

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones
Superintendencia de Industria y Comercio
Ministerio de Comercio, Desarrollo, Industria y Turismo
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-134632- -00005-0000

Fecha: 2010-07-23 14:25:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 538 PETICION Folios: 2

Re.: Expediente No. 08.134.632

Solicitud del examen de patentabilidad correspondiente a la Patente PCT Entrada en Fase Nacional, para:

"METODO PARA PRODUCIR LIPASA, CELULA DE YARROWIA LIPOLYTICA TRANSFORMADA CAPAZ DE PRODUCIR LA LIPASA Y SUS USOS"

Solicitante: **LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER**

SOLICITUD EXAMEN DE PATENTABILIDAD

Yo, **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, obrando en mi calidad de apoderada de la sociedad solicitante, atentamente me permito solicitar a Ud. que se realice el examen de patentabilidad de la patente PCT Entrada en Fase Nacional arriba citada, para lo cual anexo el comprobante de pago No. 10- 59.634 de Julio 22 de 2010, correspondiente a la tasa establecida para dicha solicitud.

En consecuencia, atentamente solicito a Ud. se anexe este memorial junto con el comprobante de pago al expediente correspondiente a esta solicitud de Patente PCT Entrada en Fase Nacional, y se continúe con su tramitación.

Señor Jefe,


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. 39.779.654 de Usaquén
T.P.A. No. 70.819 del C. S. J.
Calle 94 A No. 7 A-09 - Bogotá, D.C.
Teléfono (PBX): 7560770

Bogotá, **23 JUL. 2010**
MCA/gcb/P1677

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176099-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 59,634
FECHA : JULIO 22 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-134632- -00005-0000

Fecha: 2010-07-23 14:25:28 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE/II Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 538 PETICION Folios: 2

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	46704372	22/07/2010	7,652,800.00

CONCEPTO

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	114 PTC CAP-II EXAMEN DE PATENTIBILIDAD	470,000.00
	TOTAL :	5 470,000.00

SON: CUATROCIENTOS SETENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

METODO PARA PRODUCIR LIPASA, CELULA DE YARROWIA LIPOLYTICA
TRANSFORMADA CAPAZ DE PRODUCIR LA LIPASA Y SUS USOS

Descripción de la Invención

5 La presente invención se relaciona con un método para producir lipasa
utilizando células de levadura *Yarrowia lipolytica*, productora de una lipasa
recombinante ácido-resistente, cuyo método permite la obtención de una lipasa
capaz de utilizarse como medicamento; la presente invención es igualmente
relacionada con una cepa de *Yarrowia lipolytica* productora en exceso de lipasa
10 recombinante ácido-resistente y sus aplicaciones.

Los alimentos ingeridos cotidianamente por el hombre se constituyen
esencialmente de lípidos, de proteínas y de azúcares. Todos los constituyentes
pasan, después de su absorción, una hidrólisis catalizada por las enzimas del
tracto digestivo. Un déficit de una u otra de estas enzimas pueden encontrar
15 problemas digestivos, y conducir a una malnutrición importante. Esto, por
ejemplo es el caso, en algunas condiciones patológicas, como la
mucoviscosidad o la insuficiencia pancreática exocrina, las cuales se relacionan
con un déficit de lipasa pancreática. Es clásicamente propuesto corregir este
déficit, administrar por vía oral extractos pancreáticos. Sin embargo, la eficacia
20 de esta terapia es limitada por el hecho de que las enzimas contenidas en los
extractos (lipasas, amilasas y proteasas) son rápidamente inactivadas por la
acidez del medio gástrico.

Se ha propuesto utilizar preparaciones de lipasas que resistan a las
condiciones gástricas, tales como, por ejemplo, preparaciones de lipasa
25 gástrica de mamíferos producidas por ingeniería genética, como la descrita en
la Solicitud de Patente Francesa publicada bajo el número 2 699 179, en
nombre de L'INSTITUT DE RECHERCHE JOUVENIAL SA o de preparaciones
de lipasas de microorganismos que poseen una actividad correcta en el medio
ácido [ZENTLER-MONRO y col., *Pancreas*, 7, 311-319 (1992)].

30 Entre las lipasas de microorganismos activos en medio ácido, se puede

citar las lipasas fúngicas, tales como *Candida ernobii*, [YOSHIDA y col., Biochim. Biophys. Acta., 154, 586-588, (1988)], *Tricosporon asteroide* [DHARMSTHITI y col., Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 111-116 (1997)], *Rhizopus javanicus* [(UYTTENBROECK y col., Biol. Chem. Hoppe Seyler, 374, 245-254, (1993)], o *Yarrowia lipolytica* [HADEBALL, Acta Biotechnol., 2, 159-167 (1991); NOVOTNY y col., J. Basic Microbiol., 28, 221-227 (1988)]. Además de su actividad en pH ácido, estas lipasas presentan características comunes de ser resistentes en presencia de su sustrato, de la digestión por las proteasas (tripsina, quimiotripsina y pepsina), y de ser resistentes a la acción de sales biliares (su actividad es conservada en presencia de 10 mM de taurocolato de sodio).

