suivantes :

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

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

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

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

Les temps d'induction sont de 8 ou 24 heures.

Les valeurs de m/z indiquent la limite gauche et droite des m/z. La valeur la plus faible de m/z pour chaque cadre correspond au m/z pour le stérol totalement constitué
10 de carbone 12.

Figure 13: Profils comparés des stérols totaux (libres et esters) en chromatographie phase gaz des souches YIM59/pIM303 (partie A de la figure) et de la souche YIM59/pIM331 (partie B de la figure) (cf. exemple 18). Les échelles de réponse sont arbitraires. L'échelle de temps de rétention est la même pour les deux souches (les
15 temps de rétention sont exprimés en minutes). L'identification des stérols est effectuée selon les critères décrits dans la présente demande.

La présente invention est illustrée à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Les techniques de biologie moléculaire utilisées sont décrites par Ausubel *et al.*,
20 certaines manipulations des levures sont décrites par Adams *et al* (Adams and Holm, 1996).

EXEMPLE 1 : Construction d'une souche de levure *S. cerevisiae* interrompue dans le gène *erg6* (souche WGIF01) :

La souche de levure *S. cerevisiae* WGIF01 dont le gène *ERG6* est interrompu par le
25 gène *TRP1* a été obtenue par transformation de la souche BM64 par un produit de PCR portant un gène fonctionnel *TRP1* bordé par des extrémités homologues au gène *ERG6*.

La souche BM64 (de génotype *MAT α* ; *ura3-52*; *trp1 Δ 2*; *leu2-3_112*; *his3-11*; *ade2-1*; *can1-100*) est un dérivé de la souche de levure *S. cerevisiae* W303 *MAT α* par délétion complète du gène *TRP1*. La souche BMA64 et la souche W303 *MAT α* sont décrites dans la publication de Baudin-Baillieu et al (Baudin-Baillieu et al., 1997).

- 5 Pour isoler le gène *TRP1*, le gène *TRP1* du plasmide pFL44 (Bonneaud et al., 1991) a été amplifié en utilisant la *Z-TaqI* (une DNA polymérase DNA dépendante) fournie par la Société Takara (PanVera LLC 501 Charmany Drive Madison, WI 53719 USA). Le couple d'amorce utilisé permet l'amplification par la DNA polymérase du gène *TRP1* bordé de séquences correspondant au gène *ERG6*.

- 10 La séquence de ces amorces est la suivante :

OERG6trp1 : 5'
(CCTAGCGACGAAAAGCATCATTGGAGTGAATAACTTGGACTTACCAAttcttag
cattttgacg) 3' (SEQ ID N° 1).

- OERG6trp2 : 5' 5'
15 (GCATAAGAGTGAAACAGAATTGAGAAAAAGACAGGCCCAATTCAaattcggg
tcgaaaaaagaaaaagg) 3' (SEQ ID N° 2).

Le produit de PCR (Polymerase Chain Reaction) ainsi obtenu est purifié par électroélution du fragment correspondant à la taille attendue et utilisé pour transformer la souche BM64 par la technique du chlorure de lithium comme décrit par
20 (Gietz et al., 1995).

- Après transformation, les levures traitées sont étalées sur un milieu minimum ne contenant pas de tryptophane (Gietz et al., 1995). On obtient ainsi 41 colonies BM64 transformées prototrophes pour le tryptophane. Ces 41 colonies sont ensuite testées pour trois de leurs propriétés : sensibilité à la nystatine, structure génomique de
25 l'insertion du gène *TRP1*, profil en chromatographie phase gazeuse des stérols totaux qu'elles produisent.

Pour cela, les 41 colonies sont transférées sur un milieu minimum contenant respectivement 10, 20 ou 50 μ g/ml de nystatine, une dizaine de colonies est capable de croître sur le milieu contenant une dose de 50 μ g/ml de nystatine. Ces colonies

résistantes sont sélectionnées pour vérifier leur structure génique ainsi que leurs compositions en stérols.

L'insertion du gène *TRP1* dans le gène *ERG6* est vérifiée par PCR en utilisant un couple d'oligonucléotides couvrant la jonction entre le gène *TRP1* fonctionnel et le
 5 *ERG6* disrupté. Ce couple d'oligonucléotides est le suivant: OERG6trp3: AGGGCCGAACAAAGCCCCGATCTTC (SEQ ID N° 3) et OERG6trp4: GGCAAACCGAGGAACTCTTGG (SEQ ID N° 4).

Quelques souches présentent le profil PCR attendu c'est à dire un fragment de 800 paires de base correspondant à la taille attendue pour une insertion de *TRP1* dans
 10 *ERG6*.

Dans le but de vérifier que le gène *ERG6* est bien inactivé dans ces souches, une analyse des compositions en stérol de ces souches par la chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie liquide haute pression a été réalisée (Duport et al., 2003; Szczebara et al., 2003).

15 Ces analyses confirment l'absence de synthèse d'ergostérol et l'accumulation de stérols anormaux compatibles avec les perturbations attendues de la voie de biosynthèse dans la souche disruptée.

Une souche a été plus particulièrement sélectionnée et nommée WGIF01.

EXEMPLE 2 : Construction des souches CA10, CA14 et CA23.

20 Les souches CA10 (de génotype : *MAT α* , *rho*⁺, *GAL2*, *ura3-52*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *erg5::HYGRO^R*, *ade2::GAL10/CYC1:: Δ 7Réductase::PGK1*, *LEU2::GAL10/CYC1::matADR::PGK1*), CA14 (de génotype : *MAT α* , *rho*⁺, *GAL2*, *ura3-52*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *erg5::HYGRO^R*, *atf2::G418^R*, *ade2::GAL10/CYC1:: Δ 7Réductase::PGK1*, *LEU2::GAL10/CYC1::matADR::PGK1*),
 25 et CA23 (de génotype : *MAT α* , *rho*⁺, *GAL2*, *ura3-52*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *erg5::HYGRO^R*, *are1::G418^R*, *are2::HIS3*, *ade2::GAL10/CYC1:: Δ 7Réductase::PGK1*, *LEU2::GAL10/CYC1::matADR::PGK1*) ainsi que leurs constructions, sont décrites dans la référence Duport et al. dont le contenu technique en ce qui concerne la construction de ces souches est incorporé par référence à la présente demande.

Ces souches produisent et contiennent dans leurs membranes des stérols non naturels (comme décrit dans la demande de brevet européen EP 0727 489) et en particulier de l'ergosta-5-énol (campestérol).

Ces trois souches n'expriment pas le produit du gène *ERG5* qui est non fonctionnel par insertion dans sa séquence codante du gène de résistance à l'hygromycine. De plus ces souches expriment le cDNA codant pour la $\Delta 7$ réductase de plante (la demande de brevet européen EP 0727 489 décrit notamment le clonage de la $\Delta 7$ réductase de la plante *Arabidopsis thaliana*, qui est incorporé par référence à la présente demande, le numéro d'accèsion GenBank de cette séquence est ATU49398).

La souche CA14 est dérivée de la souche CA10 par disruption du gène *ATF2*. Le produit de ce gène conduit à une acétylation de la pregnénolone sur la position 3 (comme il est décrit dans la demande de brevet WO99/40203).

La souche CA23 est une souche dérivée de la souche CA10 par délétion des gènes *ARE1* et *ARE2*, les deux protéines Are1p et Are2p sont responsables de l'estérification de l'ergostérol (Sturley, 2000) et éventuellement du cholestérol car ils sont homologues à l'enzyme responsable de l'estérification du cholestérol chez les mammifères (ACAT).

EXEMPLE 3 : Construction du plasmide d'expression de la $\Delta 24$ -25 réductase d'origine humaine (plasmide pYES_Delta24)

La construction de ce plasmide a été décrite par Waterham *et al.* 2001. La construction a consisté à mettre le cDNA codant pour la Delta 24 stérol réductase sous le contrôle du promoteur pGAL1 et du terminateur tCYC1 dans le vecteur pYES2 (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France). Ce plasmide est un plasmide navette *E.coli/ S cerevisiae* et contient une origine de répllication 2micron et un gène *URA3*, ceci permettant sa répllication dans la levure et des facilités de sélection des levures transformées par ce plasmide.

Le promoteur GAL1 est de plus inductible par le galactose.

EXEMPLE 4 : Construction du plasmide pAG1 exprimant la $\Delta 7$ -réductase d'*A. thaliana*.

Un plasmide a été construit spécifiquement pour l'expression de la Delta 7 Réductase de *A. thaliana* sur un vecteur monocopie. Le plasmide pAM1 a été utilisé
5 pour cette construction. Ce plasmide dont la construction est décrite dans la demande PCT WO02/061109 (cf. exemple 9.b de ladite demande, qui est incorporé par référence à la présente demande) est un plasmide navette *E.coli*/*S. cerevisiae* basé sur une séquence de répllication autonome et un centromère (ARS CEN). Le marqueur de
10 sélection est le gène *ADE2*. Ce plasmide est compatible, et peut donc se répliquer en même temps qu'un plasmide basé sur une origine de répllication 2 micron. Ce plasmide possède en particulier un site unique *NotI* permettant de cloner les cassettes d'expression tel que décrit dans la demande PCT ci-dessus.

Ce site a été utilisé pour cloner une cassette d'expression de la Delta7-réductase d'*A. thaliana* provenant de la souche CA10. En effet, cette cassette d'expression est très
15 efficace et permet à la souche CA10 qui est de plus disruptée pour *ERG5*, de produire du campestérol (ergosta-5-énol) comme stérol majoritaire (Duport et al., 1998). Le fragment d'ADN génomique de la souche CA10 contenant le gène de la delta7-réductase est amplifié à l'aide des amorces suivantes :

OSA72 5' (TATATAGCGGCCGCTTTCGCTGATTAATTACCCAG) 3' (SEQ ID
20 N° 5)

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

L'amplification est réalisée sur de l'ADN génomique de la souche CA10 préparé par la technique rapide d'extraction au phenol/chloroforme comme décrit par Adams *et al*
25 (*Adams and Holm, 1996*).

Cinquante nanogrammes d'ADN génomique de CA10 sont utilisés comme matrice pour amplification à l'aide des amorces OSA72 et OSA77. La Taq DNA polymérase et les conditions enzymatiques provenaient de la société Stratagene. Les conditions d'amplification étaient les suivantes. Dénaturation initiale de 5 min à 95°C, puis
30 ensuite, trente cycles sont réalisés consistant en une dénaturation de 30s à 95°C, une

hybridation de 30s à 50°C puis une élongation de 1 min à 72°C. La réaction est terminée par une extension finale de 10 min à 72°C.

Le fragment de PCR est ensuite digéré par l'enzyme *NotI* et purifié sur gel d'agarose puis cloné classiquement au niveau du site unique *NotI* du plasmide pAM1. Le

5 plasmide ainsi obtenu a été nommé pAG1.

Il s'agit d'un vecteur monocopie permettant l'expression de la Delta7 Réductase de *A. thaliana* chez la levure, le gène de la Delta7 Réductase étant placé sous le contrôle du promoteur GAL10/CYC1 (Lecain et al., 1996).

EXEMPLE 5 : Extraction des stérols libres et estérifiés chez la levure
10 pour les analyses :

1) Conditions d'extraction des stérols libres et estérifiés chez la levure.
(procédure1)

a) Conditions d'extraction des stérols libres :

15 Le culot cellulaire est lavé deux fois avec 500µl d'eau désionisée et filtrée, dans un tube en verre.

Les cellules sont ensuite resuspendues dans 500µl d'eau contenant des billes de verre de 0,5 mm correspondant à 150µl de liquide dans le tube.

Une extraction est réalisée deux fois avec 2ml de 1,2 dichloroéthane avec une agitation forte sur un vortex pendant 10 minutes. Après la première extraction, le
20 mélange cellules, billes de verre, solvant est centrifugé pendant 5 minutes à 1500g dans le but de séparer les deux phases.

Les deux fractions organiques issues des deux extractions successives sont rassemblées et séchées sous un courant d'azote pendant quelques heures.

L'extrait stérolique est suspendu dans 100µl d'acétonitrile pour son analyse par
25 chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Szczepara et al., 2003) ou dans 100µl d'hexane pour les analyses par chromatographie en phase gazeuse (GC) (Duport et al., 2003).

b) Conditions d'extraction des stérols totaux : Saponification et extraction des stérols estérifiés, analyse qualitative procédure 1 :

Le culot cellulaire est resuspendu dans 500µl d'eau purifiée. A cette suspension on ajoute 2ml d'hydroxyde de potassium KOH à 10% dans du méthanol. Le mélange est chauffé pendant une heure à 60°C dans des tubes fermés. Après l'incubation et une fois que les tubes sont revenus à température ambiante, le mélange
5 est extrait trois fois avec 2ml d'hexane. Entre chaque extraction, les deux phases sont séparées par une centrifugation de 5min à 1500g. Après chaque extraction, la phase organique est transférée dans un nouveau tube, puis les trois phases organiques sont rassemblées puis séchées sous un flux d'azote.

Le résidu stérolique est resuspendu dans 100µl d'acétonitrile 100% pour son analyse
10 par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Szczepara et al., 2003) ou dans 100µl d'hexane pour les analyses par chromatographie en phase gazeuse (GC) (Duport et al., 2003).

2) Conditions d'extraction des stérols libres et estérifiés chez la levure pour analyse qualitative (procédure2).

15 Les souches sont cultivées en milieu riche (10g de bactopectone par litre et 10 g d'extraits de levure par litre) avec 2% de glucose comme source de carbone afin d'obtenir 500mg de cellules lyophilisées. Ces cellules séchées sont reprises dans 3ml de méthanol (100%) contenant 1g de KOH et une trace de pyrogallol puis le mélange est incubé pendant 45 minutes à 90°C. Après retour à température ambiante, les
20 stérols sont extraits avec 5ml d'hexane. La phase organique est séparée en trois échantillons de même volume et séchée sous un courant d'air. Deux des échantillons des stérols extraits sont repris dans 100µl d'hexane pour les analyses par chromatographie en phase gazeuse (GC) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS et le troisième échantillon est repris dans 150µl
25 de méthanol pour les études par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

EXEMPLE 6 : Analyse des stérols libres et estérifiés chez la levure par chromatographie en phase gazeuse (GC)

1) Chromatographie en phase gazeuse (GC) avec détection FID (ionisation de flamme)

5 L'extrait stérolique (libre ou total) suspendu dans l'hexane est préparé selon la procédure 1 (cf. exemple 5 1) a) et b)). Un témoin d'injection est ajouté au mélange de stérol, en général le cholestérol à une concentration de 10 à 50ng/ μ l.

On injecte ensuite de 1 à 3 μ l d'échantillons sur un appareil de chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes. 1 à 3 μ l ont été injectés sur une colonne

10 Alltech de type SE30 (Référence de la colonne : 30mX0.32mm IDX 0.25 μ m). Le gaz vecteur est l'hélium. Le rapport de Split est entre 50 et 80. La pression en tête de colonne est de 30 psi. L'injecteur est réglé à 280°C. La température initial de la colonne est de 130°C pendant 0.5 minute. Elle monte à 230°C à raison de 40°C/min, puis de 230°C à 280°C à raison de 3°C/min. La colonne est ensuite

15 maintenue à 290°C. La température du détecteur est de 310°C.

2) Chromatographie en phase gazeuse (GC) avec détection FID (ionisation de flamme) couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).

L'extrait stérolique total suspendu dans l'hexane est préparé selon la procédure 2. La GC utilisée est équipée d'un injecteur classique « split split less »

20 avec une colonne classique DB5 d'une longueur de 30 mètres et d'un diamètre de 0,25mm.

L'injection est réalisée à 230°C avec comme gaz vecteur, l'hélium au débit de 2ml/min. La colonne passe de 130 à 290°C en 4 étapes. La colonne est maintenue à 130°C avant l'injection puis monte à 230°C avec une rampe de 40°C/min puis de

25 230°C à 280°C avec une rampe de 3°C/min puis de 280°C à 290°C avec une rampe de 30°C/min. La colonne reste pendant 5 minutes à 290°C.

En sortie de la colonne de chromatographie en phase gazeuse, les molécules sont ensuite analysées par spectrométrie de masse par vaporisation dans une chambre d'ionisation telle que celle d'un appareil de type Turbo Mass de chez Perkin Elmer.

30 Les molécules sont fragmentées par un faisceau d'électrons de haute énergie. Les

différents fragments sont ensuite séparés sur un filtre quadrupolaire puis détectés sur un détecteur d'ions. A chaque masse localisée sur le graphe de courant ionique correspond un spectre de masse qui regroupe les masses de tous les produits de fragmentation de l'ion M^+ . Ce spectre de masse obtenu à un temps de rétention
5 donné sur la colonne est comparé à des bibliothèques de produits fragmentés ainsi qu'à celles décrites pour les stérols par Quail and Kelly. (Methods in Molecular Biology Vol53 Yeast Protocols Edited by Evans; M, Quail and S, Kelly "The Extraction and Analysis of Sterols from Yeast" pp 123-131 (1996)).

De cette façon, il a pu être mis en évidence l'effet de la délétion du gène *ERG6*
10 dans la souche WGIF01 et notamment l'absence d'ergosta 8, 24(28) diénol et la présence de stérol de type cholesta ayant la double liaison en 24(25).

EXEMPLE 7 : Analyse des stérols libres et estérifiés chez la levure par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec détection UV ou détection par spectrométrie de masse.

15 **1) Analyse par HPLC détection UV :**

Dix à 30 μ l de l'extrait stérolique (suspendu dans l'acétonitrile ou le méthanol et préparé selon la procédure 1 ou 2 (cf. exemple 5)) sont injectés sur une colonne de type X terra RP18, 4,6X100mm (Waters, Milford, MA01757 USA).

La séparation s'effectue sur un gradient composé d'eau contenant 0.02% de TFA
20 (acide trifluoroacétique) (tampon A) et d'acétonitrile pur (tampon B). La colonne est maintenue à 60°C au cours de l'analyse.

L'appareil HPLC utilisé est de type « Waters 600 B System Controller » (Waters, Milford, MA01757 USA). La détection UV a été réalisée sur un détecteur à barrette de diodes couvrant les longueurs d'onde de 206 à 350 nm. La colonne a été
25 équilibrée avec un tampon à 20% (v/v) de tampon A (acétonitrile) et 80% de tampon B (eau contenant 0.02% de TFA (acide trifluoroacétique)). Un gradient linéaire est effectué à partir d'une solution contenant 50% de tampon A et 50% de tampon B. Au bout de 10 min, la composition du tampon d'élution est de 25% de tampon A pour 75 % de tampon B. Un nouveau gradient linéaire est alors appliqué

de façon à ce qu'à 30 min le gradient atteigne la valeur de 100 % en tampon B. Cette valeur est maintenue pendant 5 minutes pour nettoyer la colonne.

2) Analyse par HPLC détection par spectrométrie de masse (HPLC/MS) :

Dans le cas d'une analyse par spectrométrie de masse, l'échantillon est
5 maintenu à 30°C, et la colonne est maintenue à 60°C au cours de l'analyse. L'appareil HPLC utilisé est du type « Alliance HT Waters 2790 », couplé à un détecteur de masse « Waters MicroMass ZQ ». A la différence de la méthode de détection précédente le tampon d'élution A ne contient pas de TFA mais les deux tampons A et B contiennent 0.01 % (v/v) d'acide formique.

10 La colonne a été équilibrée avec un tampon contenant 80% de tampon A' (eau contenant 0.01% (v/v) d'acide formique) et 20% de tampon B' (acétonitrile contenant 0.01% (v/v) d'acide formique).

L'injection démarre avec un tampon contenant 50% de ces deux tampons. Un gradient linéaire à deux rampes est effectué à partir d'une solution contenant 50%
15 de tampon A' et 50% de tampon B'.

Au bout de 10 min, la composition du tampon d'élution est de 25% de tampon A' pour 75 % de tampon B'. La rampe du gradient est ensuite modifiée pour atteindre 12,5% de tampon A' et 87,5% de tampon B' après 25 minutes d'analyse puis 100% de tampon B à 30 minutes. Cette valeur est maintenue pendant 5 minutes pour
20 régénérer la colonne.

Le détecteur de masse « Waters MicroMass ZQ » est réglé pour balayer en ionisation positive electrospray les valeurs de m/z comprise entre 295 à 450. Un mode d'acquisition « continuum » est choisi pour le balayage. Par ailleurs une extraction de signal en mode « SIR » est effectuée en parallèle à toutes les masse attendues en
25 ..abondance isotopique naturelle pour les stérols à analyser. Le détecteur est réglé de manière à résoudre totalement sans interférence des molécules différant de 1 unité de m/z . La totalité des acquisitions est paramétrée de façon à ce que la durée totale d'acquisition correspondant au balayage et au temps total d'acquisition de l'ensemble des SIR reste inférieure à 2 secondes.

EXEMPLE 8 : Culture des souches de levures pour l'analyse de leur contenu en stérol avec ou sans marquage ^{13}C :

Les souches à analyser ont été cultivées dans un volume de 50ml de milieu Kappeli (Kappeli et al., 1985) contenant 2% de D-glucose normal ou de D-glucose- $^{13}\text{C}_6$ (pour les expériences de marquage, cf. figure 10).

La densité optique de la culture de départ est de 0.1 à 600nm. Cette culture est incubée 72 heures à une température de 30°C sous agitation à 200 tours/ min.

Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation du milieu à 600 g pendant 10 minutes. Le culot cellulaire est ensuite analysé directement par les techniques d'analyse présentées dans l'exemple 5 (pour les études ne nécessitant pas d'induction au galactose).

Toutefois, pour les études de cinétique d'induction de l'expression de la delta 7-réductase et la delta 24-réductase (souches transformées par le plasmide pYES_Delta24 et/ou pAG1), le culot est resuspendu dans 50ml de milieu Kappeli frais contenant 2% galactose (non marqué au carbone ^{13}C).

Cette culture est incubée à une température de 30°C sous agitation à 200 tours/ min.

Dix ml de culture sont récupérés après 0 heure, 2 heures, 4 heures, 8 heures et 24 heures de cultures.