El uso de *Yarrowia lipolytica* para la producción de un gen de interés ha sido descrito anteriormente. Asimismo, la solicitud europea 1 108 043, en nombre de INRA y CNRS, describe el uso de un vector integrado, que comprende un casete de expresión de un gen de interés y de secuencia zeta, que corresponden a las secuencias LTR del retrotransposón Ylt de *Yarrowia lipolytica*. Un tal vector de expresión permite la integración no homóloga y dispersada de varias copias del injerto de interés en el ADN genómico de una cepa de *Yarrowia lipolytica* extraída de secuencias zeta. Este sistema ha sido notablemente utilizado para la integración del gen *LIP2*, que es codificada por una lipasa, en el ADN de *Yarrowia lipolytica* y permite, en condiciones de cultivo que no son detalladas, una secreción de lipasa 10 a 15 veces superior a las cepas no transformadas.

Otros estudios describen el uso del mismo vector de expresión que el descrito en la Solicitud de Patente europea 1 108 043, para la producción de una lipasa recombinante de *Yarrowia lipolytica* (Solicitud Internacional WO 01/83773; PIGNEDE y col., Journal of Bacteriology, Vol 182, No. 10, p. 2802-2810 (2000) y PIGNEDE y col., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 8, p 3283-3289 (2000). Asimismo:

- la solicitud Internacional WO 01/83773, a nombre de

LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER, describe la obtención del clon de *Yarrowia lipolytica* MS4 (CNCM I-2294), que comprende 10 copias del casete de expresión del gen *LIP2* integradas en su ADN, así como su uso por la producción de lipasa con un rendimiento de 0.5 g de lipasa por litro de sobrenadante de cultivo, y una actividad catalítica de 12 000 U/ml, medida usando aceite de olivo como sustrato, una Unidad que corresponde a la cantidad de enzima capaz de catalizar la liberación de 1 μ mol de ácido graso por minuto, es decir 200 veces más que la cepa inicial. Mientras tanto, el método de producción de lipasa descrito en la Solicitud presenta un inconveniente mayor, puesto que se utilizan medios de cultivo que contiene bactopectona o bactotripton. Estos productos, que no son caracterizados y que contienen varios hidrolisatos proteicos, son clásicamente utilizados como fuente de azoto y de carbono. Por lo consiguiente, el método descrito en la Solicitud no permite obtener una lipasa directamente utilizable como medicamento.

- PIGNEDE y col. (Journal of Bacteriology, 2000) han caracterizado más particularmente la lipasa extracelular codificada por el gen *LIP2* de *Yarrowia lipolytica* (cepa PO1d). En este artículo también se estudian:

- la secreción de lipasa a partir de diferentes cepas salvajes (PO1d en la cual *Ylt1* es ausente y E150, en la cual *Ylt1* es presente) y de diferentes cepas recombinantes de JMY184 (PO1d-6-15) y JMY279 (PO1d-6-17) así como
- la producción en exceso de lipasa notablemente por el transformador JMY184.

Este artículo de PIGNEDE y col. compara la producción de lipasa de cepas salvajes, cepas mutantes y cepas recombinantes obtenidas de acuerdo con el método descrito anteriormente (Solicitud Internacional WO 01/83773). Las cepas salvajes segregan entre 30 y 50 U de lipasa/ml más que las cepas mutantes, obtenidas por la acción de N-metil-N'nitro-N-nitrosoguanidina (NNNG), que producen 25 veces más de lipasa, es decir 1 200 U/ml en las

condiciones de cultivo optimizadas haciendo intervenir un medio que contiene peptona (medio de precultivo) y un medio que contiene lactosuero (medio de fermentación) (ver igualmente DESTAIN y col. 1997). Las cepas recombinantes se obtienen con la ayuda de la construcción que comprende el gen *LIP2* regulado por el promotor POX2 y por la integración no homóloga, en múltiples copias y de manera dispersada, del casete de expresión. PIGNEDE y col. han obtenido transformadores estables (por ejemplo la cepa JMY184) que produce 2 000 U/ml en condiciones no optimizadas, es decir un medio YPDH (que comprende 10 g/l de levadura, 10 g/l de bactopectona, 10 g/l de glucosa y 10 g/l de aceite de olivo) que corresponde a aproximadamente 0.5 g de lipasa/l de sobrenadante. De la misma manera que anteriormente, las preparaciones de lipasa descritas por PIGNEDE y col. y por DESTAIN y col., son impropias, de manera que, con un uso medico y más particularmente en la constitución de lotes clínicos, puesto que su producción necesita el uso de medios de cultivo que contengan peptonas o lactosuero.