Ces échantillons de culture sont centrifugés à 800 g pendant 10 minutes, le culot cellulaire est congelé et conservé à -20°C avant extraction stérolique par les méthodes décrites dans l'exemple 5:

EXEMPLE 9 : Identification des stérols présents dans les souches analysées :

L'identification des stérols est basée sur la combinaison des principes suivants :

- Comparaison du comportement en GC, HPLC, GC/MS et HPLC/MS avec des standards authentiques dans le cas du campestérol (ergosta 5,eneol), de l'ergostérol (ergosta 5,7,22 triéno), du cholestérol (cholesta 5-eneol), du desmostérol (cholesta 5, 24,diéneol), du cholesta 5,22 diéneol et du zymostérol (cholesta 8,24 diéneol).

- Analyse du spectre d'absorption en HPLC et détection UV à barrette de diodes (cf. exemple 7-1)) :

Cette méthode permet d'identifier sans ambiguïté sur la base spectrale cinq classes de stérols : 1) classe SA1 : pas de système diénique conjugué, 2) classe SA2 : présence d'un système 5,7-diénique ; 3) classe SA3 : présence d'un système 22,24(25) diénique ; 4) classe SA4 : présence d'un système 8,14 diénique ; 5) classe SA5 : présence d'un système 22, 24(28) diénique. Les classes SA3 et SA5 ne peuvent coexister pour des raisons structurales. Les classes SA2 et SA4 ne peuvent coexister pour des raisons de biosynthèse, la classe SA2 peut être associée à des motifs structuraux de classes SA1, SA3, SA5 pour former des spectres composites additifs.

- Analyse des temps de rétention en GC et en HPLC sur la base d'une additivité approximative des déplacements de temps de rétention associés à chaque type d'insaturation et à la présence d'un squelette de type ergosta ou cholesta. Ce critère n'étant pas absolu, il est utilisé comme aide à l'identification et pour lever les ambiguïtés mais présente un risque d'erreur s'il est utilisé seul. Il n'est donc utilisé qu'en combinaison avec les autres critères.

- Analyse en GC/MS (cf. exemple 6-2)) qui fournit la masse moléculaire et un profil de fragmentation pouvant être comparé à des bibliothèques de spectres.

- Analyse en HPLC/MS (cf exemple 7-2)) en electrospray qui fournit, dans le cas des 3-hydroxystérols, un signal principal à la masse moléculaire -17 (protonation (+1) et perte d'une molécule d'eau (-18))

- Analyse avec l'ensemble des systèmes ci-dessus de la composition en stérols de différentes souches de levures de référence disruptées à différents points de la biosynthèse.

- Analyse des variations de la composition en stérol lors de la complémentation par différentes enzymes de biosynthèse et de la cinétique de cette complémentation lors de l'induction de cette complémentation.

- Analyse du profil de marquage des différents stérols par l'isotope 13 du carbone.
- Analyse du spectre UV des stérols séparés par HPLC à un temps de rétention donné. Les deux doubles liaisons 5, 7 conjuguées présentent un spectre typique avec deux pics d'absorption entre 265 et 280 nm tandis que les deux double liaison 22, 24 conjuguées présentent un pic d'absorption à 235nm. La dernière double liaison conjuguée en 8, 14 est identifiable par un pic d'absorption à 245 nm.

EXEMPLE 10 : Identification des stérols présents dans la souche BMA64 :

- La souche BMA64 est cultivée dans un volume de 50ml de milieu Kappeli contenant 2% de D-glucose pour l'analyse quantitative et comparative des stérols. La densité optique de la culture de départ est de 0.1 à 600nm. Cette culture est incubée 72 heures à une température de 30°C sous agitation à 200 tours/ min. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation du milieu à 600 g pendant 10 minutes, le culot cellulaire est analysé par les techniques présentées dans l'exemple 5.
- Les différentes analyses décrites ont permis d'identifier les stérols produits par cette souche.
- On a ainsi déterminé que cette souche accumule plus de 80% de ses stérols libres sous forme d'ergostérol (ergosta 5,7,22 triéanol) (cf. Figure 8). Deux autres stérols minoritaires détectables sont produits par cette souche, il s'agit de l'ergosta 5,7 diéanol (substrat du produit du gène ERG5) (12%) et le zymostérol (ergosta 8,24 diéanol) (5%). Aucune trace de cholestérol n'est détectable (la limite de détection de la méthode est d'environ 0.5 % des stérols observables). De faibles quantités de lanostérol sont également détectables (uniquement au niveau des analyses des stérols totaux).

EXEMPLE 11 : Identification des stérols présents dans la souche WGIF01 :

La souche WGIF01 (cf. exemple 1) a été cultivée dans un volume de 50ml de milieu Kappeli (Kappeli et al., 1985) contenant 2% de D-glucose pour l'analyse quantitative et comparative des stérols.

La densité optique de la culture de départ est de 0.1 à 600nm. Cette culture est incubée 72 heures à une température de 30°C sous agitation à 200 tours/ min.

Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation du milieu à 600 g pendant 10 minutes, le culot cellulaire est analysé par les techniques présentées dans l'exemple 5.

Les différentes analyses décrites ont permis d'identifier les stérols produits par cette souche.

La recherche dans le chromatogramme d'ergosta 5,7,22 triénol (ergostérol) ou de ergosta 5,7 diéneol est négative (moins de 0,5% de la valeur obtenue chez BMA64) en HPLC couplée à la spectrométrie de masse. Au niveau des stérols libres, la souche accumule pour 50% du total du zymostérol (cholesta 8,24 diéneol), substrat du produit du gène ERG6, et pour 30 et 20 % respectivement, du cholesta 5,7,24 triénol et du cholesta 5,7,22,24 tétraénol résultant probablement d'un mécanisme de synthèse identique à celui conduisant à l'ergosta 5,7 diénol et à l'ergosta 5,7,22 triénol chez la souche parentale (cf. figure 3 et 8). Ceci montre bien que la voie de biosynthèse est

bloquée au niveau de *erg6* puisque l'enzyme ERG6p (S-adenosylmethionine delta24 stérol C-méthyl transférase) transforme le cholesta 8,24 (25) diéneol en ergosta 8, 24(28) diéneol (cf. figure 2). Cette accumulation indique clairement que la souche WGIF01 ne possède pas de copie fonctionnelle du gène *erg6*. Les résultats indiquent également que la voie de biosynthèse normale de l'ergostérol chez la levure et en particulier la stérol 8,7-isomérase, la stérol 5-desaturase et la stérol delta 22-desaturase, sont capables de convertir les substrats de type cholesta- avec une activité qui reste importante.

EXEMPLE 12 : Construction de la souche WGIF02 et identification des stérols présents dans cette souche :

La souche WGIF02 a été obtenue par transformation de la souche WGIF01 par le plasmide pYES2 portant la cassette d'expression de la $\Delta 24$ Réductase (pYES_Delta24, cf. exemple 3). Les clones ont été sélectionnés sur un milieu 5 (pYES_Delta24, cf. exemple 3). Les clones ont été sélectionnés sur un milieu dépourvu en uracile et la présence et l'expression du cDNA de $\Delta 24$ réductase est vérifiée en analysant les stérols de ces transformants par la procédure 1 (cf. exemple 5-1)).

Un clone nommé WGIF02 a été sélectionné car il possédait un profil stérolique 10 différent de la souche WGIF01, de plus le stérol supplémentaire avait un temps de rétention proche de celui du cholestérol (cf. figure 7). La souche WGIF02 est cultivée dans un volume de 50ml de milieu Kappeli (Kappeli et al., 1985) contenant 2% de D-glucose pour l'analyse quantitative et comparative des stérols.

La densité optique de la culture de départ est de 0.1 à 600nm. Cette culture est incubée 15 72 heures à une température de 30°C sous agitation à 200 tours/ min.

Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation du milieu à 600 g pendant 10 minutes, le culot cellulaire est analysé par les techniques présentées dans l'exemple 5. Les différentes analyses décrites ont permis d'identifier les stérols produits par cette souche.

20 Les deux profils d'extraits stéroliques de la souche WGIF01 et de la souche WGIF02 sont semblables sauf à l'apparition d'un nouveau pic identifié par sa masse, son temps de rétention et ses doubles liaisons conjuguées comme le cholesta 5,7,22 trieneol (Figures 2, 3 et 7). La présence de ce composé indique la présence attendue d'une activité 24-25 stérol réductase sur la double liaison en 24(25) du cholesta 5, 7, 22, 24 (25) tétraenol. De plus, la quantité de cholesta 5, 7 24 trienol est diminuée 25 avec apparition du cholesta 5, 7, 22 trienol dans la souche WGIF02 (figures 7 et 8) . L'activité de l'enzyme est mise en évidence par la conversion du cholesta 5,7,24 trienol représentant 30% dans la souche WGIF01 et seulement 12% dans WGIF02, la différence soit 18% se retrouvant intégralement sous forme de cholesta 5,7,22 trienol 30 dans la souche WGIF02. Il s'agit là d'un résultat inattendu dans la mesure où le

produit de conversion du cholesta 5,7,24 par la delta 24-réductase est le cholesta 5,7, qui est absent dans WGIF02 donc quantitativement convertit en cholesta 5,7,22. Ceci met en évidence un autre résultat inattendu, à savoir que le cholesta 5,7 est un substrat de la stérol 22-désaturase alors que le cholesta 5,7,24 est d'après le profil stérolique de la souche WGIF01 un mauvais substrat.

EXEMPLE 13 : Construction de la souche WGIF03 et identification des stérols présents dans cette souche :

La souche WGIF03 a été obtenue par transformation de la souche WGIF01 par le plasmide pAG1. Ce plasmide navette entre *E.coli* et *S.cerevisiae* porte une cassette d'expression pour la $\Delta 7$ réductase dont le cDNA correspondant se trouve sous contrôle du promoteur GAL10/CYC1. La souche WGIF01 a été transformée par la technique du chlorure de lithium et les transformants ont été sélectionnés sur milieu ne contenant pas d'adénine. L'expression de la Delta7 réductase a été vérifiée par l'apparition dans le profil stérolique des bons clones de cholesta 5,24(25) diénol. Un clone répondant à ces critères a été plus particulièrement sélectionné et nommé WGIF03.

La souche WGIF03 a été cultivée dans un volume de 50ml de milieu Kappeli (Kappeli et al., 1985) contenant 2% de D-glucose pour l'analyse quantitative et comparative des stérols.

La densité optique de la culture de départ est de 0.1 à 600nm. Cette culture est incubée 72 heures à une température de 30°C sous agitation à 200 tours/min.

Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation du milieu à 600 g pendant 10 minutes, le culot cellulaire est analysé par les techniques présentées dans l'exemple 5.

Les différentes analyses décrites ont permis d'identifier les stérols produits par cette souche.

L'expression de la delta7 stérol réductase dans la souche WGIF01 (pour donner la souche WGIF03), contrairement à l'expression de la delta24 stérol réductase, conduit à un profond changement du profil stérolique de la souche avec disparition presque total des cholesta 5,7, 22, 24 tetraénol, des cholesta 7, 24 diénol et des cholesta 8,24 diénol.

47

Cette activité est également marquée par l'apparition d'un pic majoritaire identifié comme décrit précédemment comme le cholesta 5, 24 diéneol ou desmostérol. Les quantités de cholesta 8, 24 diéneol passent de 12 à 48%. Le cholesta 5, 7, 24 triéneol détecté passe de 30 à 3% et le cholesta 5, 7, 22, 24 tétraéneol détecté de 23 à 4%, respectivement pour les souches WGIF01 et WGIF03. Ces observations indiquent, de manière inattendue, que la stérol delta 7-réductase réduit les cholesta 5,7 diéneol de manière presque indépendante de la nature des insaturations portées par la chaîne latérale des stérols. Ce résultat est opposé à celui observé avec la stérol delta 24-réductase. De manière inattendue, l'expression de la stérol delta 7-réductase conduit également à l'accumulation (12 %) d'une molécule co-migrant avec le cholesta 5,7 diéneol. Il semble néanmoins peu probable bien que non exclus que cette molécule soit du cholesta 5,7 diéneol dont le niveau théorique devrait décroître et non augmenter dans ces conditions. L'apparition de faible quantité de cholesta 5,22,24 triéneol (8%) est aussi d'intérêt. Ce dernier stérol est le produit attendu de l'action de la stérol 22-desaturase sur le cholesta 5,24 diéneol stérol majoritaire (60%) dans la souche WGIF03 (résultant de la réduction du cholesta 5,7,24 triéneol par la stérol delta 7-réductase). La faible accumulation de cholesta 5,22,24 triéneol indique de manière inattendu que le cholesta 5,24 diéneol n'est pas un bon substrat de la stérol 22-desaturase. Grâce aux résultats obtenus dans la souche WGIF02 (cf exemple 12), il peut être déduit que la présence d'une insaturation en 24 (cholesta 5, 24 diéneol ou cholesta 5,7,24 triéneol) rend les stérols difficilement métabolisable par la stérol 22-desaturase. L'action de l'enzyme ERG6p en transformant les cholesta insaturés en 24 en ergosta, conduit donc à transformer de mauvais substrats du gène ERG5 (22-desaturase) en bons substrats.

EXEMPLE 14 : Construction de la souche WGIF04 et identification des stérols présents dans cette souche :

La souche WGIF04 a été obtenue par transformation de la souche WGIF02 par le plasmide pAG1 par la technique du chlorure de lithium et les transformants ont été sélectionnés sur milieu ne contenant pas d'adénine ni d'uracile. Les bons transformants ont alors été confirmés sur la base de la détection de l'accumulation de

cholestérol. Un clone répondant à ces critères a été plus particulièrement sélectionné et nommé WGIF04. Un échantillon de la souche WGIF04 a été déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux 75724 Paris Cedex 15, France, le 22 avril 2004 sous le numéro d'enregistrement I-3203.

Des souches indistinguables de WGIF04 peuvent être aussi obtenues en transformant la souche WGIF03 par pYES_Delta24 et en appliquant la même sélection.

La souche WGIF04 a été cultivée dans un volume de 50ml de milieu Kappeli contenant 2% de D-glucose pour l'analyse quantitative et comparative des stérols. La densité optique de la culture de départ est de 0.1 à 600nm. Cette culture est incubée 72 heures à une température de 30°C sous agitation à 200 tours/ min. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation du milieu à 600 g pendant 10 minutes, le culot cellulaire est analysé par les techniques présentées dans l'exemple 5. Les différentes analyses décrites ont permis d'identifier les stérols produits par cette souche.

Le cholestérol représente 25 % des stérols libres de la souche WGIF04 (cf. figure 9). La formation de cholestérol dans cette souche est indépendamment démontrée en GC et en HPLC par la co-migration avec un standard authentique et par confirmation à la fois en GC/MS et en HPLC/MS. Le cholestérol est non-déTECTABLE (< 0,5% des stérols totaux) dans toutes les souches qui n'expriment pas simultanément la delta 7-réductase et la delta 24-réductase.

Les souches qui ne sont pas disruptées pour le gène *erg6* peuvent produire du cholestérol, toutefois, celui-ci représente moins de 5 % des stérols libres totaux. Ainsi, il a pu être construit la souche BMA64-pYES_Delta24-pAG1 obtenue à partir de BMA64 co-transformée par pYES_Delta24 et pAG1. Cette souche produit du cholestérol, ce dernier représentant quelques % des stérols totaux.

La souche CA10 a été transformée par le plasmide pYES_Delta24. Cette souche produit également du cholestérol, ce dernier représentant quelques % des stérols totaux.

49

Il a pu être démontré par ailleurs que la formation du cholestérol nécessite bien l'induction des promoteurs de la delta 7-réductase et la delta 24-réductase (cf. figures 4 et 5). Les souches contenant ces gènes ne produisent pas de cholestérol en absence d'induction, la figure 5 indique que le niveau maximal de cholestérol est atteint après environ 24 h d'induction. Parallèlement à la formation de cholestérol (cholesta 5-eneol) on observe également la formation de cholesta 5,22 diéneol. L'analyse de la figure 4 et de la figure 5 indique que la formation de ce dernier composé se produit plus rapidement après l'induction que la formation de cholestérol et commence même avant l'induction (cf. figure 5A : $m/z=367$). Néanmoins ce composé est totalement absent si la souche ne porte pas les deux plasmides pAG1 et pYES_Delta24. La formation de 22-dehydrocholestérol est donc un processus plus rapide que celui de formation du cholestérol mais ce processus implique un précurseur qui disparaît rapidement après induction laissant place à la formation de cholestérol. Le cholestérol peut être formé à partir de cholesta 5,24 via la Δ 24-réductase ou à partir de cholesta 5,7 via la Δ 7-réductase. Or il a été montré que le cholesta 5,7 diéneol ne peut s'accumuler du fait de sa conversion immédiate en cholesta 5,7,22 triéneol. La source du cholestérol est donc le cholesta 5,24 diéneol qui est absent au moment de l'induction et s'accumule vers 4 à 8 heures d'induction avant de diminuer vers 24h (figure 5). Ceci explique l'apparition tardive du cholestérol puisque la synthèse préalable de cholesta 5,24 diéneol est requise. A l'opposé, les deux précurseurs possibles du cholesta 5,22 diéneol sont le cholesta 5,7,22 triéneol et le cholesta 5,22, 24 triéneol. Ce dernier est absent au début de l'induction (figure 4) alors que le premier est présent puis diminue rapidement en parallèle avec la stabilisation de la formation de cholesta 5,22 diéneol. Il peut en être conclu que la source de cholestérol est la réduction du 5,24 diéneol par la Δ 24-réductase alors que la formation du cholesta 5,22 diéneol résulte de la réduction du 5,7,22 triéneol par la Δ 7réductase. La formation de cholesta 5,22 diéneol par action de la Δ 22- desaturase sur le cholestérol n'est pas totalement exclue mais semble un processus minoritaire sur la base de l'accumulation préférentielle de cholestérol par rapport au cholesta 5,22 diéneol au temps long (24h) de la cinétique (figure 4 et 5).

EXEMPLE 15 : Optimisation de la voie de biosynthèse du cholestérol, rôle de la $\Delta 22$ -desaturase :

Pour des durées d'induction de l'ordre de 24 h de la souche WGIF04 l'accumulation de cholesta 5,22 diéneol représente environ 50 % de celle du cholestérol au niveau des stérols libres (figure 4). La disruption du gène de la $\Delta 22$ -desaturase est une option pour optimiser la production de cholestérol. La construction d'une souche doublement disruptée au niveau de la $\Delta 22$ -desaturase (gène *erg5*) et du gène *erg6* et exprimant la $\Delta 7$ -réductase et la $\Delta 24$ -réductase est parfaitement envisageable. Une souche portant le sous-ensemble : disruption de la $\Delta 22$ -desaturase, expression de la $\Delta 7$ -réductase et expression de la $\Delta 24$ -réductase a été réalisée.

Cette souche a été obtenue par transformation de la souche CA10 par le plasmide pYES_Delta24 par la technique du chlorure de lithium et par sélection pour la prototrophie envers l'uracile. La souche obtenue a été nommée CA10/ $\Delta 24$.

La souche CA10 exprimant la $\Delta 24$ stérol réductase produit une quantité relativement faible de cholestérol (cf. figure 6 et 7) et accumule de manière majeure de l'ergosta 5-éneol et de manière intermédiaire de l'ergosta 5,7 diéneol. L'accumulation de cholesta 5,7 diéneol est très faible dans une telle souche indiquant que la disruption du gène *erg6* est indispensable à l'accumulation importante de dérivés de la série cholesta. L'activité de la $\Delta 24$ -réductase est donc, de manière inattendue, peu compétitive avec celle du produit du gène *erg6*. Il peut donc être conclu de ces résultats que la disruption simultanée des gènes *erg5* et *erg6* est importante dans le but d'optimiser la production de cholestérol.

La disruption du gène *erg5* dans la souche WGIF04 permettrait à l'homme du métier d'augmenter de manière importante la production en cholestérol. La faisabilité d'une telle souche est établie par la construction des souches WGIF04 et CA10/ $\Delta 24$ et le fait que cette souche n'est qu'une combinaison génétique évidente à réaliser des deux souches précédentes. Les données issues de WGIF04 indiquent la disparition rapide du cholesta 5,24 lors de l'expression de la $\Delta 24$ -réductase (en comparant les résultats obtenus avec WGIF03 et ceux obtenus avec WGIF04). Ceci permet de prédire une synthèse très efficace de cholestérol dans une souche disruptée simultanément pour les

gènes *erg5* et *erg6*, et co-exprimant la $\Delta 7$ -réductase et la $\Delta 24$ -réductase, le cholestérol étant alors le seul stérol terminal.

En conclusion le minimum requis pour la production de cholestérol à un seuil supérieur ou égal à 20% des stérols totaux est la disruption du gène *erg6*, l'expression de la $\Delta 7$ -réductase et de la $\Delta 24$ -réductase. La disruption complémentaire de la $\Delta 22$ -desaturase permettrait d'améliorer la productivité en cholestérol et d'éliminer la formation parasite de cholesta 5, 22 diéneol comme stérol terminal.

EXEMPLE 16 : Marquage isotopique du cholestérol et définition de signatures isotopiques :

10 Le principe de l'obtention d'un cholestérol marqué est décrit à la figure 10. Cette manipulation consiste à tout d'abord faire croître la levure sur du glucose totalement marqué au ^{13}C pendant 72 heures de culture à 30°C.

Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation du milieu à 600 g pendant 10 minutes. Le culot de cellules est ensuite suspendu dans 50ml de milieu Kappeli frais
15 contenant 2% de galactose non marqué au carbone ^{13}C . Les cultures sont arrêtées 2 heures, 4 heures, 8 heures ou 24 heures après le passage en galactose, les stérols sont extraits puis analysés (cf. exemple 7). Le passage de glucose en galactose provoque l'induction des promoteurs GAL10/CYC1 contrôlant à la fois le gène de la $\Delta 7$ -réductase et celui de la $\Delta 24$ -réductase. Simultanément il y a changement de marquage
20 isotopique de la source de carbone. Il s'ensuit la synthèse *de novo* d'intermédiaires métaboliques puis de stérol, incluant le cholestérol et comportant un changement progressif de marquage. Ce changement de marquage peut être caractérisé par le profil de masse de chaque stérol intermédiaire. En effet l'incorporation de chaque atome de ^{13}C induit un décalage de masse d'une unité de masse atomique (UMA). Ainsi par
25 exemple le cholestérol apparaît avec une masse molaire variant de 386 à 413 daltons selon le niveau de marquage. En analyse par HPLC-masse, en utilisant l'ionisation électrospray positive, ceci correspond à des m/z (masse/charge) variant de 369 à 396 (ion $\text{M}^+ \text{H}^+ - \text{H}_2\text{O}$, soit $\text{M}+1-18=385-17=369$). Le temps de rétention des stérols en HPLC ne dépendant pas de manière détectable du niveau de marquage, le spectre de
30 masse d'un pic HPLC correspondant à un stérol « X » unique, correspond à une

52

distribution de masse qui est donc la superposition (la somme) des distributions de masse du stérol « X » synthétisé à différents temps après le marquage. Il s'agit donc d'un profil complexe (figure 11), mais parfaitement déterminable expérimentalement, qui représente une signature isotopique unique qui dépend à la fois :

- 5 -1) du protocole de marquage et en particulier des durées et des conditions de culture en ^{12}C glucose et en ^{13}C galactose.
- 2) de la structure génétique précise de la souche utilisée
- 3) du temps précis d'arrêt des cultures

Ce profil isotopique a plusieurs propriétés uniques :

- 10 -1) il est modulable à volonté en jouant sur les conditions de culture, la souche utilisée et le stérol choisi. Un registre de marqueurs unique peut donc être produit.
- 2) il est « combinable » à savoir que plusieurs signatures isotopiques correspondants à plusieurs stérols uniques marqués par des profils isotopiques eux-même modulables peuvent être combinés pour former un « alphabet moléculaire »
- 15 -3) il est reproductible et facile à déterminer expérimentalement (cf. figure 11 et 12) les double ou triple traces qui indiquent la reproductibilité des profils.
- 4) il correspond à un mélange moléculaire traceur facile à isoler, stable, incolore et inodore, non volatile, non toxique et incorporable à des aliments, médicament, additifs ou autres produits assimilables par l'homme.
- 20 -5) il est infalsifiable sauf à disposer des souches recombinantes spécifiques et des conditions très précises de marquage, de culture et d'extraction. De plus la connaissance de la signature isotopique ne permet pas de remonter aux paramètres qui ont permis de la produire.

En résumé un « alphabet isotopique » infalsifiable, d'usage général et incorporable
25 dans tout type de produits, y compris consommables est inventé. Les « mots isotopiques » constituables à partir d'un tel alphabet sont en nombre quasi illimité en mettant à profit à la fois les profils de marquage et les différents types de stérols. L'incorporation de telles signatures au sein de produits les plus variés constitue donc une méthode unique de marquage infalsifiable, contrairement par exemple aux

53
signatures ADN qui peuvent être reproduites une fois connues. La signature peut être lue par ailleurs de manière non destructive, par exemple par ionisation laser suivie d'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF ou assimilé).

EXEMPLE 17 : Production de cholestérol non animal hautement marqué au ^{13}C :

L'utilisation de galactose ^{13}C ou de glucose et d'éthanol ^{13}C en lieu et place des sources de carbone non marqué pour la culture de la souche WGIF04 dans les conditions décrites précédemment pour les analyses de stérols permet la synthèse de stérols et en particulier de cholestérol très fortement marqué (comportant au moins 95 % de carbone ^{13}C). La préparation de stérols et de cholestérol radioactif ^{14}C est également possible par la même approche. Le procédé peut aussi être incorporé à des souches de levures produisant des stéroïdes et notamment de l'hydrocortisone (cf demande de brevet WO 02/061109) pour produire des stéroïdes marqués au ^{13}C ou au ^{14}C par exemple pour des tests RIA.

EXEMPLE 18 : Construction d'une souche produisant majoritairement du cholestérol :

La souche CDR07 Mata est décrite dans la demande de brevet publiée sous le numéro WO02061109 et a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, selon les dispositions du Traité de Budapest à la CNCM le 24 janvier 2001 sous le numéros d'ordre I-2616.

La souche CDR07 MATa (marqueurs pertinents : *ade2::GALI0/CYC1_p:: Δ^7* ; *erg5::PGK1_p::hygro^R*; *ERG6*) a été croisée avec la souche WGIF01 décrite dans l'exemple 1 (marqueurs pertinents : *ERG5*; *erg6::TRP1*).

Après sporulation du diploïde, la composition en stérol des spores est déterminée pour trouver des spores produisant du desmostérol qui est le précurseur du cholestérol comme décrit dans l'exemple 6. On a ainsi identifié une spore produisant du desmostérol et possédant un gène *TRP1* fonctionnel et portant le cDNA, de la Δ^7 réductase d'*Arabidopsis thaliana*, ainsi qu'indiqué par l'analyse par PCR. De

plus, cette souche, dénommée YIM59, est sensible à l'hygromycine indiquant que le gène *ERG5* est fonctionnel.

Une préparation stérolique, préparée comme décrit dans les exemples 6 et 9, a montré que cette souche YIM59 produit des stérols ayant le même temps de rétention que le zymostérol et le desmostérol. La souche YIM59 a également montré des auxotrophies pour l'adénine, la leucine, l'uracile et l'histidine. La présence de desmostérol démontre que cette souche exprime la stérol $\Delta 7$ réductase et qu'elle porte un allèle non fonctionnel *erg6*.

10 Dans le but d'améliorer le niveau d'expression de la DHCR24 humaine, la séquence nucléotidique du cDNA de la DHCR24 a été modifiée ; afin d'améliorer la traduction au niveau de l'ATG initiateur, le promoteur contrôlant l'expression du DHCR24 a également été modifié. Le nouveau promoteur choisi est le promoteur *CYC1* du cytochrome c1 en remplacement du promoteur inductible *GAL1* du plasmide pYES Delta24 (cf. exemple 3).

15 La séquence correspondant au NH2 terminal de la DHCR24 réductase en fusion avec le promoteur CYC1 a été modifiée comme suit :

tagcgtggatggccaggcaacttiagtgtgacacatacaggcatatataatgtgtgcgacgacacatgaicatatggcatg
caigtgctctgtatgtatataaaactcttgttttcttctttctctaanaiaitctticttatacattaggtcctttgtagcatabaaaitacta
tacttctatagacacgcaaacacaaaggaattgacaagtttgtacaaaaaagcaggcttaaaaaATGGAAGCTGCC

20 GTGTCGCTGGCCGTGTGCG (SEQ ID N° 7).

En petit caractère, on retrouve la séquence nucléotidique partielle du promoteur *CYC1* puis les séquences de recombinaison AttB1 ensuite une séquence AAAA qui précède l'ATG initiateur. La séquence des deux premiers codons a également été modifiée (séquence GAA-CCT après le codon initiateur ATG).

25 Le plasmide final portant le cDNA de la DHCR24 sous contrôle du promoteur CYC1 ainsi que l'origine de répllication 2 μ de *S.cerevisiae* et le marqueur de sélection URA3-d a été nommé pIM331. Son équivalent sans le cDNA de la DHCR24 a été dénommé pIM303.

La souche YIM59 est transformée indépendamment par les plasmides pIM303 et pIM331 et deux transformants portant le plasmide pIM303 (souche YIM59/pIM303) ou pIM331 (souche YIM59/pIM331) sont plus particulièrement sélectionnés.

Ces souches sont cultivées dans un milieu riche reconstitué de type Kappeli pendant 5 72 heures à 28°C pour atteindre une absorbance de 40 à 600nm. Des extraits stéroïques totaux (stérols estérifiés et stérols libres) de la souche YIM59/pIM303 (ne portant pas le cDNA de la DHCR24) et de la souche YIM59/pIM331 (portant le cDNA de la DHCR24) sont réalisés en présence de potasse méthanolique (cf. Exemples 5 et 6). Ces deux souches sont testées pour leur capacité à produire du 10 cholestérol. Une partie des résultats (GC) est présentée en figure 13. Les temps de rétention présentés sont donnés en minutes sur les deux chromatogrammes.

Il a ainsi pu être montré que la souche qui ne porte pas le vecteur d'expression de la DHCR24 (souche YIM59/pIM303) ne produit pas de cholestérol (partie A) mais principalement du desmostérol (partie A). A l'inverse, la souche qui porte le cDNA de 15 la DHCR24 (souche YIM59/pIM331) produit un stérol ayant le temps de rétention du cholestérol (partie B). Il a pu être démontré par des techniques de chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse par impact électronique (comme décrit à l'exemple 6) que ce stérol est bien du cholestérol. En utilisant les surfaces de chacun des pics de stérol, il a pu être estimé à 57% des stérols la quantité de 20 cholestérol produite par la souche YIM59/pIM331.

Dépôt de matériel biologique

Les organismes suivants ont été déposés le 22 avril 2004 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, selon les dispositions du Traité de Budapest.

25 - Souche WGIF04 déposée sous le numéro d'enregistrement I-3203.

Toutes les publications et brevets cités sont incorporés à la présente demande par référence.

Bibliographie :

- Adams, A.K., and C. Holm. 1996. *Mol Cell Biol.* 16:4614-20.
- Ausubel Fred M., Brent Roger, Kingston Robert E., Moore David D., Seidman J.G., Smith John A., Struhl Kevin (Editeurs). Current Protocols in Molecular Biology, publié par John Wiley & Sons Inc. Current Protocols Customer Service, 605 Third Avenue, 9th Floor New York, NY 10158 USA (édition mise à jour de Mars 2002).
- Bandin-Baillien, A., E. Guillemet, C. Cullin, and F. Lacroute. 1997. *Yeast.* 13:353-6.
- Bonneaud, N., O. Ozier-Kalogeropoulos, G.Y. Li, M. Labouesse, L. Minvielle-Sebastia, and 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, and D. Pompon. 2003. *Eur J Biochem.* 270:1502-14.
- Gietz, R.D., R.H. Schiestl, A.R. Willems, and 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, and 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, and J.L. Giner. 2002. *Mol Microbiol.* 44:989-99.
- Kappeli, O., M. Arreguin, and M. Rieger. 1985. *J Gen Microbiol.* 131:1411-6.
- Kelly, S.L., D.C. Lamb, B.C. Baldwin, A.J. Corran, and D.E. Kelly. 1997. *J Biol Chem.* 272:9986-8.
- Lecain, E., X. Chenivresse, R. Spagnoli, and D. Pompon. 1996. *J Biol Chem.* 271:10866-73.
- McCammon, M.T., M.A. Hartmann, C.D. Botterna, and L.W. Parks. 1984. *J Bacteriol.* 157:475-83.
- Moebius, F.F., B.U. Fitzky, J.N. Lee, Y.K. Paik, and H. Glossmann. 1998. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1899-902.
- Noda, H., and Y. Koizumi. 2003. *Insect Biochem Mol Biol.* 33:649-58.

- 57
- Ozier-Kalogeropoulos, O., A. Malpertuy, J. Boyer, F. Tekaia, and B. Dujon. 1998. *Nucleic Acids Res.* 26:5511-24.
 - Skaggs, B.A., J.F. Alexander, C.A. Pierson, K.S. Schweitzer, K.T. Chum, C. Koegel, R. Barbuch, and M. Bard. 1996. *Gene.* 169:105-9.
 - 5 - Sturley, S.L. 2000. *Biochim Biophys Acta.* 1529:155-63.
 - Szczebara, F.M., et al.. 2003. *Nat Biotechnol.* 21:143-9.
 - Tait, E., M.C. Simon, S. King, A.J. Brown, N.A. Gow, and D.J. Shaw. 1997. *Fungal Genet Biol.* 21:308-14.
 - Taton, M., and A. Rabier. 1991. *Biochem Biophys Res Commun.* 181:465-73.
 - 10 - Taylor, F.R., and L.W. Parks. 1978. *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, and R.J. Wanders. 2001. *Am J Hum Genet.* 69:685-94.
 - Wood, V., et al. 2002. *Nature.* 415:871-80.

15 Table 1 : Evaluation des contributions spectrales des insaturations des stérols
(coefficients d'extinction mM⁻¹cm⁻¹)

Insaturation	Longueur d'onde (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

REVENDICATIONS

1. Organisme du règne des *Fungi* produisant de manière autonome du cholestérol.

2. Organisme selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est génétiquement
5 modifié.

3. Organisme selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il produit du cholestérol à partir d'une source de carbone simple.

4. Organisme selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il exprime les enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-
10 réductase.

5. Organisme selon la revendication 4 dans lequel l'enzyme stérol 24-C-méthyltransferase a été inactivée.

6. Organisme selon la revendication 4 ou 5 dans lequel l'enzyme C-22 stérol désaturase a été inactivée.

15 7. Organisme selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisé en ce que l'expression des enzymes 7-déhydrocholestérol réductase et 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase est obtenue par transformation de l'organisme.

8. Organisme selon l'une des revendications 5 à 7 caractérisé en ce que l'inactivation de l'enzyme stérol 24-C-méthyltransferase est réalisée par inactivation
20 génique.

9. Organisme selon l'une des revendications 5 à 8 caractérisé en ce que l'inactivation de l'enzyme C-22 stérol désaturase est réalisée par inactivation génique.

10. Organisme selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est choisi dans le genre *Saccharomyces* ou *Schizosaccharomyces*.

11. Souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche WGIF04 déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) le 22 avril 2004 sous le numéro d'enregistrement I-3203.

12. Procédé de production de cholestérol d'origine non animal comprenant la culture d'un organisme selon l'une des revendications précédentes.

13. Procédé selon la revendication 12 caractérisé en ce que l'étape de culture de l'organisme est suivie d'une étape d'extraction du cholestérol.

14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'extraction du cholestérol est effectuée par un solvant non miscible dans l'eau.

15 15. Procédé selon la revendication 13 ou 14 caractérisé en ce que l'on effectue une étape de saponification avant l'extraction du cholestérol.

16. Procédé selon la revendication 13, 14 ou 15 caractérisé en ce que l'on effectue une étape de broyage mécanique des cellules avant la saponification ou l'extraction du cholestérol.

15 17. Utilisation d'un organisme selon l'une des revendications 1 à 11 pour la production de cholestérol, ou de l'un de ses d'intermédiaires métaboliques, ou d'un mélange de stérols marqué au ^{13}C ou au ^{14}C .

18. Procédé de production de cholestérol, ou de l'un de ses d'intermédiaires métaboliques, ou d'un mélange de stérols marqué au ^{13}C ou au ^{14}C comprenant les étapes suivantes :

- culture d'un organisme selon l'une des revendications 1 à 11 sur un substrat marqué au ^{13}C ou au ^{14}C et,
- extraction dudit cholestérol, ou de l'un de ses intermédiaires métaboliques, ou du mélange de stérols.

19. Procédé de fabrication d'un mélange isotopique de cholestérol, d'intermédiaires ou de métabolites du cholestérol, marqués en différentes positions à l'aide de marqueurs isotopiques, comprenant la mise en culture d'un organisme selon l'une des revendications 1 à 9 sur un substrat marqué puis sur un substrat non marqué, les durées de culture sur chacun de ces substrats étant choisies afin d'obtenir un profil isotopique défini.

20. Composition contenant, à titre de marqueur de traçabilité, un mélange isotopique de cholestérol, d'intermédiaires ou de métabolites du cholestérol, marqués en différentes positions à l'aide de marqueurs isotopiques et présentant un profil isotopique défini.

21. Composition selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle est destinée au domaine de l'alimentation ou de la thérapie humaine ou animale.

22. Echantillon de molécules de cholestérol, d'intermédiaires ou de métabolites du cholestérol marquées en différentes positions à l'aide de marqueurs isotopiques présentant un profil isotopique défini et susceptible d'être obtenu par le procédé de fabrication selon la revendication 19.

61

1/13

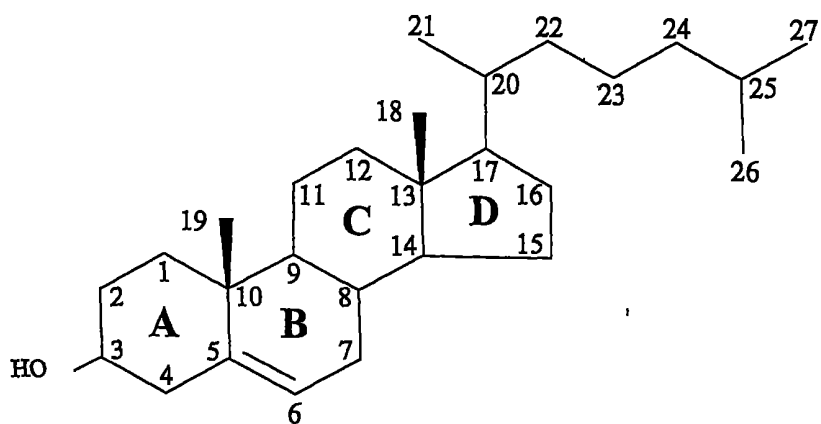


FIG 1

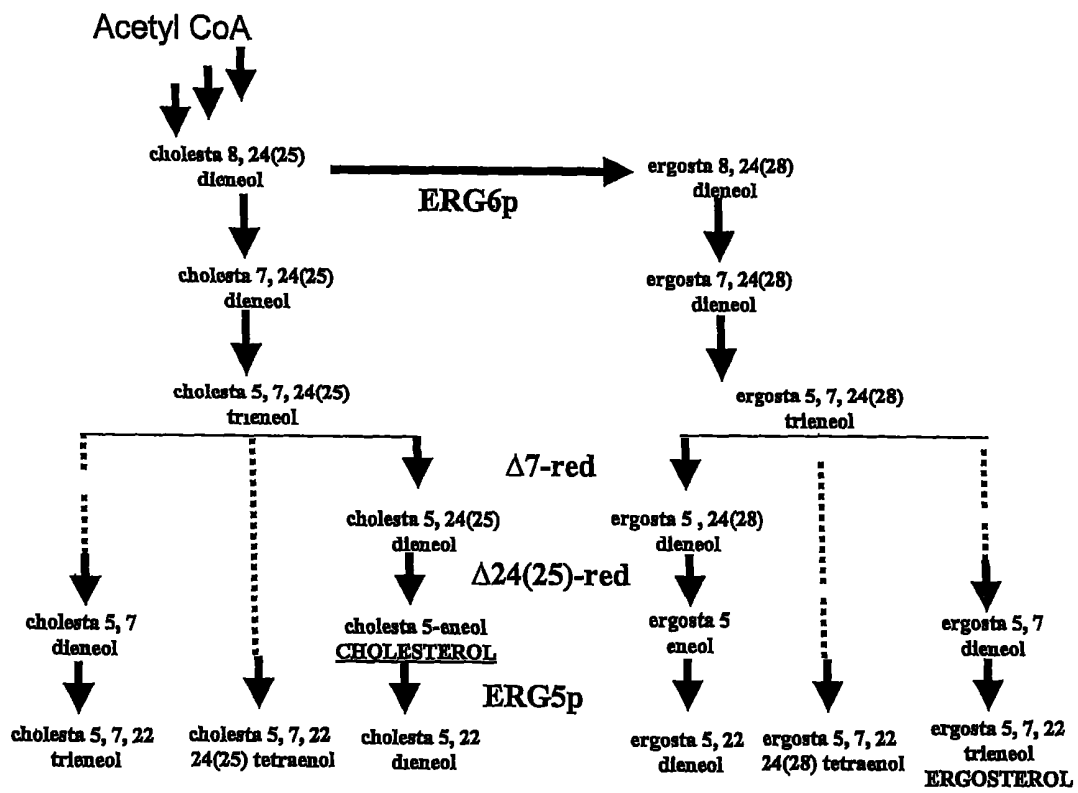


FIG 2

62

WO 2005/121315

2/13

PCT/FR2005/001090

22

6

63

3/13

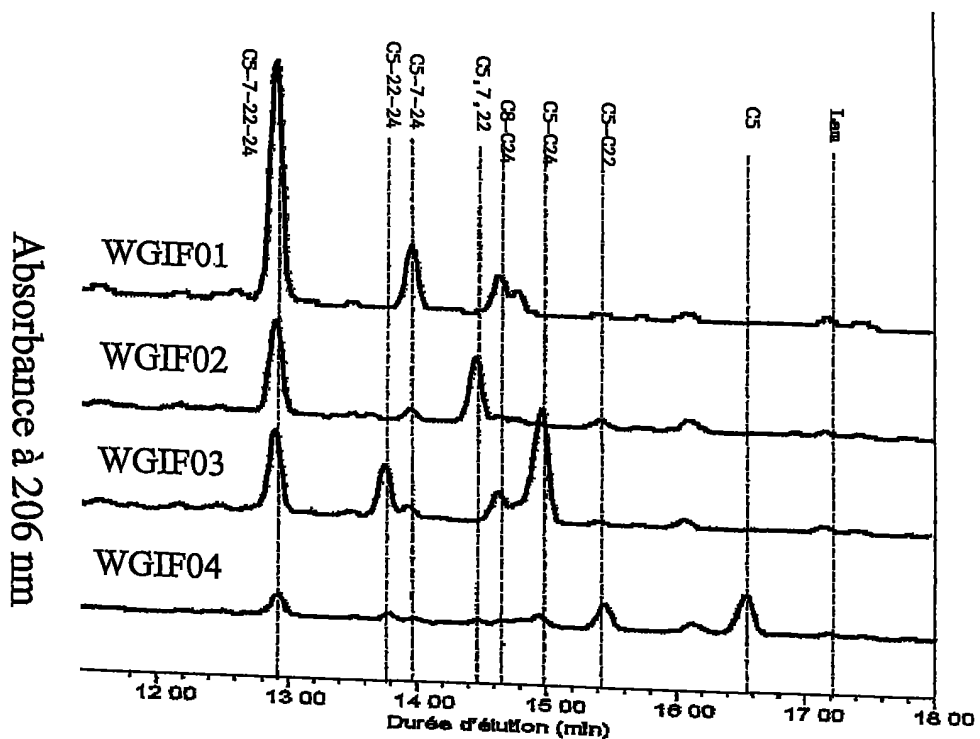


FIG. 3

64

WO 2005/121315

PCT/FR2005/001090

64

4/13

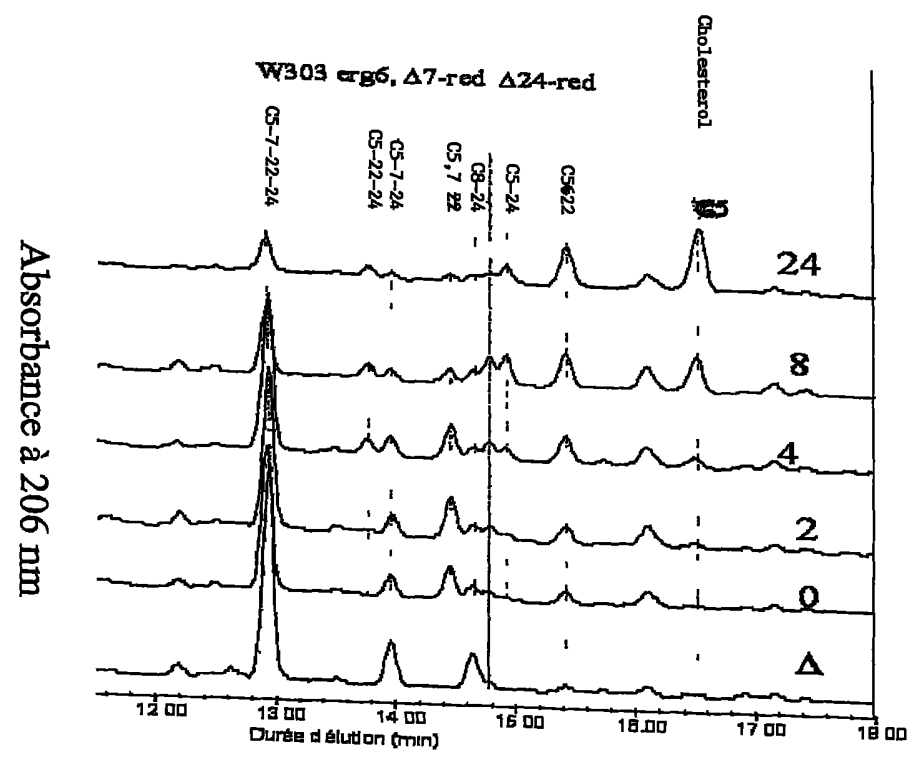


FIG. 4

65.