-Siguiendo estos trabajos, el equipo PIGNEDE (Applied and Environmental Microbiology, 2000) ha estudiado las cepas de *Yarrowia lipolytica* transformadas por un vector que comprende un casete de expresión del gen *LIP2*. Los autores han determinado que por 8 de sus transformadores, el número de copias del casete de expresión del gen *LIP2* es comprendido entre 6 y 16 (10 copias en promedio), lo que se traduce de 2 a 15 acciones del casete de loci diferentes. La cepa JMY184 comprende también 12 copias del casete de expresión del gen *LIP2*, integrada a 4 loci diferentes. Los autores, por otra parte, han estudiado más precisamente el transformador JMY184. Se confirma que la cepa JMY184 produce 0.5 g de lipasa/l de sobrenadante con una actividad de 1 500 U/ml en medio rico YPDH (que contiene bactopectona) (en comparación con 50 U/ml por una cepa salvaje PO1d), medida utilizando el aceite de olivo como sustrato. Estos valores permiten deducir una actividad específica de aproximadamente 3 000 U/mg de lipasa. Los autores anunciaron, entre otras, que la producción optimizada de lipasa en fermentador por la cepa

JMY184 permite obtener las preparaciones que tienen una actividad hasta 10 000 U/ml. Estas condiciones de cultivo que han permitido este resultado no son divulgadas. En este artículo, los autores han estudiado la estabilidad en cultivo de los transformadores, y notablemente del clon JMY184, y han mostrado su estabilidad durante 120 generaciones. PIGNEDE y col. han considerado que para optimizar la producción de lipasa, los factores a tomarse en cuenta son la estabilidad de transformadores y las condiciones de cultivo.

Por otro lado, ellos han demostrado que existe una fuerte correlación entre el número de copias de gen *LIP2* integradas y la sobreproducción de lipasa.

Mientras tanto, para la producción de lipasa, los únicos medios de cultivo que contienen este artículo son medios que contienen peptonas, tales como medio rico en YPDH.

Los métodos de producción de lipasa de la técnica anterior, los mismos que permiten obtener rendimientos mejorados en lipasa, no son adaptados a la producción de una lipasa capaz de ser utilizada con fines medicinales.

En efecto, los medios de cultivo habitualmente puestos en obra contienen todas las mezclas no caracterizadas y/o productos de origen animal, tales como peptona, triptonas y lactosuero. Existe una necesidad de desarrollar un sistema que permita la producción de preparaciones de lipasa recombinante adaptada a un uso médico.

Para resolver este problema, los inventores han establecido un método de producción de lipasa que responde mejor a las necesidades que los métodos de producción de la técnica anterior. Más precisamente, los inventores han establecido un método de producción de lipasa en el cual el medio de cultivo utilizado es extraído de productos antes citados, es decir que no contienen ningún producto de origen animal ni cualquier mezcla no caracterizada, tal como la peptona, triptona o lactosuero. Los inventores seleccionaron una nueva cepa de *Yarrowia lipolytica* recombinante que produce lipasa Lip2, la cual, relacionada con lo anterior, permite aumentar de manera

significativa, el rendimiento de lipasa producida.

La presente invención tiene como objetivo un método de producción de lipasa, que utiliza una cepa *Yarrowia lipolytica* transformada por un vector que comprende un casete de expresión de una lipasa ácido-resistente de levadura, caracterizada porque el medio de cultivo utilizado no contiene productos de
5 origen animal ni mezclas no caracterizadas, tales como peptona, triptona o lactosuero.

Más precisamente, la presente invención tiene como objetivo un método de producción de lipasa, que comprende:

10 a) una etapa para utilizar en cultivo de células de *Yarrowia lipolytica* transformada por un vector de expresión que comprende un casete de expresión de una lipasa ácido-resistente de levadura, en las condiciones que permiten la producción de lipasa;

15 b) una etapa de recuperación, en el sobrenadante del cultivo, de la lipasa también producida;

20 c) el método es caracterizado porque la etapa a) de colocar en cultivo es utilizada en un medio de cultivo extraído de productos de origen animal o de mezclas no caracterizadas constituidas de materias proteicas de origen animal (lactosuero por ejemplo) o de sus productos de digestión enzimática (triptona, o peptona por ejemplo).

De acuerdo con una modalidad ventajosa del método, el medio de cultivo de acuerdo con la etapa a) comprende:

- como fuente de azoto, azoto mineral, y de preferencia de sulfato de amonio;

25 - una fuente de carbono seleccionada entre las fuentes de carbono de origen glucídico, los polialcoholes tales como glicerol, y las fuentes de carbono de origen lipídico tales como ácidos grasos y acilgliceroles; y

- sales minerales, oligoelementos y vitaminas;

30 De acuerdo con una modalidad ventajosa del método, la etapa a) comprende:

a1) una etapa de pre-cultivo de células transformadas de *Yarrowia lipolytica* tales que las definidas en el medio que contiene una fuente de carbono de origen glucídico; y