5/13

65

FIG 5A

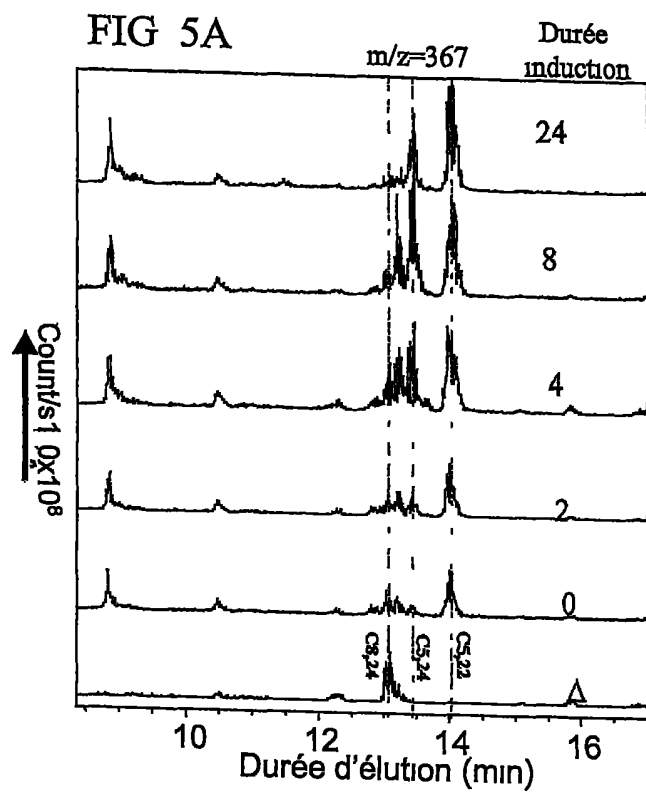
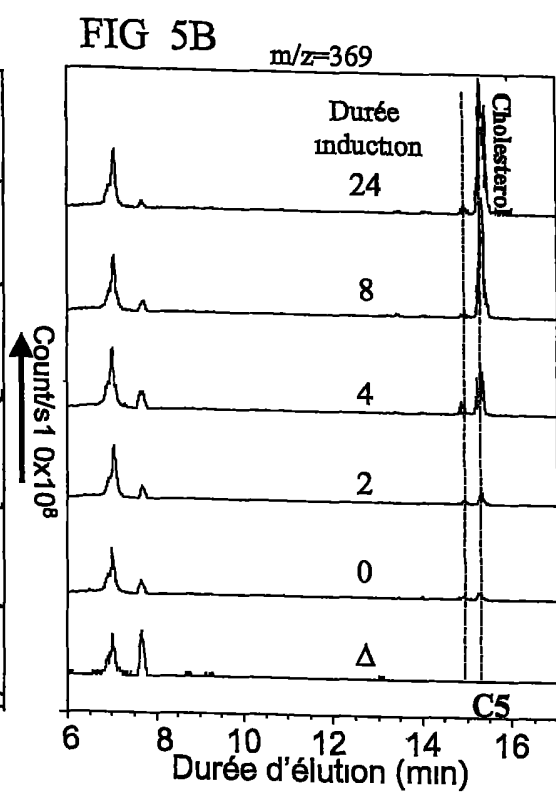


FIG 5B



66

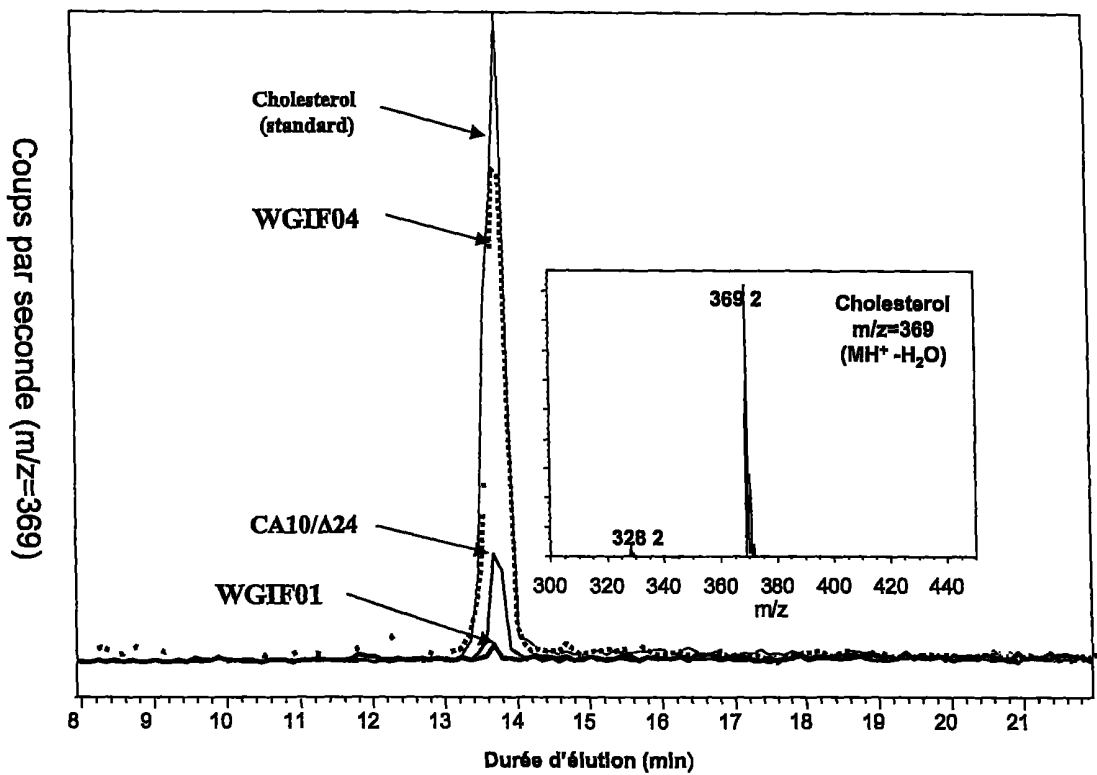


FIG 6

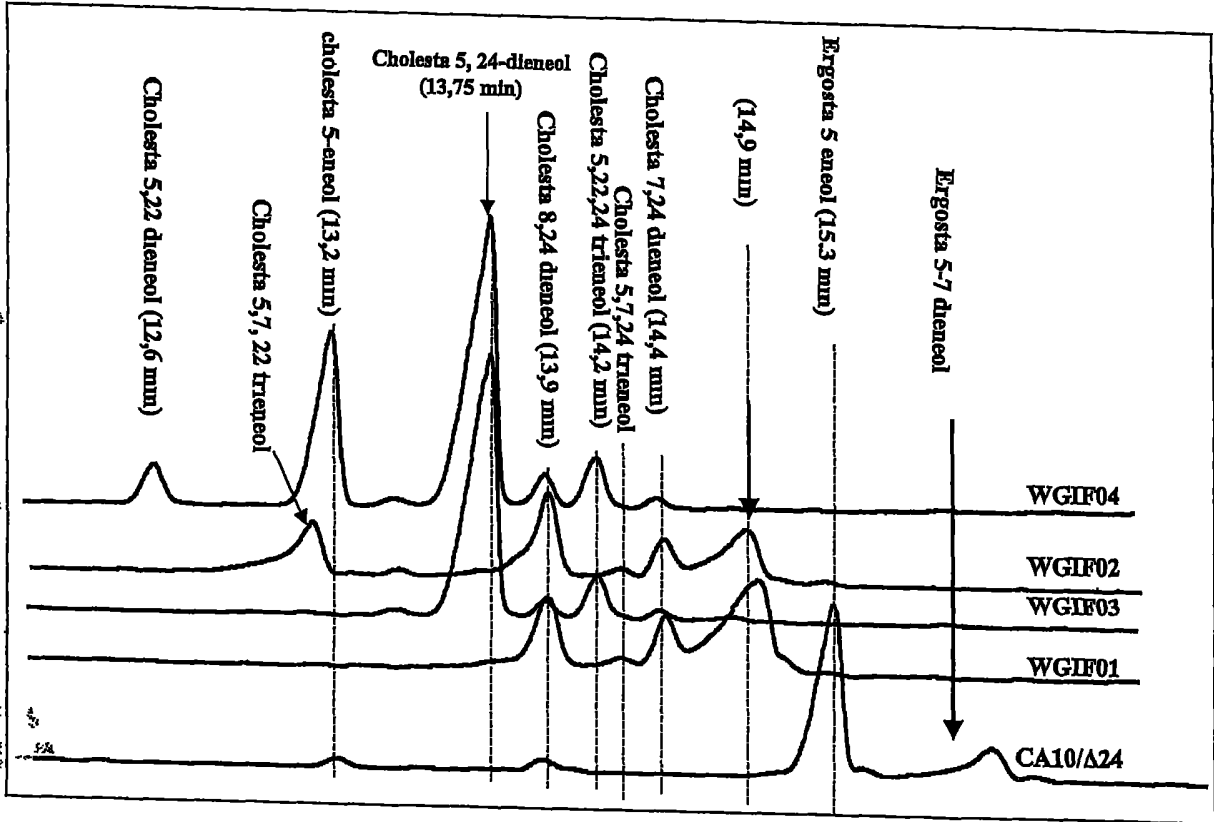
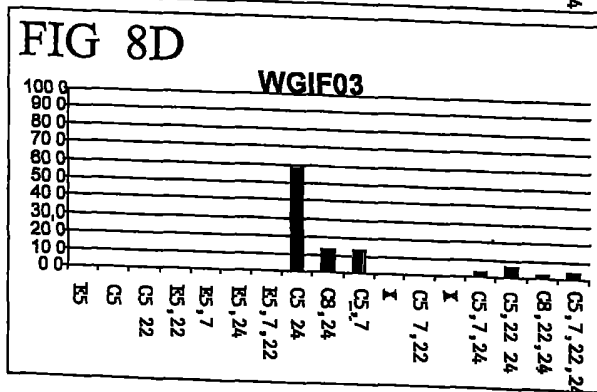
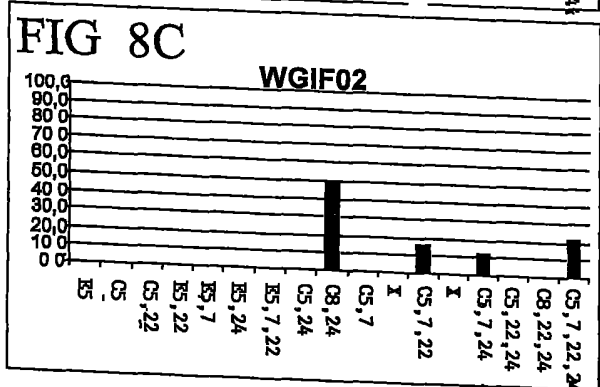
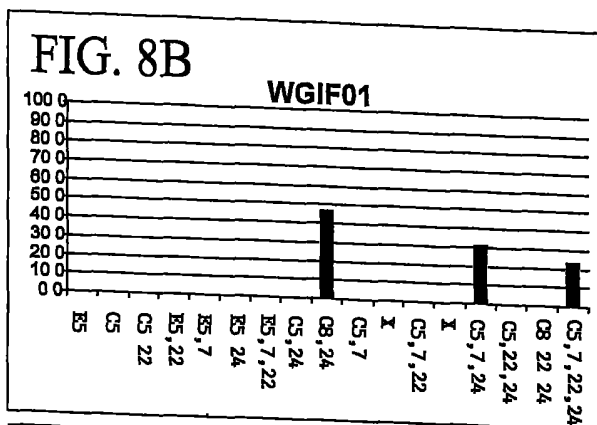
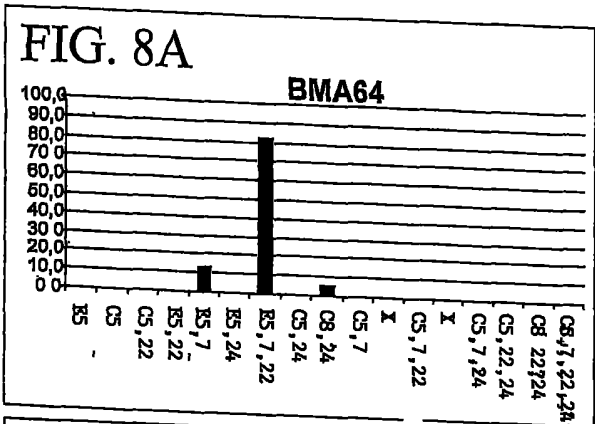
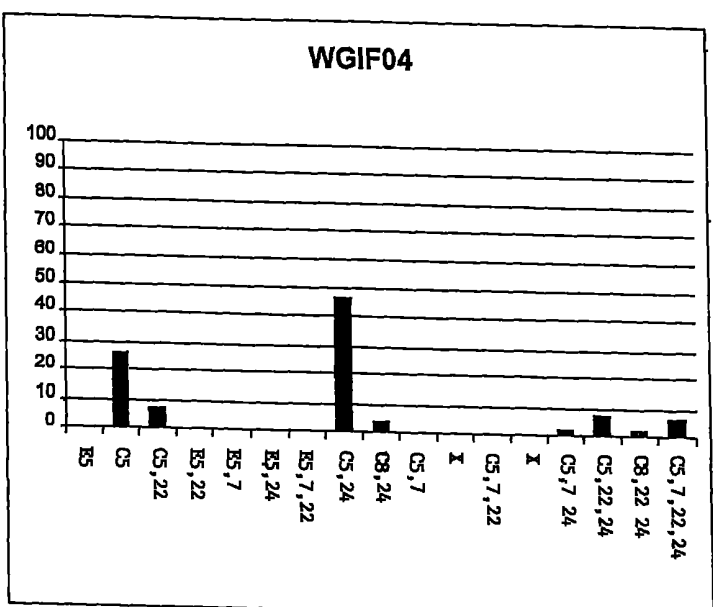


FIG 7

98



9/13



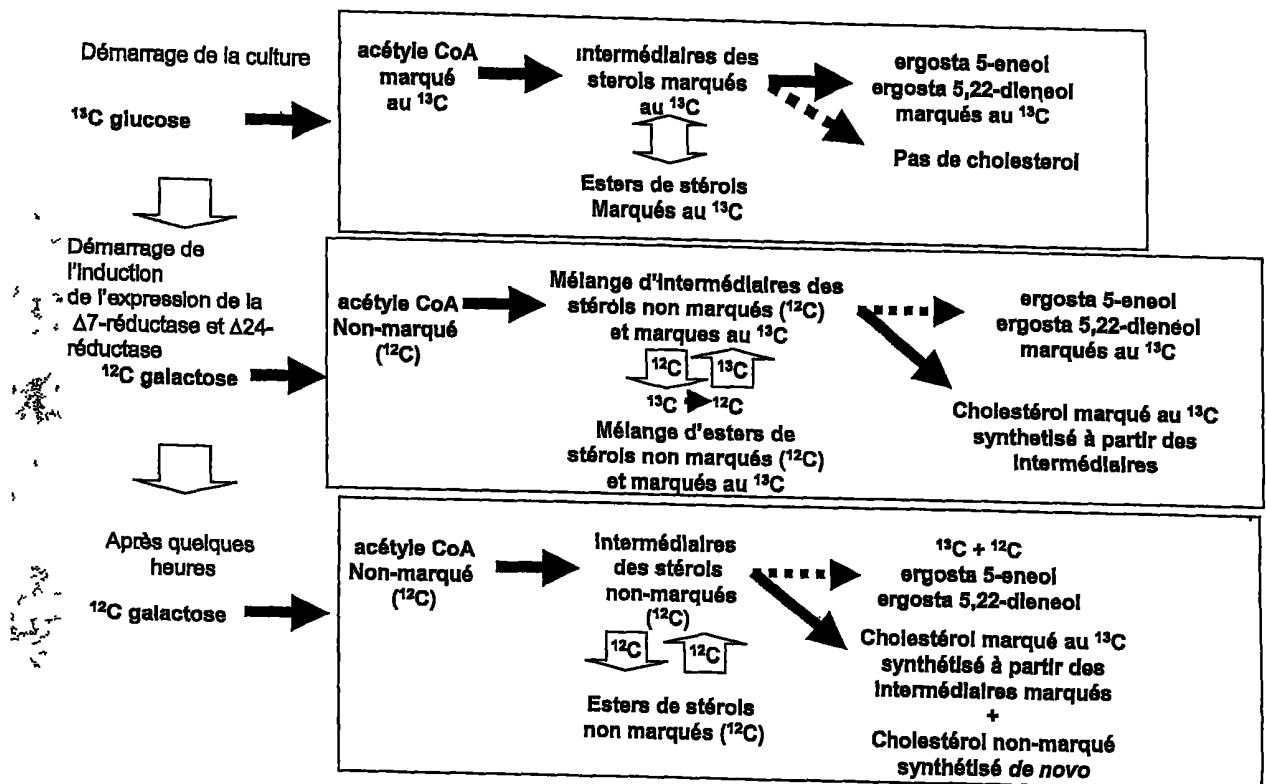


FIG 10

7

11/13

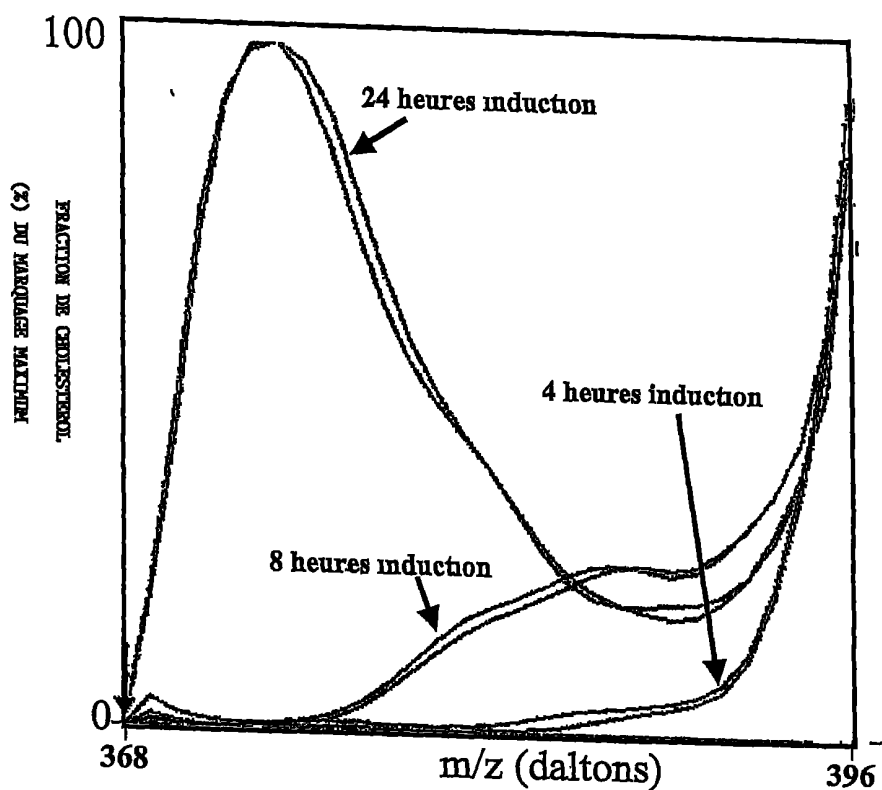


FIG. 11

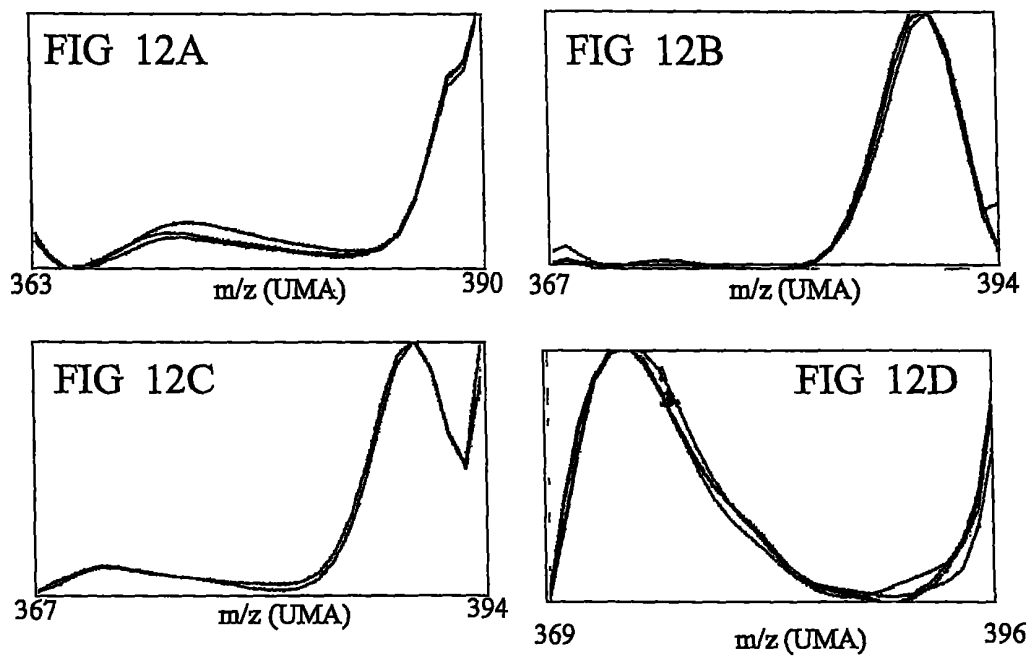


FIG 12

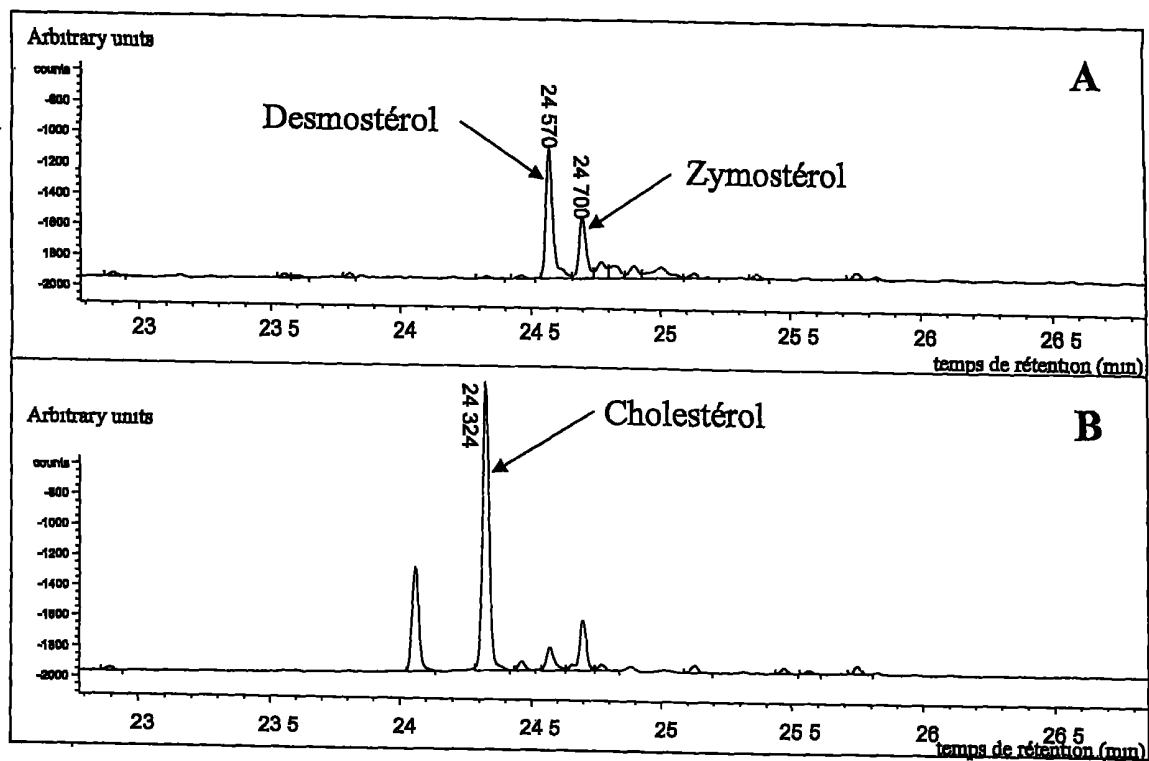


FIG. 13

PRJ02025.ST25PCT.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Aventis Pharma S.A.

<120> SOUCHES DE LEVURE PRODUISANT DU CHOLESTEROL ET LEURS APPLICATIONS

<130> PRJ02025

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 1

cctagcgacg aaaagcatca ttggagtgaa taacttggac ttaccattct tagcattttg 60
acg 63

<210> 2

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 2

gcataagagt gaaacagaat tgagaaaaag acaggcccaa ttcaaattcg ggtcgaaaaa 60
agaaaagg 68

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 3

agggccgaac aaagccccga tcttc

25

25
25

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 4

ggcaaacgga ggaactcttg g

21

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 5

tatatagcgg ccgctttcgc tgattaatta ccccag

36

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 6

tatatagcgg ccgcgagaag tgacgcaagc atca

34

<210> 7

<211> 270

<212> DNA

<213> 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 ggctaataaaa 240

tggaacctgc cgtgtcgctg gccgtgtgcg 270

76

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN
MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de publicación Internacional
22 Diciembre 2005 (22.12.2005)

PCT

(10) Número de publicación Internacional
WO 2005/121315 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 1/18
- (21) Número de solicitud Internacional: PCT/FR2005/001090
- (22) Fecha de presentación Internacional: 2 Mayo 2005 (02.05.2005)
- (25) Idioma de la presentación: Français
- (26) Idioma de la publicación: Français
- (30) Datos de prioridad: 0404880 6 Mayo 2004 (06.05.2004) FR
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto EE.UU.): AVENTIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20 Avenue Raymond Aron, F-92180 ANTONY (FR).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (solamente para EE.UU.): POMPON, Denis [FR/FR]; 9 place du Marché Neuf, F-91190 GIF SUR YVETTE (FR). DUMAS, Bruno [FR/FR]; 15 rue de Versailles, F-91300 MASSY (FR). SPAGNOLI, Roberto [IT/FR]; 39 rue des Vignes, F-75016 PARIS (FR).
- (74) Agente: BOUVET, Philippe; AVENTIS PHARMA S.A., Direction Brevets, 20 Avenue Raymond Aron, F-92185 ANTONY CEDEX (FR).

- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG, BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- Publicada:
- Con informe de búsqueda internacional.
 - Antes de expirar el plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, se volverá a publicar si se reciben las modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, se hace referencia a "Notas de Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada Índice regular del Boletín PCT.

WO 2005/121315 A1

(54) Título: CEPAS DE LEVADURA QUE PRODUCEN COLESTEROL Y SUS APLICACIONES

(57) Resumen: La presente invención se refiere a la producción de colesterol en organismos del reino de los hongos. Más particularmente, la invención se refiere a hongos genéticamente modificados que producen de forma autónoma colesterol a partir de una fuente de carbono sencilla. La invención se refiere igualmente a la utilización de hongos según la invención para la producción de colesterol no marcado y marcado.

CEPAS DE LEVADURA QUE PRODUCEN COLESTEROL Y SUS APLICACIONES

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

El colesterol (cf. figura 1) es el esteroide animal más importante. Es un
5 componente fundamental de las membranas celulares, de las que controla 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
10 como el cultivos celulares.

El colesterol se utiliza también en la síntesis industrial de la vitamina D₃. 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
15 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 encefalopatía espongiforme bovina (BSE por sus iniciales en inglés: Bovine Spongiform Encephalopathy)) han recordado la necesidad de prudencia durante la utilización de
20 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.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar una fuente de
30 colesterol abundante y segura desde el punto de vista sanitario. Los inventores han mostrado de forma sorprendente que es posible desviar la producción natural de ergosterol en *Fungi* para producir colesterol.

Descripción general de la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere a un organismo del reino de los
35 hongos que produce colesterol de forma autónoma.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un organismo del reino de los *Fungi* tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque este último está genéticamente modificado.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un organismo del reino de los *Fungi* tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque este último produce colesterol a partir de una fuente de carbono sencilla.

La invención se refiere igualmente a un organismo del reino de los hongos tal como se ha definido anteriormente que expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa. Más especialmente, la invención se refiere a un organismo tal como se ha definido anteriormente en el que la se ha desactivado enzimaesterol 24-C-metiltransferasa y/o se ha desactivado la enzima C-22-esterol desaturasa.

Otro aspecto de la invención se refiere a un organismo del reino de los hongos tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque se obtiene la expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa por transformación del organismo.

La invención se refiere igualmente a un organismo del reino de los hongos tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la desactivación de la enzimaesterol 24-C-metiltransferasa se realiza por desactivación génica y/o la desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa se realiza por desactivación génica.

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

La invención se refiere igualmente a 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.

5 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.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de un organismo del reino de los hongos tal como se ha definido anteriormente o de uno de sus intermedios metabólicos o de una mezcla de esteroides marcada con ^{13}C o con ^{14}C .

La invención se refiere igualmente a un procedimiento de producción de colesterol o de uno de sus intermedios metabólicos o de una mezcla de esteroides marcada con ^{13}C o con ^{14}C que comprende las etapas siguientes:

- 15
- 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 uno de sus intermedios metabólicos o de la mezcla de esteroides.

20 La invención se refiere igualmente a 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
25 obtener un perfil isotópico definido. La invención se refiere igualmente a una muestra de moléculas de colesterol, de intermedios o de metabolitos del colesterol marcados en diferentes posiciones mediante marcadores isotópicos que presentan un perfil isotópico definido y susceptible de obtenerse por este procedimiento de fabricación.

30 La invención se refiere igualmente a una composición que contiene, como marcador de trazabilidad, una mezcla isotópica de colesterol, de intermedios o de metabolitos del colesterol marcados en diferentes posiciones mediante marcadores isotópicos y que presenta un perfil isotópico definido. Más especialmente, esta composición está destinada al campo de la alimentación o de la terapia humana o animal.

Descripción detallada de la invención

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

La presente invención permite realizar la síntesis del colesterol, por la multiplicación de *Fungi*, en presencia de una fuente de carbono sencilla. El método propuesto por la presente invención 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 invención, se entienden las fuentes de carbono utilizables por el experto para el crecimiento normal de un hongo y principalmente de una levadura. Se entiende denominar 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 preferida muy especialmente 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 invención contenga todos los genes necesarios para la terminación de la vía metabólica de producción del colesterol.

La invención se refiere principalmente a un organismo del reino de los hongos (un hongo) genéticamente modificado que produce de forma autónoma colesterol a partir de una fuente de carbono sencilla.

Se pueden realizar una serie de modificaciones genéticas del hongo con el fin de desviar la vía metabólica natural de producción del ergosterol hacia la producción de colesterol. La presente invención se refiere así a un organismo del reino de los hongos genéticamente modificado que expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesteroide Δ 24-reductasa. La cepa del organismo del reino de los hongos así modificado produce colesterol. En efecto, la solicitante ha podido realizar un modelo, gracias a los resultados obtenidos, (cf. la parte de los ejemplos de la presente solicitud), la vía metabólica que conduce al ergosterol y a algunos de sus

derivados (cf. figura 2). La expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa en el hongo *S. cerevisiae* puede permitir la producción de colesterol, desviando una parte de la biosíntesis del ergosterol.

La enzima 7-deshidrocolesterol reductasa tiene el número EC: 1.3.1.21 en la
 5 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 Δ 7-reductasa en la parte siguiente de este documento. Esta enzima
 cataliza en estado natural, en plantas por ejemplo, la reducción NADPH dependiente
 10 del delta 5, 7-colestadienol en delta 5 colestanol 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
 15 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 y la secuencia proteica de número
 20 GenBank: AAC05086) (Moebius et al., 1996). Del gen homólogo en la rata *Rattus*
norvegicus (cuya secuencia de nucleótidos es accesible con el número GenBank:
 AB016800 y 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
 25 cebra *Danio rerio* con la referencia Genbank BQ132684. 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 delta-7-
 esterol reductasa puede encontrarse igualmente en la protista *Mastigamoeba*
 30 *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
 35 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 lipolytica*, *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 3 β -hidroxiestero Δ 24-reductasa, igualmente denominada DHCR24 o 24-deshidrocolesterol reductasa, cataliza en estado natural la reducción del desmosterol (colest-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-lanosterol, el cimosterol o el colest-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) estero Δ 24-reductasa, delta-24-estero reductasa o Δ 24-reductasa en la parte restante este documento.

El gen que codifica para la enzima 3 β -hidroxiestero Δ 24-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 *Oryza sativa* con la referencia Genbank AAP53615 y el guisante *Pisum sativum* con la referencia Genbank AAK15493.

El experto podrá aislar fácilmente otros genes homólogos que codifican para la enzima 3 β -hidroxicoolesterol Δ 24-reductasa en otros organismos. Se podrá referir principalmente al método de clonación descrito en la publicación Waterham H. R. *et al.*, 2001. El experto podrá igualmente determinar fácilmente la actividad de la 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa de las proteínas correspondientes principalmente utilizando el ensayo de actividad igualmente descrito en la publicación, (Waterham *et al.*, 2001).

La expresión de la enzima 3 β -hidroxicoolesterol Δ 24-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 los medios descritos anteriormente en lo que se refiere a la expresión de la enzima 7-deshidrocolesterol reductasa.

Preferentemente, la enzima 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa expresada es la enzima humana. Un ejemplo de aisalmiento 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.*, 2001. 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 invención expresan las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-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*). Igualmente se

denomina ERG6p, Delta(24)-metiltransferasa, Delta(24)-esterol metiltransferasa, cimosterol-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 fitoesterol metiltransferasa. Esta
5 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 enzimaesterol 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
10 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 otro 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
15 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:
20 AAC26826) (Jensen-Pergakes et al., 1998). Se han descrito igualmente genes que codifican para una enzima homóloga a la ERG6 en la *Candida lusitanae* con la referencia Genbank AA021936.1 e igualmente en la *Pneumocystis carinii* (Kaneshiro et al., 2002) o en la *Kluyveromyces lactis* (Ozier-Kalogeropoulos et al., 1998).

El experto podrá aislar fácilmente otros genes homólogos del gen *Erg6* en los
25 organismos del reino de los hongos. El experto podrá igualmente determinar fácilmente la actividad de laesterol 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 esteroides ramificados en la
30 posición 24, en particular esteroides de tipo ergosta- que contienen un grupo metileno en posición 24-28. La presencia de una actividad biológicaesterol 24-C-metiltransferasa de tipo ERG6 se determinará igualmente *in vitro* mediante las técnicas desarrolladas por (McCammon et al., 1984) o por Taylor y Parks (Taylor y Parks, 1978). Por otra parte, los esteroides producto y sustrato de la enzima ERG6 se
35 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 del organismo del reino de los hongos según la presente invención que expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa y que presenta además una desactivación de la enzima estero 24-C-metiltransferasa produce colesterol. La solicitante ha podido determinar en efecto que, de forma sorprendente, la desactivación de la enzima estero 24-C-metiltransferasa bloquea la vía de biosíntesis anterior del ergosterol y permite una producción aumentada de colesterol por la cepa del hongo (cf. la parte experimental de la presente solicitud).

La expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa se realiza como se describe a continuación.

La desactivación de la enzima estero 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 delección 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 RNAi (*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, delección 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 pp. 290-315).

Ventajosamente, los organismos del reino de los hongos según la presente invención expresan las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-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 yesterol delta22-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 (cf. figure 2).

El gen que codifica para la 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 and 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 lusitanae* 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 a nivel del gen *erg5*. Este enriquecimiento se evidenciará por la presencia en la cepa enriquecida en 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 (1.997) después de la lisis de las levaduras, (Kelly et al., 1997).

La cepa del organismo del reino de los hongos según la presente invención
5 que expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-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 colest-5,22-dienol y permite una estabilización de la
10 producción de colesterol (cf. la parte experimental de la presente solicitud). Este bloqueo interviene también a nivel de la conversión del colest-5,7-dienol, un precursor del colesterol en colest-5,7,22-trienol, un precursor del colest-5,22-dienol. De forma sorprendente, la enzima C-22-esterol desaturasa acepta, en efecto, como sustrato el colesterol que ella convierte en colest-5,22-dienol. Esta reacción parásita
15 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 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa se realiza como se describe a continuación. La desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa se puede realizar por cualquier
20 medio conocido por el experto. Se puede tratar en particular de los métodos descritos anteriormente que se refieren a la desactivación de la enzimaesterol 24-C-metiltransferasa.

Ventajosamente, los organismos del reino de los hongos según la presente invención expresan las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa y presentan además una desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa y una desactivación de la enzimaesterol 24-C-metiltransferasa. Estas
25 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 3 β -hidroxiesterol Δ 24-reductasa y la desactivación de las enzimas C-22-esterol desaturasa yesterol 24-C-metiltransferasa se realizan como se ha descrito
30 anteriormente.

En un modo de realización, el colesterol está presente en la cepa del organismo según la presente invención en una proporción superior a 20%,
35 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).

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

La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento de producción de colesterol de origen no animal que comprende las etapas siguientes:

- cultivar un organismo del reino de los hongos tal como se ha descrito anteriormente, y
- 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 amoníaco, sosa, 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 esteroides ha sido descrito por L. Parks et al. (1985) (Methods in Enzymology 111 Editado por L. Rilling, L. Parks, C. Bottema, R. Rodríguez y Thomas Lewis pp. 333-339).

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. 2001 Mayo 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.

5 Otro aspecto de la invención 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 esteroides marcada. Se entiende por intermedio metabólico del colesterol principalmente los esteroides especificados en la figura 2. Se puede tratar principalmente de colest-8,24(25)-dienol, colest-7,24(25)-dienol,
10 colest-5, 7,24(25)-trienol, colest-5,24(25)-dienol y colest-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 del 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
15 carbono y sigue la síntesis *de novo* de intermedios metabólicos y luego de esteroles, 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:

- 20 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
25 antifúngicos citotóxicos o citoestáticos), el colesterol marcado o uno de sus intermedios metabólicos, o una mezcla de esteroides 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 esteroides marcados tiene varias propiedades únicas:

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

2) Se puede combinar, a saber, que varias firmas isotópicas correspondientes a varios esteroides únicos marcados por perfiles isotópicos ellos mismos modulables,
35 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 esteroides. 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 esteroides 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 esteroides y de colesterol radiactivo por ^{14}C . El procedimiento se puede así incorporar a cepas de levaduras que producen esteroides y principalmente hidrocortisona (cf. la solicitud de patente WO 02/061.109) para producir esteroides marcados con ^{13}C o con ^{14}C , por ejemplo para ensayos RIA.

Legendas 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 esteroides de tipo ergosta- y colest- 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 esteroides libres de las cepas derivadas de la cepa BMA64 e identificación de estos esteroides. Las cepas estudiadas son las siguientes: WGIF01 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* (cf. ejemplo 1), WGIF02 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la $\Delta 24$ -reductasa, ejemplo 12), WGIF03 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la $\Delta 7$ -reductasa, ejemplo 13), WGIF04 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la $\Delta 7$ -reductasa y la $\Delta 24$ -reductasa, ejemplo 14). C5: colest-5-enol (colesterol); C5,22: colest-5,22-dienol; C5, 24: colest-5,24-dienol (desmosterol); C8,24: colest-8,24-dienol (cimosterol); C5,7,22: colest-5,7,22-trienol; C5,7,24: colest-5,7,24-trienol; C5, 22, 24: colest-5,22,24-trienol; C5,7,22,24: colest-5,7,22,24-tetraenol; lan:lanosterol.

Figura 4: Perfil comparativo por HPLC con detección UV a 206 nm de los esteroides libres de la cepa WGIF04 (cepa BMA64 con ruptura en el gen *erg6* y que expresa la $\Delta 7$ -reductasa y la $\Delta 24$ -reductasa, ejemplo 14) después de 0, 2, 4, 8 y 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 *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 esteroide a otro. C5: colest-5-enol (colesterol); C5,22: colest-5,22-dienol; C5,24: colest-5,24-dienol (desmosterol); C8,24: colest-8,24-dienol (cimosterol); C5,7,22: colest-5,7,22-trienol; C5,7,24: colest-5,7,24-trienol; C5, 22,24: colest-5,22,24-trienol; C5,7,22,24: colest-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 esteroides libres de la cepa WGIF04 (ejemplo 14) después de 0, 2, 4, 8 y 24 horas de inducción con galactosa. Δ : cepa WGIF01. C5: colest-5-enol (colesterol); C5,22: colest-5,22-dienol; C5,24: colest-5,24-dienol (desmosterol); C8,24: colest-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 esteroides 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 esteroides totales (libres y ésterificados) por cromatografía en fase gaseosa de las cepas WGIF01 (deleción del *erg6*), WGIF02 (deleción del *erg6* con expresión de la $\Delta 24$ -reductasa), WGIF03 (deleción del *erg6* con expresión de la $\Delta 7$ -reductasa), WGIF04 (deleción del *erg6* con expresión de la $\Delta 24$ -reductasa y de la $\Delta 7$ -reductasa) y CA10 pYES_Delta24 (fondo genético FY1679, deleción del *erg5* con expresión de la $\Delta 24$ -reductasa, $\Delta 7$ -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 esteroides se realiza según los criterios descritos en la presente invención.

Figura 8: Reparto cuantitativo de los principales esteroides libres en las cepas de levadura [BMA84 (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 esteroides 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 (cf. 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 esteroide 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 esteroide. 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 esteroides a partir de las señales de absorción respectivas por HPLC.