5 a2) una etapa de fermentación de las células que comprenden una fase de crecimiento celular en el medio que contiene una fuente de carbono de origen glucídico y una fase de síntesis de lipasa en un medio que contiene como única fuente de carbono un ácido graso elegido entre los triglicéridos de cadena corta, media o larga. Asimismo, la fermentación es utilizada en un primer tiempo de manera que permite el crecimiento celular, por ejemplo, en presencia de una fuente de carbono de origen glucídico, y en el segundo tiempo en condiciones que permiten la biosíntesis de lipasa, por ejemplo, en presencia, como única fuente de carbono, de un inductor químico de tipo ácido graso, tal como un triglicérido de cadena corta (tal como la tributirina), media (tal como la trioctanoína o trioctanoilglicerol) o larga (tal como aceite de olivo o trioleína).

10
15

La fermentación es ventajosamente utilizada con un pO₂ constante comprendido entre 15% y 25% y un pH de preferencia inferior a 6.5. La fermentación puede, por ejemplo, utilizarse con una salida de aire de aproximadamente 1 vvm, una unidad vvm teniendo 1 volumen de aire por volumen de líquido por minuto (por ejemplo, por un fermentador de 30 litros, 1 vvm es igual a 30 l/min o para un fermentados de 5 litros, 1 vvm es igual a 5 l/min).

20

De acuerdo con una disposición ventajosa del modo de uso, la etapa a1) de pre-cultivo es realizada hasta que se alcanza un valor de DO_{600nm} comprendido entre 3 a 10 por 1 ml, y la etapa a2) de fermentación, la fase de síntesis de lipasa es iniciada cuando DO_{600nm} del cultivo alcanza un valor comprendido entre 60 y 70 ml por hora.

25

De acuerdo con otra disposición ventajosa de uso, la etapa b) es iniciada cuando DO_{600nm} alcanza un valor comprendido entre 300 y 350 por ml. La etapa b) puede también comprender:

30

- b1) la separación de lipasa del sobrenadante de cultivo;
- b2) la purificación de lipasa obtenida en b1).

Estas dos etapas se realizan con técnicas clásicas conocidas: separación física (filtración, cromatografía, centrifugación) o fisico-química (precipitación).

La separación de la lipasa del sobrenadante puede utilizarse por el experto en la técnica, por ejemplo, por una técnica elegida entre la filtración tangencial de fibra honda, la filtración frontal y la centrifugación continua o discontinua.

La purificación de lipasa consiste contablemente en reducir la biocarga, es decir la presencia de microorganismos, y puede utilizarse por todas las técnicas de purificación adecuada conocidas por el experto en la técnica, tal como técnica elegida entre la filtración, la precipitación fraccionada, la cromatografía de cambio de iones, la cromatografía de interacciones hidrófobas y la cromatografía por gel-filtración.

Opcionalmente, el método de producción de lipasa de acuerdo con la invención puede igualmente comprender una etapa de concentración, o enriquecimiento que consiste en el aumento de la concentración de lipasa en la preparación. Una etapa similar puede utilizarse, por ejemplo, después de la etapa de purificación. Ella puede igualmente tener lugar simultáneamente en la etapa de purificación.

El método de producción de acuerdo con la invención permite notablemente producir la lipasa recombinante en cantidades situadas entre alrededor de 1 a 3 g de lipasa purificada por litro de sobrenadante de cultivo. De manera particular ventajosa, el método de acuerdo con la invención permite la obtención de una preparación de lipasa recombinante con una actividad catalítica superior a 15000 U por ml de sobrenadante de cultivo. De manera preferida, la preparación posee una actividad superior a 20000 U/ml de sobrenadante de cultivo. Estos valores se determinan con el pH 6, utilizando la trioctanoína como sustrato. Este valor de actividad de la preparación de lipasa

tiene un interés muy particular en el cuadro de desarrollo de productos farmacéuticos. Ahora es posible administrar estas dosis reducidas de lipasa producida por el método de acuerdo con la invención, guardando una eficacia suficiente para obtener el efecto terapéutico deseado, que puede ser, por ejemplo, la corrección de una mala absorción de grasa unida con una insuficiencia pancreática relacionada con el déficit de lipasa.