Figura 9: Reparto cuantitativo de los principales esteroides libres en la capa 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 esteroides 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 esteroides 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 multilínea 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 multilínea 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 esteroides o de diferentes tiempos de inducción. Mismo cálculo y representación que para la figura 11, pero para diferentes esteroides 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,

5 FIG. 12 C: RT = 12,25 - 12,35,

FIG. 12D: 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
10 esteroi totalmente constituido por carbono 12.

Figura 13: Perfiles comparados de los esteroides totales (libres y ésterificados) 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) (cf. ejemplo 18). Las escalas de respuesta son arbitrarias. La escala de tiempos de retención es la misma para las dos
15 cepas (los tiempos de retención se expresan en minutos). La identificación de los esteroides 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 se describen en Ausubel *et al.* y
20 algunas manipulaciones de las levaduras se describen en Adams *et al* (Adams y Holm, 1996).

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

Se ha obtenido la cepa de levadura *S. cerevisiae* WGIF01 cuyo gen *ERG6*
25 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*
30 por delección 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*, el gen *TRP1* del plásmido pFL44 (Bonneaud *et al.*, 1991) se ha amplificado utilizando la Z-TaqI (una DNA polimerasa DNA dependiente) suministrada por la sociedad Takara (PanVera LLC 501 Charmany Drive Madison, WI

53719 USA). El par cebador utilizado permite la amplificación por la DNA polimerasa del gen *TRP1* limitado por secuencias correspondientes al gen *ERG6*.

La secuencia de estos cebadores es la siguiente:

OERG6trp1: 5'
 5 (CCTAGCGACGAAAAGCATCATTGGAGTGAATAACTTGGACTTACCAAttctta
 gcattttgacg) 3' (SEQ ID N° 1).
 OERG6trp2: 5' 5'
 (GCATAAGAGTGAAACAGAATTGAGAAAAAGACAGGCCCAATTCAaattcgg
 gtcgaaaaaagaaaagg) 3' (SEQ ID N° 2).

10 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 se describe en (Gietz et al., 1995).

Después de la transformación, las levaduras tratadas se extienden sobre un
 15 medio mínimo que no contiene triptófano, (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 esteroides totales que producen.

20 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 esteroides.

25 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).

30 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 esteroides 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 esteroides 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: *MAT α* , *rhq GAL2*, *ura3-52*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *erg5::HYGRO^R*, *ade2::GAL10/CYC1:: Δ 7Reductasa::PGK1*, *LEU2::GAL10/CYC1::matADR::PGK1*), **CA14** (de genotipo: *MAT α* , *rhq GAL2*, *ura3-52*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *erg5::HYGRO^R*, *atf2::G418^R*, *ade2::GAL10/CYC1:: Δ 7Reductasa::PGK1*, *LEU2::GAL10/CYC1::matADR::PGK1*) y **CA23** (de genotipo: *MAT α* , *rhq GAL2*, *ura3-52*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *erg5::HYGRO^R*, *are1::G418^R*, *are2::HIS3*, *ade2::GAL10/CYC1:: Δ 7Reductasa::PGK1*, *LEU2::GAL10/CYC1::matADR::PGK1*), así como sus construcciones se describen en la referencia de Duport et al. cuyo contenido técnico en lo que se refiere a la construcción de estas cepas se incorpora como referencia en la presente solicitud.

Estas cepas producen o contienen en sus membranas esteroides 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 cDNA que codifica para la Δ 7-reductasa de planta (la solicitud de patente europea EP0727489 describe principalmente la clonación de la Δ 7-reductasa de la planta *Arabidopsis thaliana*, que se incorpora como referencia en la presente solicitud, 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 delección 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 $\Delta 24$ -25-reductasa de origen humano (plásmido pYES_Delta24)

5 La construcción de este plásmido ha sido descrita por Waterham *et al.* 2.001. La construcción ha consistido en poner el cDNA 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, France). Este plásmido es un plásmido lanzadera *E. coli*/*S. cerevisiae* y contiene un origen de replicación de 2 micrones y un
10 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 $\Delta 7$ -reductasa de *A. thaliana*.

15 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 (cf. el ejemplo 9.b de dicha solicitud, que se incorpora en la presente solicitud como referencia) es un plásmido lanzadera *E. coli*/*S. cerevisiae*
20 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 *NotI* que permite clonar las casetes de expresión, tal como se ha descrito en la solicitud PCT anterior.

25 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, este 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 esteroles mayoritarios (Duport *et al.*, 1.998). El fragmento de ADN genómico de la cepa CA10 que contiene el gen de la
30 delta7-reductasa se amplifica mediante los cebadores siguientes:

OSA72 5' (TATATAGCGGCCGCTTTTCGCTGATTAATTACCCCAG) 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 se ha
35 descrito en 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 DNA 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
 5 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 a 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 enzima *NotI*, se purifica sobre gel de agarosa y luego se clona de forma clásica al nivel del sitio único *NotI* del
 10 plásmido pAM1. El plásmido así obtenido se ha denominado pAG1.

Se trata de un vector monocopia que permite la expresión de la Delta-7-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 esteroides libres y esterificados en la levadura para los análisis:
 15

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

a) Condiciones de extracción de los esteroides libres:

El residuo celular se lava dos veces con 500 µL de agua desionizada y se
 20 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,
 25 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 esteroideo se pone en suspensión en 100 µL de acetonitrilo para su análisis por cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC) (Szczepara et al.,
 30 2003) o en 100 µL de hexano para los análisis por cromatografía en fase gaseosa (GC) (Duport et al., 2003).

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

El residuo celular se vuelve a poner en suspensión en 500 μ L 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 60°C en tubos cerrados. Después de incubación y una vez que los tubos han vuelto a temperatura ambiente, la
5 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 vuelve a poner en suspensión en 100 μ L de acetonitrilo al 100% para su análisis por cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC) (Szczepara et al., 2003) o en 100 μ L de hexano para los análisis por cromatografía en fase gaseosa (GC) (Duport et al., 2003).

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

15 Las cepas se cultivan en un medio rico (10 g de bactopectona por litro y 10 g de extractos de levadura por litro) con 2% de glucosa como fuente de carbono con el fin obtener 500 mg 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 90°C. Después de volver a temperatura ambiente, los
20 esteroides 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 esteroides extraídos se recogen en 100 μ L 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 μ L de
25 metanol para los estudios por cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC).

EJEMPLO 6: Análisis de los esteroides 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)

30 Se prepara el extracto esterólico (libre o total) en suspensión en hexano según el procedimiento 1 [cf. ejemplo 5 1) a) y b)]. Se añade un testigo de inyección a la mezcla de esteroles, en general colesterol a una concentración de 10 a 50 ng/ μ L.

A continuación se inyecta a 1 a 3 μ L de las muestras en un aparato de cromatografía en fase gaseosa en las siguientes condiciones. Se inyectan 1 a 3 μ L en
35 una columna Alltech de tipo SE30 (Referencia de la columna: 30m X 0,32 mm ID X

0,25 μ m). 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/cm². El inyector se regula a 280°C. La temperatura inicial de la columna es de 130°C durante 0,5 minutos. Sube a 230°C 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 130°C antes de la inyección y luego se sube a 230°C 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 ion 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 esteroides 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 delección del gen *ERG6* en la cepa WGIF01 y principalmente la ausencia de ergosta-8,24(28)-dienol y la presencia de esteroide del tipo colestano- que tiene el doble enlace en 24(25).

EJEMPLO 7: Análisis de los esteroides libres y esterificados en la levadura por cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC) con detección UV o detección por espectrometría 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 (cf. ejemplo 5)] en una columna de tipo X terra RP18, 4,6 X 100 mm (Waters, Milford, MA01757 USA).

5 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 60°C 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
10 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 realiza un gradiente lineal a partir de una disolución que contiene 50% de tampón A y 50% de tampón B. Al
15 cabo de 10 minutos, la composición del tampón de elución es de 25% de tampón A y 75% de tampón B. Se aplica entonces un nuevo gradiente lineal de forma que a los 30 minutos el gradiente alcanza el valor de 100% de 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):

20 En el caso del análisis por espectrometría de masas, la muestra se mantiene a 30°C y la columna se mantiene a 60°C 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
25 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).

30 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 esteroides que se van a analizar. El detector se regula de forma que resuelva totalmente sin interferencia de las moléculas que difieran 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.

EJEMPLO 8: Cultivo de las cepas de levaduras para el análisis de su contenido en esteroles 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- $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ [para los experimentos de marcación, (cf. 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 30°C 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 30°C 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 800g durante 10 minutos, el residuo celular se congela y se conserva a -20°C antes de la extracción esterólica por los métodos descritos en el ejemplo 5.

EJEMPL 9: Identificación de los esteroides presentes en las cepas analizadas:

La identificación de los esteroides 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 colest-5,22-dienol y del cymosterol (colesta-8,24-dienol).
- Análisis del espectro de absorción por HPLC y detección UV mediante red de diodos (cf. ejemplo 7-1):
 - Este método permite identificar sin ambigüedad mediante una base espectral, cinco tipos de esteroides: 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 ergosta- o colest- . 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 (cf. 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 (cf ejemplo 7-2) con electropulverización que proporciona, en el caso de los 3-hidroxi-esteroides, 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 esteroides de las diferentes cepas de levaduras de referencia con ruptura en diferentes puntos de la biosíntesis.
 - Análisis de las variaciones de la composición en esteroles 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 esteroides con el isótopo 13 del carbono.

- Análisis del espectro UV de los esteroides 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. El último doble enlace conjugado en 8, 14 se puede identificar por un pico de absorción a 245 nm.

EJEMPLO 10: Identificación de los esteroides 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 esteroides.

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

Las células se recuperan a continuación por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos, el residuo celular se analiza por las técnicas presentadas en el ejemplo 5.

Los diferentes análisis descritos han permitido identificar los esteroides producidos por esta cepa.

Se ha determinado así que esta cepa acumula más de 80% de los esteroides libres en forma de ergosterol (ergosta-5,7,22-trienol) (cf. figura 8). Esta cepa produce otros dos esteroides minoritarios detectables, se trata del ergosta-5,7-dienol (sustrato del producto del gen ERG5) (12%) y el cistosterol (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 esteroides observables). Igualmente son detectables pequeñas cantidades de lanosterol (únicamente al nivel de los análisis de los esteroides totales).

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

La cepa WGIF01 (cf. ejemplo 1) 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 esteroides.

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

Las células se recuperan a continuación por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos, el residuo celular se analiza por las técnicas presentadas en el ejemplo 5.

Los diferentes análisis descritos han permitido identificar los esteroides 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 esteroides libres, la cepa acumula 50% del total de cimosterol (colesta-8,24-dienol), sustrato del producto del gen *ERG6*, y 30 y 20% respectivamente de colesta-5,7,24-trienol y de 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 (cf. 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 esteroil C-metil transferasa) transforma el colesta-8,24(25)-dienol en ergosta-8,24(28)-dienol (cf. 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 esteroil 8,7-isomerasa, la esteroil 5-desaturasa y la esteroil 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 esteroides 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 $\Delta 24$ -reductasa (pYES_Delta24, cf. ejemplo 3). Los clones se han elegido sobre un medio desprovisto de uracilo y la presencia y la expresión del cDNA de la $\Delta 24$ -reductasa se verifican analizando los esteroides de estos transformantes por el procedimiento 1 [cf. ejemplo 5-1]).

Se ha seleccionado un clon denominado WGIF02 ya que poseía un perfil esteróico diferente de la cepa WGIF01, además el esteroil suplementario tenía un tiempo de retención próximo al del colesterol (cf. 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 esteroides.

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

Las células se recuperan a continuación por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos, el residuo celular se analiza por las técnicas presentadas en el ejemplo 5.

Los diferentes análisis descritos han permitido identificar los esteroides producidos por esta cepa.

Los dos perfiles de los extractos esteroides 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 colestano-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 colestano-5,7,22,24(25)-tetraenol. Además, la cantidad de colestano-5,7,24-trienol disminuye con la aparición del colestano-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 colestano-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 colestano-5,7,22-trienol en la cepa WGIF02. Se trata de un resultado inesperado en la medida en que el producto de conversión del colestano-5,7,24 por la Δ^{24} -reductasa es el colestano-5,7, que no está presente en la WGIF02 y por tanto se convierte cuantitativamente en colestano-5,7,22. Esto pone de manifiesto otro resultado inesperado, a saber: que el colestano-5,7 es un sustrato de la Δ^{22} -esterol desaturasa, mientras que el colestano-5,7,24 es, según el perfil esteroide de la cepa WGIF01, un mal sustrato.

EJEMPLO 13: Construcción de la cepa WGIF03 e identificación de los esteroides 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 Δ^7 -reductasa cuyo cDNA 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 Δ^7 -reductasa se ha verificado por la aparición en el perfil esteroide de clones adecuados del colestano-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 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 esteroides.

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

Las células se recuperan a continuación por centrifugación del medio a 600 g durante 10 minutos, el residuo celular se analiza por las técnicas presentadas en el ejemplo 5.

10 Los diferentes análisis descritos han permitido identificar los esteroides 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 esteróico de la cepa, con la desaparición casi total de
15 los colest-5,7,22,24-tetraenol, colest-7,24-dienol y colest-8,24-dienol.

Esta actividad se señala igualmente por la aparición de un pico mayoritario identificado como el descrito anteriormente para el colest-5,24-dienol o desmosterol. Las cantidades de colest-8,24-dienol pasan de 12 a 48%. El colest-5,7,24-trienol detectado pasa de 30 a 3% y el colest-5,7,22,24-tetraenol detectado de 23 a 4%,
20 respectivamente para las cepas WGIF01 y WGIF03. Estas observaciones indican, de forma inesperada, que la esterol delta7-reductasa reduce los colest-5,7-dienoles de forma casi independiente de la naturaleza de las insaturaciones que contiene la cadena lateral de los esteroides. Este resultado se opone al observado con la esterol delta24-reductasa. De forma inesperada, la expresión de la esterol delta7-reductasa
25 lleva igualmente a la acumulación (12%) de una molécula co-migrante con el colest-5,7-dienol. Sin embargo, parece poco probable, aunque no excluido, que esta molécula sea colest-5,7-dienol cuyo nivel teórico debería disminuir y no aumentar en estas condiciones. La aparición de una pequeña cantidad de 5,22,24-trienol (8%) es también interesante. Este último esteroide es el producto esperado de la acción de la
30 esterol 22-desaturasa sobre el colest-5,24-dienol, esteroide mayoritario (60%) en la cepa WGIF03 (resultante de la reducción del colest-5,7,24-trienol por la esterol delta7-reductasa). La pequeña acumulación de colest-5,22,24-trienol indica de forma inesperada que el colest-5,24-dienol no es un buen sustrato para la esterol 22-desaturasa. Gracias a los resultados obtenidos en la cepa WGIF02 (cf ejemplo 12), se
35 puede deducir que la presencia de una insaturación en 24 (colesta-5,24-dienol o

colesta-5,7,24-trienol) hace que los esteroides sean difícilmente metabolizables por la esteroide 22-desaturasa. La acción de la enzima ERG6p transformando los colestasaturados en 24 en ergosta- lleva por lo tanto a transformar los malos sustratos del gen ERG5 (22-desaturasa) en buenos sustratos.

5 EJEMPLO 14: Construcción de la cepa WGIF04 e identificación de los esteroides 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 cepas indistinguibles 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 esteroides.

La densidad óptica del cultivo inicial es de 0,1 a 600 nm. Este cultivo se incuba durante 72 horas a una temperatura de 30°C 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 esteroides producidos por esta cepa.

El colesterol representa 25% de los esteroides libres de la cepa WGIF04 (cf. 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 esteroides 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 por el gen *erg6* pueden producir colesterol, sin embargo éste representa menos de 5% de los esteroides 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 porcentaje de los esteroides totales.

La cepa CA10 se ha transformado por el plásmido pYES_Delta24. Esta cepa produce colesterol, representando este último cierto porcentaje de los esteroides 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 (cf. 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 (cf. 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 $\Delta 24$ -reductasa o a partir del colesta-5,7 vía la $\Delta 7$ -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 $\Delta 24$ -reductasa, mientras que la formación del colesta-5,22-dienol resulta de la reducción del 5,7,22-trienol por la $\Delta 7$ -reductasa. La formación del colesta-5,22-dienol por acción de la $\Delta 22$ -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 colest-5,22-dienol para tiempos largos (24 horas) de la cinética (figura 4 y 5).

EJEMPLO 16: Optimización de la vía de biosíntesis del colesterol, papel de la $\Delta 22$ -desaturasa:

Para tiempos de inducción de la cepa WGIF04 del orden de 24 horas, la acumulación del colest-5,22-dienol representa aproximadamente 50% de la del colesterol a niveles de los esteroides libres (figura 4). La ruptura del gen de la $\Delta 22$ -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 $\Delta 22$ -desaturasa (gen *erg5*) y del gen *erg6* y que expresa la $\Delta 7$ -reductasa y la $\Delta 24$ -reductasa. Se ha realizado una cepa que contiene el subconjunto: ruptura de la $\Delta 22$ -desaturasa, expresión de la $\Delta 7$ -reductasa y expresión de la $\Delta 24$ -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/ $\Delta 24$.

La cepa CA10 que expresa la $\Delta 24$ -esterol reductasa produce una cantidad relativamente pequeña de colesterol (cf. 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 colest-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 colest-. La actividad de la $\Delta 24$ -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/ $\Delta 24$ 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 resultantes de la WGIF04 indican la desaparición del colest-5,24 durante la expresión de la $\Delta 24$ -reductasa (comparando los resultados obtenidos con la WGIF03 y los obtenidos con la 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 $\Delta 7$ -reductasa y la $\Delta 24$ -reductasa, siendo entonces el colesterol el único esteroide terminal.

En conclusión, el mínimo requerido para la producción de colesterol con un umbral superior o igual a 20% de los esteroides totales es la ruptura del gen *erg6* y la expresión de la $\Delta 7$ -reductasa y de la $\Delta 24$ -reductasa. La ruptura complementaria de la $\Delta 22$ -desaturasa permitiría mejorar la productividad en colesterol y eliminar la formación parásita del colest-5,22-dienol como esteroide 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 Kappeli 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 esteroides se extraen y luego se analizan (cf. 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 $\Delta 7$ -reductasa y el de la $\Delta 24$ -reductasa. Simultáneamente hay cambio de marcación isotópica de la fuente de carbono. Sigue la síntesis *de novo* de intermediarios metabólicos y luego de esteroide, incluyendo el colesterol, y que comprende un cambio progresivo de marcación. Este cambio de marcación puede caracterizarse por el perfil de masas de cada esteroide 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 ($\text{Ion M} + \text{H}^+ - \text{H}_2\text{O}$, es decir $\text{M} + 1 - 18 = 385 - 17 = 369$). Los tiempos de retención de los esteroides por HPLC no dependen de la forma detectable del nivel de marcación, el espectro de masas de un pico de HPLC correspondiente a un esteroide «X» único, corresponde a una distribución de masas que es, por lo tanto, la superposición (la suma) de las distribuciones de masa del esteroide «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:

5 1) se puede modular a voluntad actuando sobre las condiciones de cultivo, la cepa utilizada y el esteroide 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 esteroides únicos marcados por perfiles isotópicos ellos mismos modulables, se pueden combinar para formar un «alfabeto molecular»,

10 3) es reproducible y fácil de determinar experimentalmente (cf. figura 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,

15 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.

20 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 esteroides. La incorporación de tales firmas en el seno de productos muy variados constituye por lo tanto un método único de marcación infalsificable,

25 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 :

30 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 esteroides permite la síntesis de esteroides 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 esteroides y

35 de colesterol radiactivo por ^{14}C . El procedimiento se puede así incorporar a cepas de

levaduras que producen esteroides y principalmente hidro cortisona (cf. la solicitud de patente WO 02/061.109) para producir esteroides marcados con ¹³C o con ¹⁴C, 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 2.001 con el número de orden I-2616.

La cepa CDR07 MATa (marcadores pertinentes: *ade2::GAL10/CYC1_p::Δ⁷*; *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 esteroides 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 cDNA de la Δ⁷-reductasa 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 esteroides 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 Δ⁷-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 cDNA 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 (cf. ejemplo 3).

La secuencia que corresponde al NH₂ terminal de la DHCR24 reductasa en fusión con el promotor *CYC1* se ha modificado como sigue:

tagcgtggatggccaggcaactttagtgctgacacatacaggcatatatatatgtgtgacgacacatgatcatatggc
atgcatgtgctctgtatgtatataaaactctgttttcttttctctaaatattcttcttatacattaggtccttttagcataaatt
actatacttctatagacacgcaaacacaaaggaattgacaagttgtacaaaaaagcaggctaaaaaATGGAAC
CTGCCGTGTCGCTGGCCGTGTGCG (SEQ ID N° 7).

5 En minúsculas se encuentra la secuencia de nucleótidos parcial del promotor
CYC1 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 modificada (secuencia GAA-CCT después del codón iniciador ATG).

10 El plásmido final que contiene el cDNA 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
cDNA de la DHCR24 se ha denominado pIM303.

15 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).

20 Estas cepas se cultivan en un medio rico reconstituido del tipo Kappeli
durante 72 horas a 28°C 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 cDNA de la DHCR24) y de la cepa YIM59/pIM331
(que contiene el cDNA de la DHCR24) en presencia de potasa metanólica (cf.
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.

25 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 cDNA
de la DHCR24 (cepa YIM59/pIM331) produce un esteroide 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
30 electrónico (como se ha descrito en el ejemplo 6) que este esteroide es el colesterol.
Utilizando las áreas de cada uno de los picos de esteroide, se ha podido calcular en 57%
de los esteroides la cantidad producida por la cepa YIM59/pIM331.

Depósito de material biológico

Los organismos siguientes se han depositado el 22 de abril de 2.004 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.

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

Todas las publicaciones y patentes citadas se incorporan a la presente solicitud de patente por referencia.