El hecho de poder producir, desde ahora en adelante, la lipasa Lip2 utilizando cepas de *Yarrowia lipolytica* recombinantes utilizadas en el proceso de la presente invención es un vector integrativo que posee al menos una copia del gen *LIP2* y los elementos de regulación de la expresión. Este vector puede integrarse sea en el ADN plasmídico o sea en el ADN genómico de levadura. Un ejemplo de vector integrativo particularmente preferido es el vector JMP6 o el vector JMP10 tales como los descritos en la Solicitud Internacional WO01/83773. El vector JMP6 comprende un casete de expresión del gen *LIP2*, que es codificado por su precursor Lip2p de la lipasa Lip2 de *Yarrowia lipolytica*, arriba del cual es colocado el promotor de acilo CoA oxidasa ACO2 de *Yarrowia lipolytica*, denominado POX2. El vector JMP10 comprende igualmente el gen *LIP2*, arriba del cual se encuentra el promotor de la lipasa Lip2 de *Yarrowia lipolytica*. Estos dos promotores son inducibles por los triglicéridos y los ácidos grasos. En cualquiera de los vectores, el casete de expresión y el promotor son colocados entre las secuencias zeta como se ha descrito anteriormente. La integración puede ser determinada, es decir dirigida en los lugares, o bien aleatorio. Asimismo, puesto que la cepa de *Yarrowia lipolytica* transformada es extraída de secuencia zeta (es por ejemplo el caso de la cepa PO1d), la integración del casete de expresión es dispersada en el ADN genómico de la cepa. Al contrario, puesto que la cepa de *Yarrowia lipolytica* contiene secuencia zeta (es por ejemplo el caso de la cepa E150), la integración es principalmente determinada al nivel de las secuencias.

De acuerdo con otra modalidad ventajosa del método, la cepa transformada de *Yarrowia lipolytica* es de preferencia la cepa denominada YL-

LIP2-6C, registrada ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (C.N.C.M.), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, el 15 de Diciembre de 2005, bajo el número I-3542. Esta cepa YL-LIP2-6C es genéticamente estable.

5 En el sentido de la invención, las expresiones "estable", "genéticamente estable", "estabilidad genética" así como sus variantes, son utilizadas en referencia a la conservación de un mismo número de loci de integración de un ácido nucleico de interés en el ADN del clon considerado, durante al menos 30 generaciones. Este número de 30 generaciones ha sido elegido como base de
10 cálculo de la estabilidad genética puesto que los inventores han constatado que correspondé al número de duplicación de la población celular suficiente para permitir la producción de lipasa utilizando un método que comprende al menos una etapa de pre-cultivo de células *Yarrowia lipolytica* recombinantes y una etapa de producción de lipasa, propiamente dicho, en condición de
15 fermentación. En el sentido de la presente invención, una generación es definida por la duplicación de la población celular y puede calcularse de acuerdo con la formula $Y=X*2^g$ en donde Y es la población celular en el tiempo t (por ejemplo expreso en densidad celular), X es la población celular inicial en los tiempos t0 y g que representa el número de generaciones necesarias para que la población celular pase del valor X al valor Y. De manera preferida, el
20 clon es generalmente estable puesto que al menos 90% de las colonias analizadas, después de al menos 30 generaciones, contienen el mismo número de loci del gen de interés que el clon de partida. Asimismo, como resaltan los ejemplos, el clon YL-LIP2-6C es estable puesto que cerca de 100% de las
25 colonias analizadas después de 100 generaciones contienen 6 loci del gen LIP2 (un lugar correspondiente al gen LIP2 endógeno + 5 loci de integración del casete de expresión del gen LIP2).

De manera sorprendente, puesto que el método de acuerdo con la invención utiliza esta cepa en particular, los inventores han podido producir la
30 lipasa recombinante en gran cantidad y tener un mejor control en la producción.

Los inventores han podido mejorar el rendimiento de producción de lipasa y han podido obtener notablemente una producción del orden de 1 a 3 g de lipasa pura por litro de sobrenadante de cultivo. Igualmente se ha podido obtener preparaciones de lipasa que presentan una actividad cercana a 20 000 U/ml.

En el sentido de la presente invención, la actividad de lipasa corresponde con su actividad enzimática. La actividad catalítica de una solución de lipasa es expresa en unidad (8U) por ml de solución analizada. La actividad específica es expresa en unidad (U) por ml de proteína (lipasa) purificada. Una unidad corresponde a la cantidad de enzima capaz de catalizar la liberación de 1 μ mol de ácido graso por minuto. La actividad específica de una lipasa varía en función de la naturaleza del triglicérido utilizado como sustrato.

Además de la mejora en el rendimiento de producción de lipasa, los inventores igualmente han podido asegurar una mejor reproducibilidad del método de producción, mejorar la homogeneidad del producto final y mejorar las condiciones de purificación de lipasa.

Las diferentes modificaciones permiten obtener una lipasa que responde a las condiciones requeridas por un uso médico. En efecto, en el cuadro de su búsqueda, los inventores han mantenido observado que la lipasa Lip2 es activa en los valores de pH superiores a 3 y hasta un valor de pH cercano a 8, con una actividad óptima por un pH comprendido entre 5 y 6. Al contrario, ella es inactiva de manera irreversible después de una incubación de 2 horas con pH 3 o pH 8.5. La actividad específica de lipasa Lip2 ha sido igualmente analizada en función de diferentes sustratos y los inventores han determinado con pH los valores de aproximadamente 10 760 U/mg, alrededor de 16 920 U/mg y alrededor 12 260 U/mg de lipasa purificada, respectivamente con triglicéridos de cadena corta (tributirina), media (trioctanoína) y larga (aceite de olivo). En fin, los inventores han constatado de manera sorprendente que la lipasa Lip2 es activa en presencia de sales biliares y que esta actividad aumenta con la concentración de sales biliares. Esta actividad en presencia de sales biliares ha

sido solamente observada con la lipasa gástrica y la lipasa pancreática relacionada con la co-lipasa. Asimismo el uso de la lipasa Lip2 con una importante actividad específica no necesita la presencia de co-lipasa.

El clon YL-LIP2-6C que contiene varias copias del casete de expresión de la lipasa Lip2 se transmite por 5 eventos de integración del gen LIP2 con loci diferentes. Después de que se coloca en condiciones adaptadas a la producción de lipasa, el clon YL-LIP2-6C produce previamente lipasa de las cepas transformadas de *Yarrowia lipolytica* de la técnica previa. La lipasa es producida de acuerdo con un rendimiento superior de 1 g/l de sobrenadante de cultivo, es decir superior al rendimiento observado con los clones de la técnica previa, descritos anteriormente.

La presente invención tiene igualmente como objetivo una preparación de lipasa susceptible de obtenerse por el método de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una modalidad ventajosa de la preparación de lipasa, ella presenta una actividad al menos igual a 15000 U/ml, de preferencia superior a 20000 U/ml puesto que es determinada como se indica anteriormente.

La invención tiene también como objetivo el uso de la preparación de lipasa de acuerdo con la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una patología relacionada con un desarreglo de absorción de grasas (por ejemplo ácidos grasos de cadena corta, media o larga), notablemente unidos a una insuficiencia pancreática, notablemente exocrina.

La invención tiene igualmente como objetivo un medicamento, caracterizado porque comprende una preparación de lipasa tal como la definida anteriormente.

La presente invención ha tenido igualmente como objetivo una célula de *Yarrowia lipolytica* transformada por un vector de expresión de una lipasa ácido-resistente de levadura, caracterizada porque se trata de un clon denominado YL-LIP2-6C, registrada ante la Colección Nacional De Cultivos de Microorganismos (C.N.C.M.); 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15.

el 15 de Diciembre de 2005 bajo el número I-3542.

La presente invención tiene, entre otras, como objetivo, el uso de una célula tal y como se define anteriormente para la producción de lipasa ácido-resistente de levadura.

5 Además de las disposiciones que preceden, la invención también comprende otras disposiciones, que sobresalen de la descripción que seguirá, que se refieren a ejemplos de uso del método objetivo de la presente invención así como figuras anexas, en los cuales:

10 - La Figura 1 representa el enfoque global del control de la estabilidad genética del clon YL-LIP2-6C durante el método de producción de lipasa.

15 - La Figura 2 representa la variación de la densidad óptica de 600 nm (DO_{600} , eje de ordenadas izquierdas)(-+-) y la variación de niveles de crecimiento ($h-1$, eje de ordenadas derechas)(-■-) en función de tiempos (horas, eje de abscisas) durante el método de fermentación. La flecha indica la inducción de la producción de lipasa.

20 - La Figura 3 representa el análisis por mancha tipo Southern del número de eventos de integración del gen LIP2 con loci diferentes en el genoma de 23 colonias (pistas 24 a 43) retenidas en los tiempos T33, que corresponden al fin de la fermentación, alrededor de 100 horas después del principio de la fermentación. Las copias 1 a 6; 6 loci del gen LIP2 (5 loci para la integración del casete de expresión del gen LIP2+un lugar para el gen LIP2 endógeno). M: marcador de medida.

25 - La figura 4 representa el seguimiento, por SDS-PAGE, de la producción de lipasa recombinante por el clon YL-LIP2-6C durante el método de producción, de T16 a T33. La flecha indica la inducción de la producción de lipasa (T17, 48 horas de fermentación). M: escala de peso molecular; las cinco pistas de la parte derecha de gel correspondientes a las cantidades conocidas (2.5 µg a 20 µg) de la lipasa Lip2 purificada.

30 - La Figura 5 representa el análisis, por SDS-PAGE, de la pureza

de lipasa en el sobrenadante en el tiempo T33 (fin de procedimiento de fermentación). MW: escala de peso molecular; Ref. Lip2 F5: gama de lipasa Lip2 de 1 a 10 µg; YL-LIP2-6C sobrenadante; volúmenes, en µl, de sobrenadante analizado.

La Figura 6 representa el espectro de masa, determinado por espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF, de lipasa recombinante producida por el clon YL-LIP2-6C.

EJEMPLO 1-MATERIALES Y METODOS

1) Medios utilizados

Las concentraciones finales indicadas son las concentraciones en las soluciones-madres.