Bibliografía:

- Adams, A. K., y C. Holm. 1.996. *Mol Cell Biol.* 16: 4.614-20.
- 10 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 New York, NY 10158 USA (edición revisada en Marzo de 2.002).
- 15 Baudin-Baillieu, A., E. Guillemet, C. Cullin, y F. Lacroute. 1.997. *Yeast.* 13: 353-6.
- Bonneaud, N., O. Ozier-Kalogeropoulos, G. Y. Li, M. Labouesse, L. Minvielle-Sebastia, y F. Lacroute. 1.991. *Yeast.* 7: 609-15.
- Bowman, S. *et al.*. 1.997. *Nature.* 387: 90-3.
- 20 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. Schiestl, A. R. Willems, y R. A. Woods. 1.995. *Yeast.* 11: 355-60.
- Goffeau, A., *et al.*. 1.996. *Science.* 274: 546.563.-7
- 25 Jensen-Pergakes, K. L., M. A. Kennedy, N. D. Lees, R. Barbuch, C. Koegel, y M. Bard. 1.998. *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. 2.002. *Mol Microbiol.* 44: 989-99.
- Kappeli, O., M. Arreguin, y M. Rieger. 1.985. *J Gen Microbiol.* 131: 1411-6.
- 30 Kelly, S. L., D. C. Lamb, B. C. Baldwin, A. J. Corran, y D. E. Kelly. 1.997. *J Biol Chem.* 272: 9.986-8.
- Lecain, E., X. Chenivresse, R. Spagnoli, y D. Pompon. 1.996. *J Biol Chem.* 271: 10.868-73.
- McCammon, M. T., M.A. Hartmann, C. D. Bottema, y L. W. Parks. 1984. *J Bacteriol.* 157: 475-83.
- 35

Moebius, F. F., B. U. Fitzky, J. N. Lee, Y. K. Paik, y H. Glossmann. 1.998. *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. 5 1.998. *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. 1.996. *Gene*. 169: 105-9.

Sturley, S. L. 2.000. *Biochim Biophys Acta*. 1529: 155-63.

Szczecbara, F. M., et al.. 2.003. *Nat Biotechnol*. 21: 143-9.

10 Tait, E., M. C. Simon, S. King, A. J. Brown, N. A. Gow, y D. J. Shaw. 1.997. *Fungal Genet Biol*. 21: 308-14.

Taton, M., y A. Rahier. 1.991. *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. 15 C. Andersson, D. R. FitzPatrick, R. I. Kelley, y R. J. Wanders. 2.001. *Am J Hum Genet*. 69: 685-94.

Wood, V., et al. 2.002. *Nature*. 415: 871-80.

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

20	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
25	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
30	8,24	6,9	0,0	0,0

REIVINDICACIONES

1. Organismo del reino de los hongos que produce colesterol de forma autónoma.
- 5 2. Organismo según la reivindicación 1, caracterizado porque está genéticamente modificado.
3. Organismo según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque produce colesterol a partir de una fuente de carbono sencilla.
- 10 4. Organismo según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β -hidroxiesterol $\Delta 24$ -reductasa.
- 15 5. Organismo según la reivindicación 4, en el que la enzima estero 24-C-metiltransferasa ha sido desactivada.
6. Organismo según la reivindicación 4 ó 5, en el que la enzima C-22-esterol desaturasa ha sido desactivada.
- 20 7. Organismo según una de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque la expresión de las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β -hidroxiesterol $\Delta 24$ -reductasa se obtiene por transformación del organismo.
- 25 8. Organismo según una de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque la desactivación de la enzima estero 24-C-metiltransferasa se realiza por desactivación génica.
9. Organismo según una de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizado porque la desactivación de la enzima C-22-esterol desaturasa se realiza por desactivación génica.
- 30 10. Organismo según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se elige entre el género *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*.
- 35

11. Cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* caracterizada porque se trata de la cepa WGIF04 depositada ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) el 22 de abril de 2.004 con el número de registro I-3203.

5

12. Procedimiento de producción de colesterol de origen no animal que comprende el cultivo de un organismo según una de las reivindicaciones precedentes.

10 13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque la etapa de cultivo del organismo es seguida por una etapa de extracción del colesterol.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizada porque la extracción del colesterol se realiza con un disolvente no miscible con el agua.

15 15. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, caracterizado porque se realiza una etapa de saponificación antes de la extracción del colesterol.

20 16. Procedimiento según la reivindicación 13, 14 ó 15, caracterizado porque se realiza una etapa de trituración mecánica de las células antes de la saponificación o la extracción del colesterol.

25 17. Utilización de un organismo según una de las reivindicaciones 1 a 11 para la producción de colesterol o de uno de sus intermedios metabólicos o de una mezcla de esteroides marcada con ^{13}C o con ^{14}C .

25

18. Procedimiento de producción de colesterol o de uno de sus intermedios metabólicos o de una mezcla de esteroides marcada con ^{13}C o con ^{14}C que comprende las etapas siguientes:

- 30
- cultivo de un organismo según una de las reivindicaciones 1 a 11 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 esteroides.

35 19. 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 según una de las reivindicaciones 1 a 9 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.

5

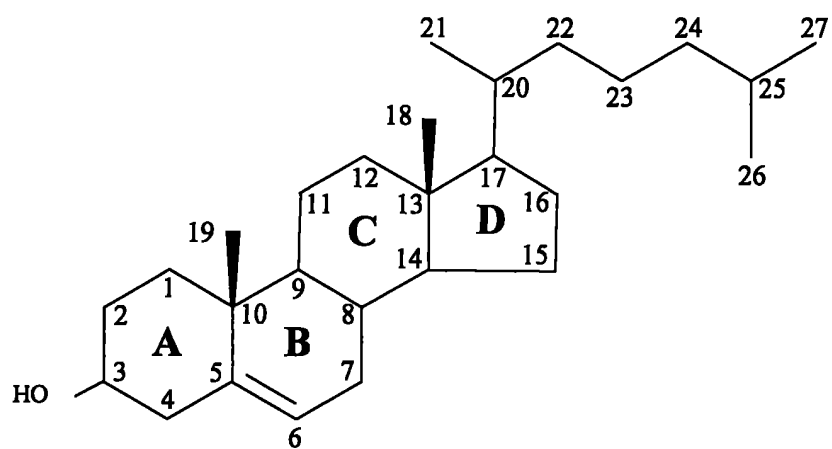
20. Composición que contiene, como marcador de trazabilidad, una mezcla isotópica de colesterol, de intermedios o de metabolitos del colesterol marcados en diferentes posiciones mediante marcadores isotópicos y que presentan un perfil isotópico definido.

10

21. Composición según la reivindicación 20, caracterizada porque se destina al campo de la alimentación o de la terapia humana o animal.

15

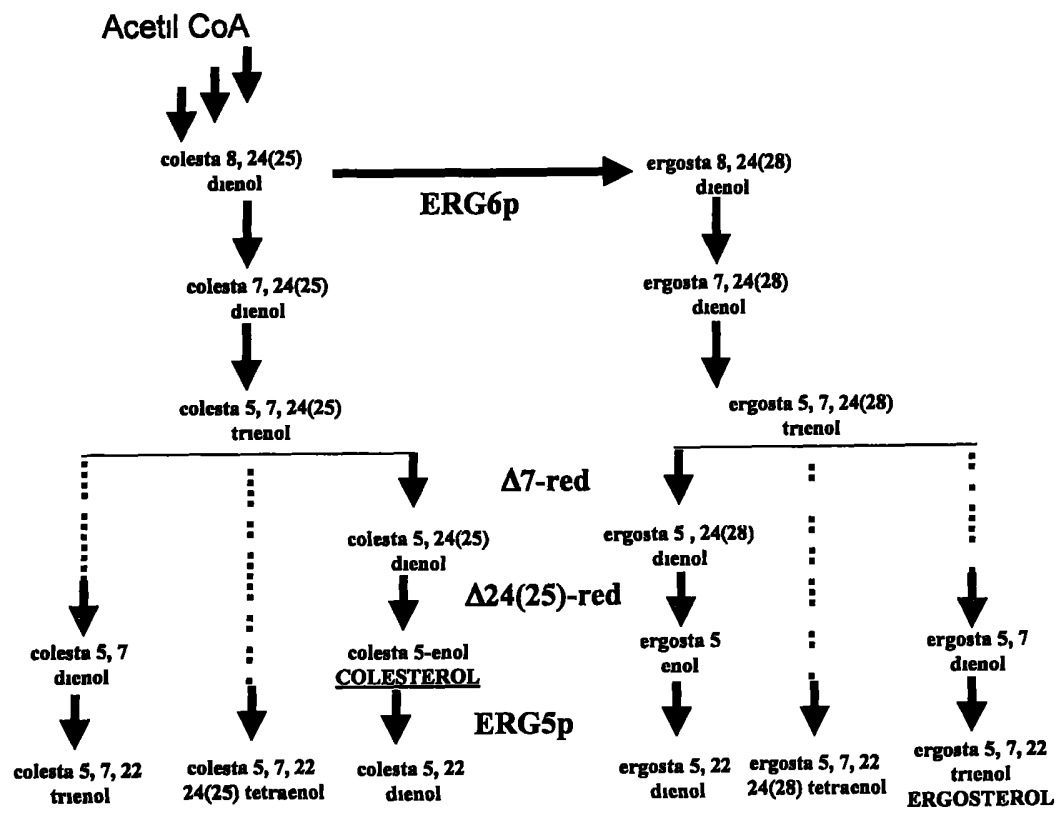
22. Muestra de moléculas de colesterol, de intermedios o de metabolitos del colesterol marcados en diferentes posiciones mediante marcadores isotópicos que presentan un perfil isotópico definido y susceptible de obtenerse por el procedimiento de fabricación según la reivindicación 19.



1/13

FIG 1

1/13



22/

3/13

22

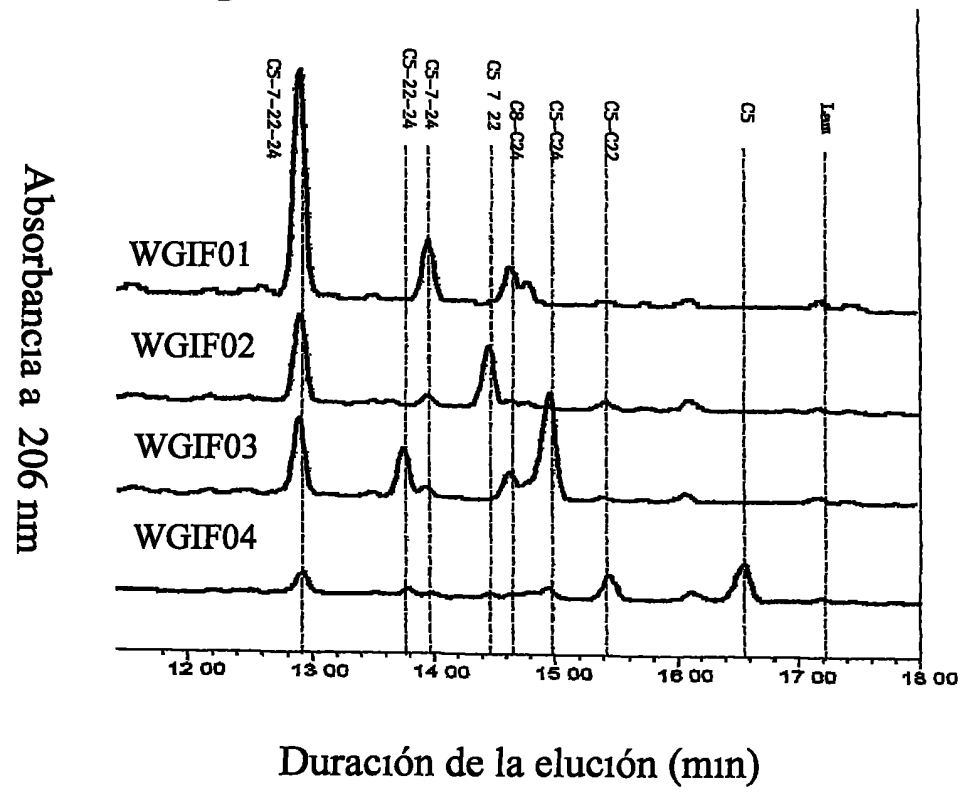


FIG 3

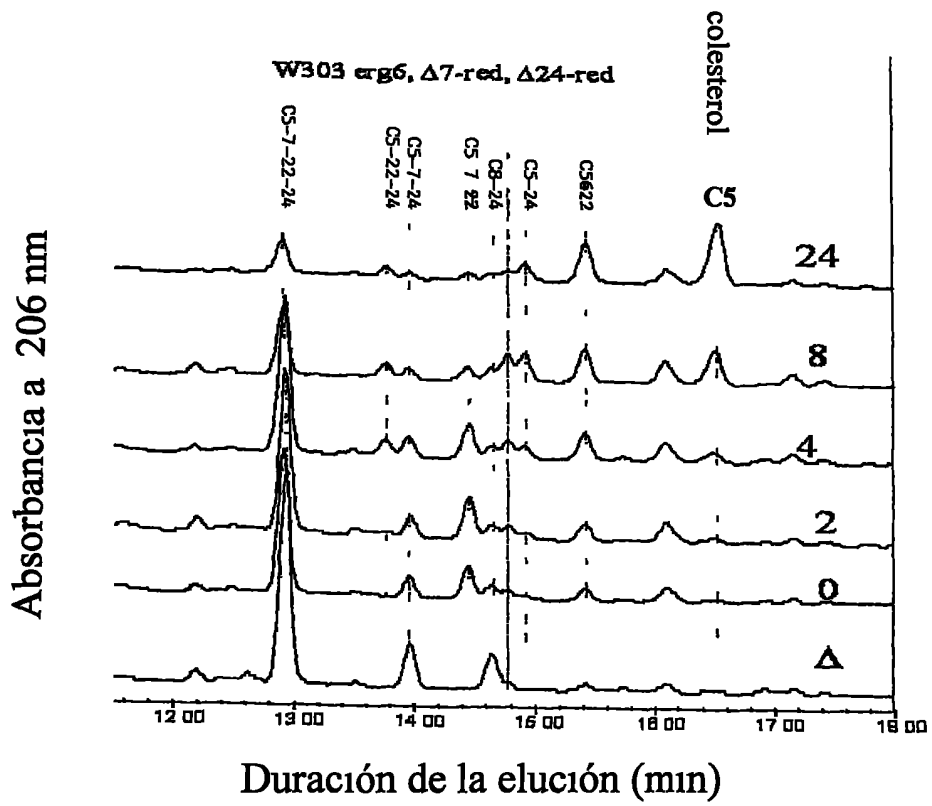
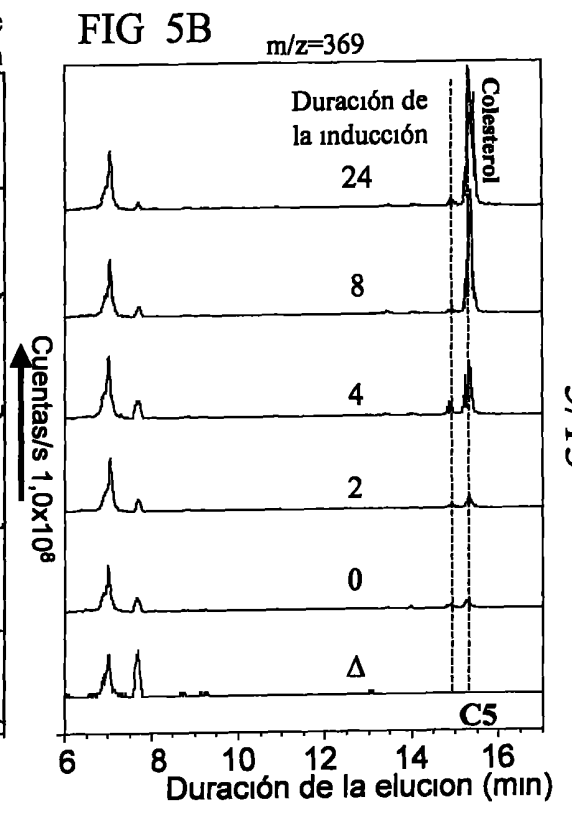
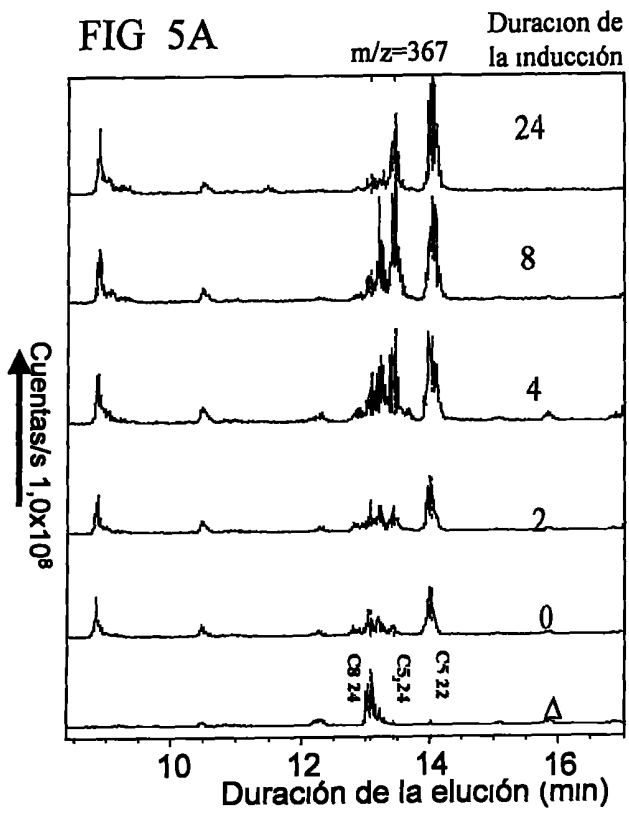