Medio de base 02130S no enriquecido

Ingredientes	concentración final
Glucosa	10 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
Na ₂ HPO ₄	3 g/l
H ₃ BO ₃	0,34 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g/l
C ₅ H ₈ O ₄ NNa (Glutamato)	1 g/l
MgSO ₄	0,5 g/l
CaCl ₂	0,023 g/l
MnSO ₄	0,038 g/l
ZnSO ₄	0,04 g/l

El medio 02130S enriquecido comprende, entre otras, los siguientes aditivos:

Aditivos	Concentración final
Solución de oligoelementos	1 ml/l
Solución de vitaminas	1 ml/l

Composición de la solución de oligoelementos

Ingredientes	Concentración final
CoCl ₂	0.5 g/l
Na ₂ MoO ₄	0.06 g/l
CuSO ₄	0.9 g/l

Composición de la solución de vitaminas

Ingredientes	Concentración final
D-biotina	0.05 g/l
Pantoteonato d calcio	1 g/l
Acido nicotínico	1 g/l
Mioinositol	25 g/l
Tiamina HCl	0.25 g/l
Piridoxol HCl	0.25 g/l
Acido p-aminobenzoico	0.05 g/l

Composición de la solución de sales minerales

Ingredientes	Concentración final
MgSO ₄	26.76 g/l
CaCl ₂	6.40 g/l
FeSO ₄	5.61 g/l
CoCl ₂	0.29 g/l
ZnSO ₄	7.72 g/l
Na ₂ MoO ₄	0.09 g/l
H ₃ BO ₃	0.34 g/l
MnCl ₂	0.47 g/l
CuSO ₄	0.61 g/l

Composición de la solución de FeSO₄

Ingredientes	Concentración final
FeSO ₄	0.9 g/l

Solución de amoniaco, 14%

Solución anti-espuma: Struktol J673 diluida en 1/10 (Schill+Seilacher AG, Moorfleeter Str. 28, 22113, Hamburg, Alemania)

2) Extracción de ADN genómico y análisis de mancha tipo Southern

5 a) Extracción de ADN genómico

El residuo celular obtenido a partir de un cultivo de 4 ml está colocado en suspensión en 0.5 ml de tampón sorbitol (0.9 M de sorbitol; 0.1 M de Tris-HCl, pH=8.0; 0.1 M de EDTA). 50 µl de Zymolase @ 20T (6 mg/ml) (Euromedex, 67458 Mundolsheim cedex, Francia), 50 µl de 2-mercaptoetanol de 0.28 M se
10 agregaron y la solución fue incubada por 1 hora a 37°C bajo agitación (180 rpm). La solución es sometida a centrifugación y el residuo está colocado en suspensión en 0.5 ml de tampón TE (50 mM de Tris-HCl, pH=8; 20 mM de EDTA). 50 µl de SDS 10% se agregan y la solución es mezclada por inversión e incubada 20 min a 65°C. 0.2 ml de acetato de potasio 5M se agregan,
15 después la solución es mezclada y guardada en hielo durante 30 min, y después centrifugada durante 5 min.

El sobrenadante es transferido en un tubo de 1.5 ml y después 0.8 ml de etanol 100%, preferiblemente refrigerado en hielo, se agregan. La solución es mezclada por inversiones y después centrifugada. Después de la eliminación
20 de sobrenadante, 0.4 ml de tampón TE que contiene 100 µg/ml de RNasa (Invitrogen, USA) se agregan a la solución y se incuba 1 hora a 37°C. Después se agrega 1 ml de etanol 100%, preferiblemente enfriado en hielo, la solución es delicadamente mezclada hasta la precipitación de ADN, después es centrifugada. El sobrenadante es eliminado y después el residuo de ADN es
25 secado a aire libre y después está colocada en suspensión en 100 µl de agua estéril y después incubada una noche a 4°C.

b) Digestión por la enzima HindIII

La concentración de ADN genómico es medida por determinación de la absorbencia de 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}). 1 µg de ADN genómico es
30 mezclado con agua estéril hasta un volumen final de 42.5 µl. 5 µl de tampón

(5x) y 2.5 µl de HindIII (50 u/µl)(Invitrogen, EUA) se agregaron y la solución es incubada a 37°C durante 4 horas.

c) Análisis de mancha tipo Southern

Las transferencias de mancha tipo Southern se llevan a cabo siguiendo los procedimientos del kit "DIG High Prime DNA Labeling and Detection" de la compañía Roche Diagnostic.

d) Procedimiento de marcación de sonda

La sonda correspondiente a la totalidad de genes que se codifica por la lipasa Lip2 es obtenida por PCR efectuado en ADN genómico con la ayuda de la enzima Phusion ADN Polimerasa (Finnzymes) y de dos siguientes principios:

Principio sentido: 5'-GTGTACACCTCTACCGAGACCTCT-3' (SEC ID NO:1)

Principio antisentido: 5'-TTAGATACACAGACACCCTCGGT-3' (SEC ID NO:

2)

Después de la reacción de PCR, la sonda es purificada en gel con la ayuda del kit "Nucleospin Extract II" (Macherey Nagel). La sonda purificada es enseguida marcada en frío (digoxigenina) con la ayuda del kit "DIG high primer DNA labeling" de Roche.

e) Separación en gel, transferencia de ADN y detección de señal

2 µg de ADN digerido por HindIII son mezclados con un tampón de carga y después se coloca en un gel de agarosa 0.8 %. La migración es efectuada a 50 V durante 2 h 30 y después el ADN es transferido en la membrana Hybond+ (Amersham Bioscience). El número de loci del gen Lip2 en ADN genómico es detectado gracias a la hibridación, en membranas, de la sonda marcada, seguido por la visualización de la exposición de rayos X.