FIG 4

124



5/13

124

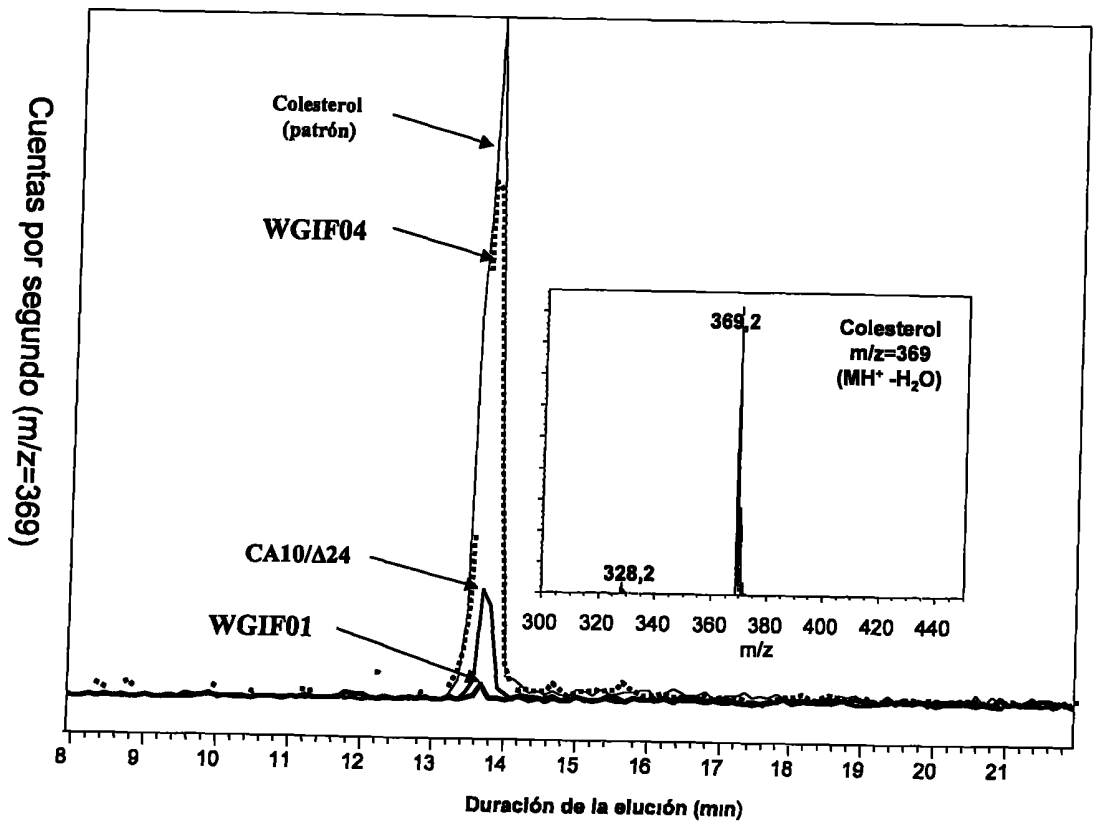


FIG 6

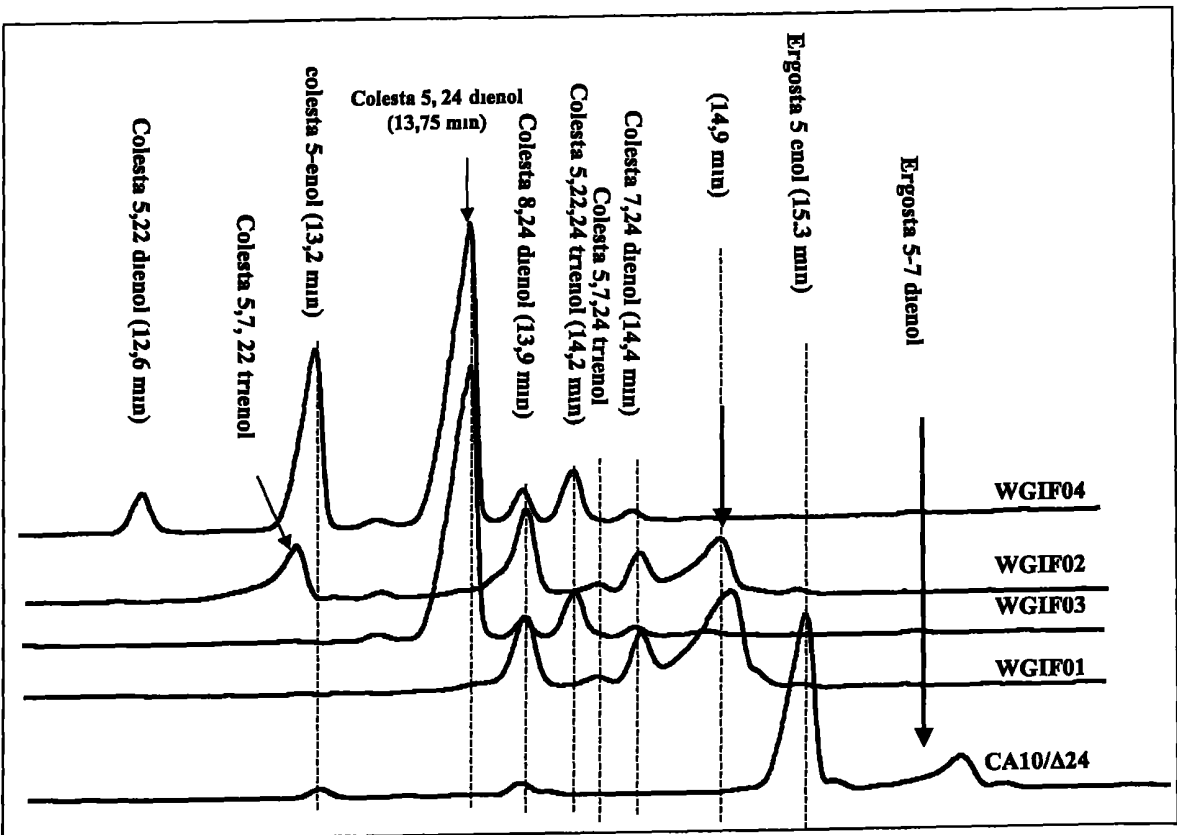
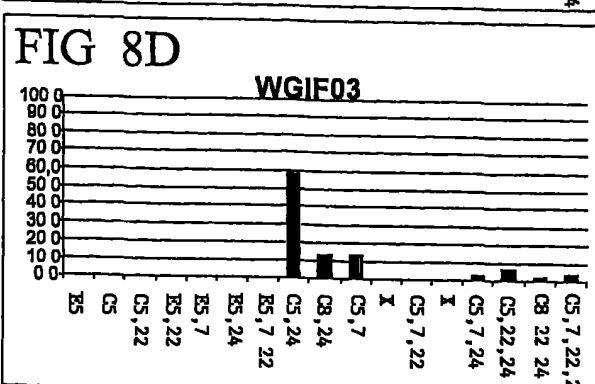
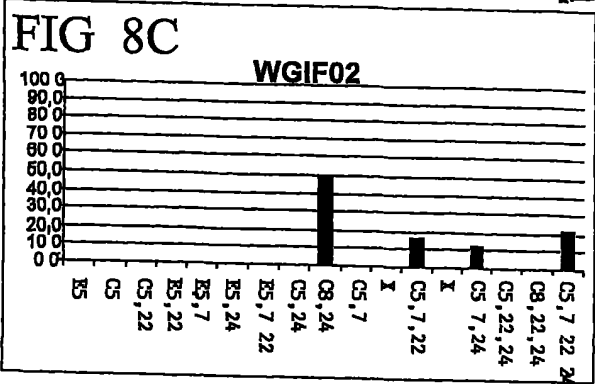
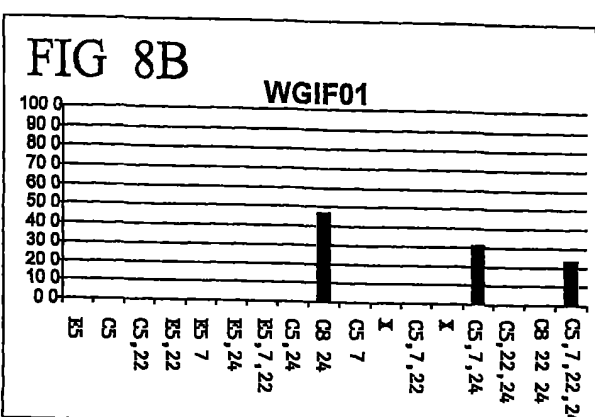
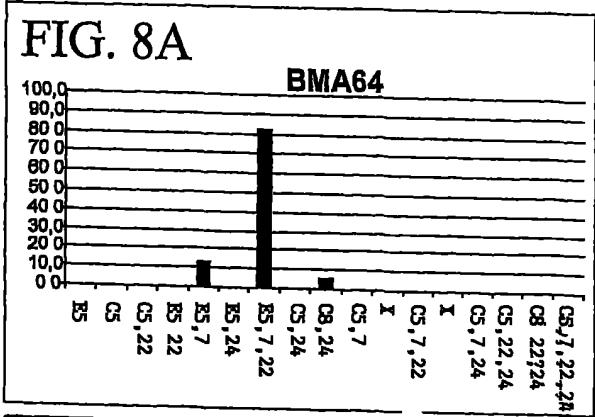


FIG 7



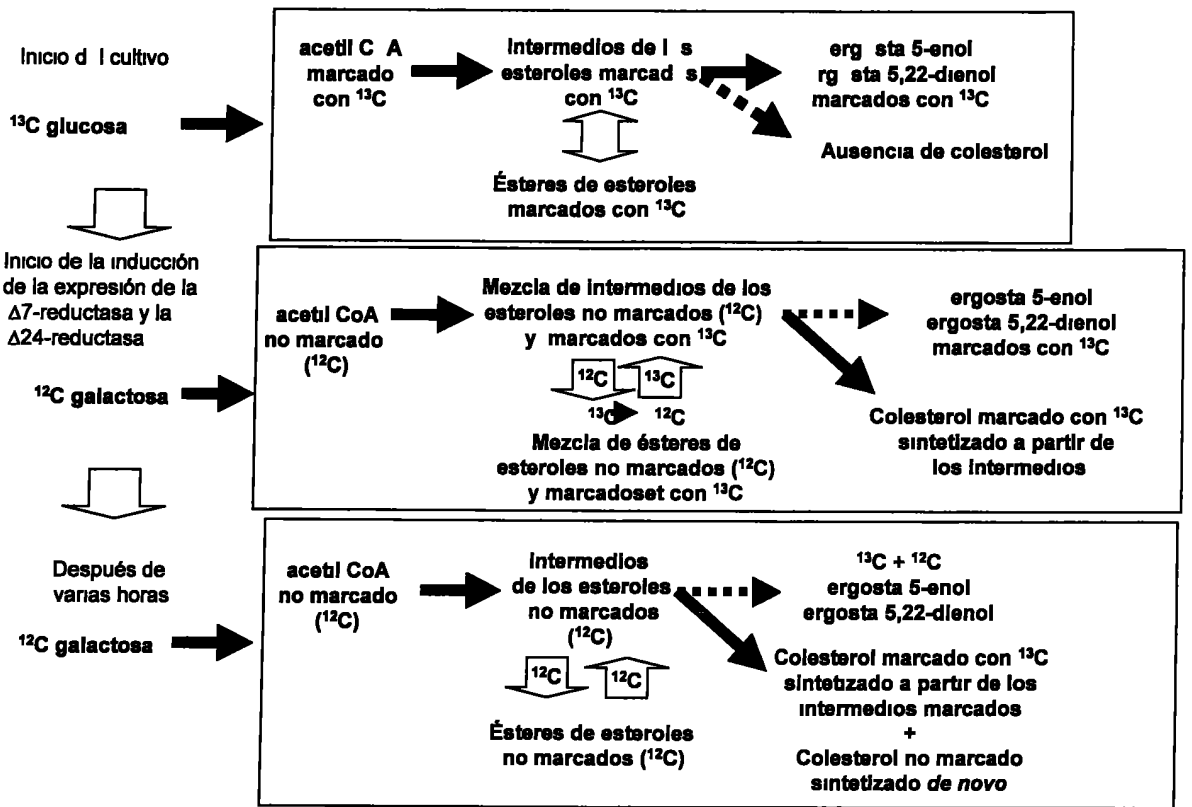


FIG 10

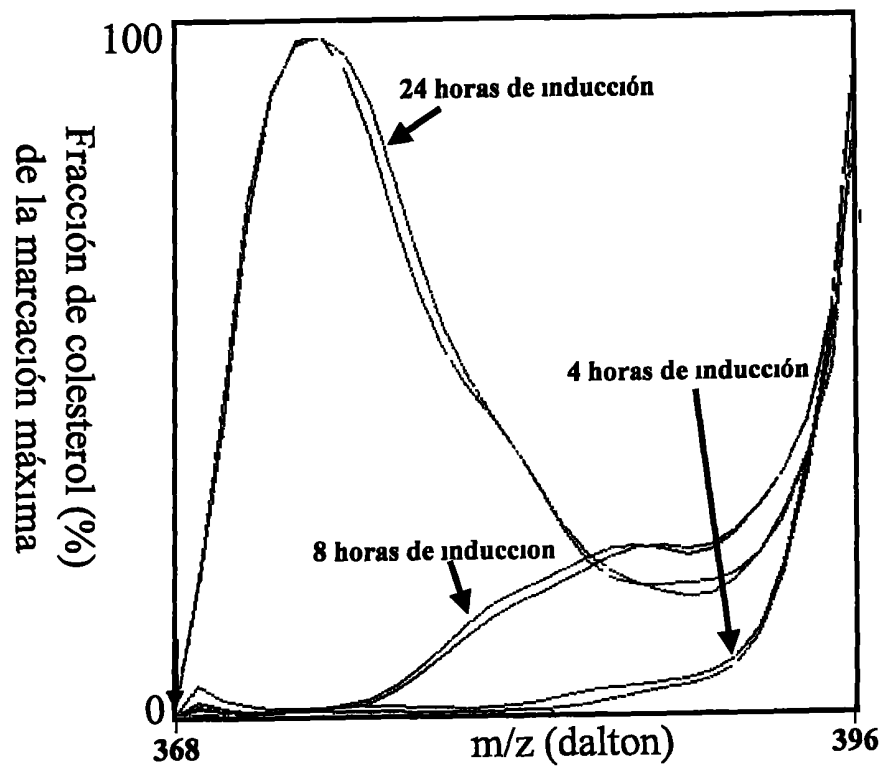


FIG 11

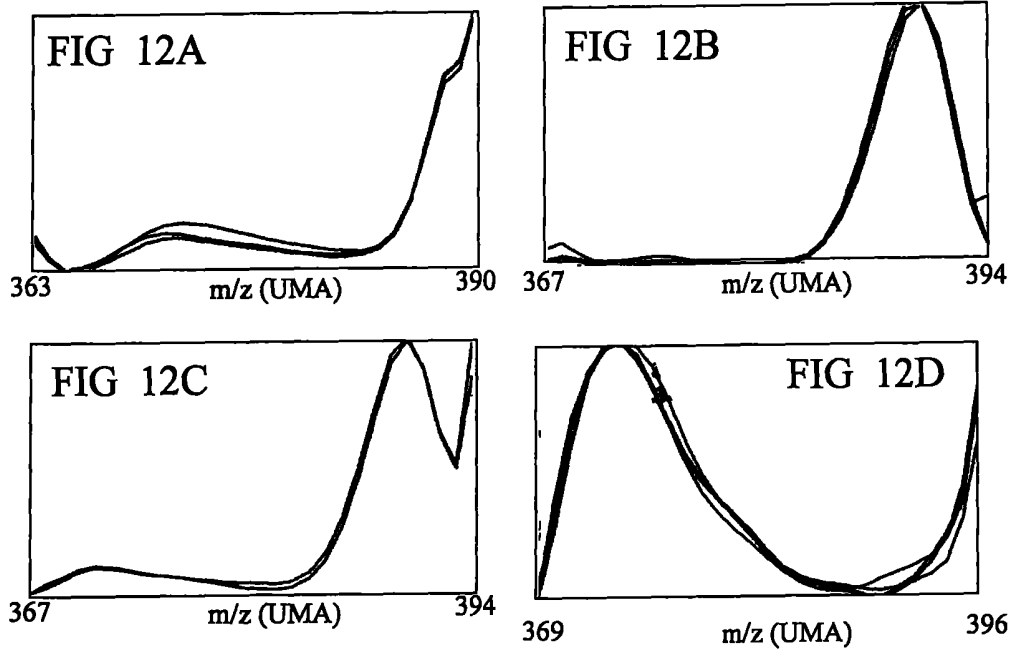
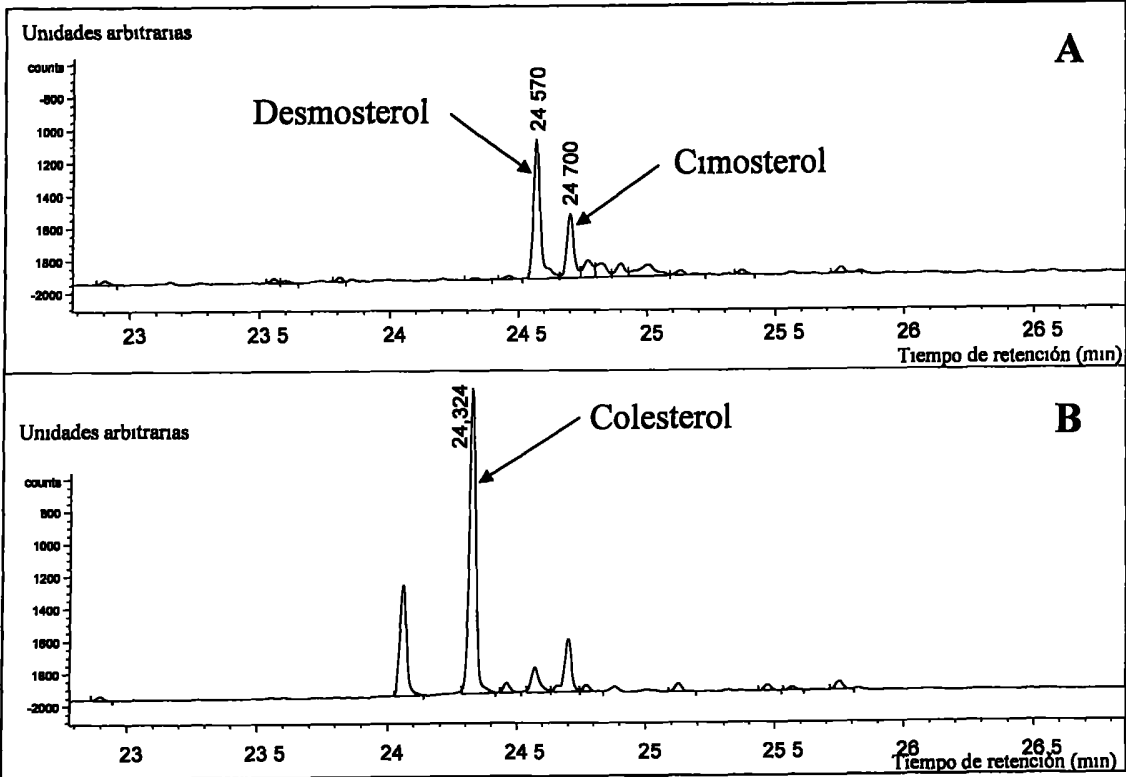


FIG 12



13/13

FIG 13

123

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Aventis Pharma S.A.
<120> CEPAS DE LEVADURA QUE PRODUCEN COLESTEROL Y SUS APLICACIONES
<130> PRJ02025
<160> 7
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 1
cctagcgacg aaaagcatca ttggagtgaa taacttggac ttaccattct tagcattttg 60
acg 63

<210> 2
<211> 68
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 2
gcataagagt gaaacagaat tgagaaaaag acaggcccaa ttcaaattcg ggtcgaaaaa 60
agaaaagg 68

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 3
agggccgaac aaagccccga tcttc 25

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 4
ggcaaaccga ggaactcttg g 21

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 5
tatatagcgg ccgctttcgc tgattaatta ccccag 36

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 6
tatatagcgg ccgcgagaag tgacgcaagc atca 34

134
131

<210> 7
<211> 270
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 7
tagcgtggat ggccaggcaa ctttagtgct gacacataca ggcataatata tatgtgtgcg 60
acgacacatg atcatatggc atgcatgtgc tctgtatgta tataaaactc ttgttttctt 120
cttttctcta aatattcttt cttatacat taggtccttt gtagcataaa ttactatact 180
tctatagaca cgcaaacaca aaggaattga caagtttgta caaaaaagca ggctaaaaaa 240
tggaacctgc cgtgtcgtg gccgtgtgcg 270

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/001090135
135A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N1/18 A61K51/04 C07B59/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P A61K C07B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data bases consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XU S ET AL: "BIOSYNTHESIS OF CHOLESTEROL IN THE YEAST MUTANT ERG6" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 155, no. 1, 1988, pages 509-517, XP009039462 ISSN: 0006-291X the whole document	1-3, 10, 12-18
X	MCCORKINDALE N J ET AL: "A COMPARISON OF THE TYPES OF STEROL FOUND IN SPECIES OF THE SAPROLEGNIALES AND LEPTOMITALES WITH THOSE FOUND IN SOME OTHER PHYCOMYCETES" PHYTOCHEMISTRY (OXFORD), vol. 8, no. 5, 1969, pages 861-867, XP002350564 ISSN: 0031-9422 page 866; tables 2,3	1, 3, 12-14
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

24 October 2005

Date of mailing of the International search report

04/11/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Esen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR2005/001090

136

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OSTLUND JR R E ET AL: "'<13>C!cholesterol as a tracer for studies of cholesterol metabolism in humans" JOURNAL OF LIPID RESEARCH 1993 UNITED STATES, vol. 34, no. 10, 1993, pages 1825-1831, XP002350566 ISSN: 0022-2275 the whole document	20-22
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200436 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2004-382697 XP002350568 & JP 2004 141125 A (MITSUBISHI CHEM CORP) 20 May 2004 (2004-05-20) abstract	1-16
A	EP 0 727 489 A (ROUSSEL UCLAF) 21 August 1996 (1996-08-21) examples 1b-1c	1-16
A	FABIAN F MOEBIUS ET AL: "Molecular cloning and expression of the human delta7-sterol reductase" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 95, no. 4, 17 February 1998 (1998-02-17), pages 1899-1902, XP002087882 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-16
A	BAE SOO-HAN ET AL: "Cholesterol biosynthesis from lanosterol: Molecular cloning, tissue distribution, expression, chromosomal localization, and regulation of rat 7-dehydrocholesterol reductase, a Smith-Lemli-Opitz syndrome-related protein" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 21, 21 May 1999 (1999-05-21), pages 14624-14631, XP002350565 ISSN: 0021-9258 abstract; figure 6b	1-16

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR2005/001090

137
137

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

A	DUPORT C ET AL: "Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 16, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 186-189, XP002084824 ISSN: 1087-0156 abstract	6,9
---	---	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/001090

138

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2004141125	A	20-05-2004	NONE
EP 0727489	A	21-08-1996	BR 9600729 A 23-12-1997
		CA 2169524 A1 16-08-1996	
		CN 1145953 A 26-03-1997	
		CN 1664107 A 07-09-2005	
		CZ 9600432 A3 11-12-1996	
		FI 960663 A 16-08-1996	
		HR 960078 A1 28-02-1998	
		HU 9600325 A2 28-11-1996	
		IL 116872 A 15-12-2004	
		JP 8289793 A 05-11-1996	
		PL 312828 A1 19-08-1996	
		RU 2242517 C2 20-12-2004	
		SK 18896 A3 01-10-1996	
		TR 960752 A2 21-08-1996	
		US 5759801 A 02-06-1998	

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 06- 112008 22) Fecha de solicitud: 02/11/2006 (30) Prioridad (31) 0404890 (32) 08/05/04 (33) FR		(51) Int Cl: C12N 1/18 (71) Solicitante(s) AVENTIS PHARMA S.A. (72) Inventor(es) DENIS POMPON Y OTROS (74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 08/12/2006 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 02/05/2005 No. de solicitud PCT/FR2005/001090		(87) Publicación internacional Fecha: 22/12/2005 N° publicación: WO 2005/121315 A1	
(54) Título: CEPAS DE LEVADURA QUE PRODUCEN COLESTEROL Y SUS APLICACIONES			

Reivindicación(es):

- | | |
|---|--|
| <p>1. Organismo del reino de los hongos que produce colesterol de forma autónoma.</p> <p>2. Organismo según la reivindicación 1, caracterizado porque está genéticamente modificado.</p> <p>3. Organismo según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque produce colesterol a partir de una fuente de carbono sencilla.</p> <p>4. Organismo según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque expresa las enzimas 7-deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa.</p> <p>5. Organismo según la reivindicación 4, en el que la enzima estero 24-C-metiltransferasa ha sido desactivada.</p> <p>6. Organismo según la reivindicación 4 ó 5, en el que la enzima C-22-esterol desaturasa ha sido desactivada.</p> <p>7. Organismo según una de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque la expresión de las enzimas 7-</p> | <p>deshidrocolesterol reductasa y 3β-hidroxiesterol Δ24-reductasa se obtiene por transformación del organismo.</p> <p>8. Organismo según una de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque la desactivación de la enzima estero 24-C-metiltransferasa se realiza por desactivación génica.</p> |
|---|--|

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-112006- -00000-0000
Fee: 2006-11-02 17:34:52 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII
Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 140

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 83,732
FECHA : OCTUBRE 30 DE 2006

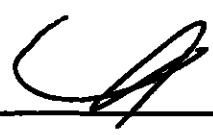
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PBO	Vr. PAGO
CHVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54739449	30/10/2006	74,493,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50000-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.00

SUN: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____ COLO 12457 841 009 2

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha Nov. 2/06.

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
AVENTIS PHARMA S.A.

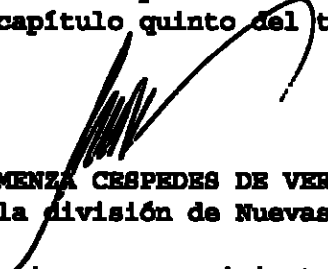
REFERENCIA	Radicación No.	6 112008
	Solicitud internacional	PCT/FR2005/001090
	Fecha inicio fase nacional	06/12/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	14692

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 22 DIC. 2006
salvado