3) Determinación de la concentración proteica

La concentración proteica es determinada por el método de Bradford. Las proteínas son cuantificadas con la ayuda del método de Bradford directamente en el sobrenadante del cultivo de fermentación. La cantidad de proteínas determinadas es comparada con las cantidades conocidas de lipasa Lip2 purificada. 20 µl de muestra estándar, de diluciones apropiadas, fueron

mezcladas en los tubos con 1 ml de reactivo diluido (5 veces) que contiene el colorante. DO595 es después determinado relativamente con DO595 obtenido por el control (colorante únicamente diluido).

4) Medida de la actividad específica de lipasa recombinante

La actividad de la lipasa es medida potenciométricamente a 37°C con la ayuda de un dispositivo pH-stat (RADIOMETRO). El sustrato utilizado es la trioctanoína. 10 mM de sustrato se colocaron en emulsión en 15 ml de tampón de reacción que contiene 1 mM de Tris-HCl (pH 5.5), 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ y 4 mM de taurodesoxicolato de sodio (SIGMA). Una unidad de actividad específica es definida como 1 µmol de ácido graso liberado por min y por mg de proteína.

4) Electroforesis en gel de poliacrilamida en condición desnaturalizada (SDS-PAGE)

12 µl de una muestra que comprende 25% de una mezcla que contiene SDS y agentes reductores son cargados en un gel tris 4-12% (Biorad). La migración es efectuada durante 45 min a 160 V.

El gel es enseguida analizado por coloración de azul de Coomassie.

5) Determinación por espectrometría de masa de tipo "Desorción-Ionización Láser Asistida por Cepa-Tiempos de Vuelo"(MALDITOF; Matriz-Assisted Desorption Ionization-Time of Flight) de la masa molecular de la lipasa Lip2 producida por el clon YL-LIP2-6C

Un análisis de espectrometría de masa de tipo desorción/ionización láser es efectuado utilizando una espectrometría de masa "Voyager Elite XL time of flight" de la compañía Perspectiva Biosystems (Framingham, MA) utilizada con un láser de azoto que emite 337 nm. El espectro de masa en modo positivo es obtenido utilizando un modo de extracción lineal y retardada con un potencial de aceleración de 25 kV, una tensión de barra de 0.3%, una tensión de guía de ión de 0.3% y un tiempo de retraso de 1000 ns por la proteína Lip2. Cada espectro es el resultado del promedio de 100 impulsiones láser. El material para analizar es mezclado con un volumen igual a una solución saturada de

ácido sinapínico (Fluka) preparado en una solución de 50% (v/v) de acetonitrilo/ácido trifluoroacético acuoso. Alícuotas de 2 µl de esta mezcla son colocadas en las placas de muestra de acero inoxidable y se secan al aire libre antes de efectuar el análisis. La calibración externa es efectuada con la ayuda de alfa quimiotripsinógeno A (Sigma). Los valores expresos son promedios y corresponden al ión [M+H]⁺.

EJMPLO 2-Construcción de vector de expresión de obtención de clon YL-LIP2-6C

La cepa YL-LIP2-6C es obtenida por transformación de una cepa de *Yarrowia lipolytica* PO1d, extraída de secuencias zeta por un vector de expresión, denominado JMP6, descrito en la Solicitud europea 1 108 043, y que comprende el gen LIP2 que es codificado por el precursor Lip2p de la lipasa Lip2 de *Yarrowia lipolytica* encima del cual se encuentra el promotor ACO2. El casete es enmarcado por las secuencias zeta, como se ha descrito anteriormente. La construcción del vector JMP6 y la transformación de la cepa PO1d se realizan de acuerdo con el mismo modo de operación que en la Solicitud europea 1 108 043. Esta cepa YL-LIP2-6C, comprende 5 loci diferentes de integración del casete de expresión del gen LIP2, registrado ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, bajo el número I-3542, el 15 de diciembre de 2005.

EJEMPLO 3-Producción de lipasa con la cepa YL-LIP2-6C y verificación de la estabilidad genética de YL-LIP2-6C

La cepa YL-LIP2-6C se utiliza en un método de producción de lipasa que comprende una etapa de pre-cultivo de fermentación adaptada a la producción de lipasa. El alcance global de este método es ilustrado en la Figura 1. La lipasa también producida en seguida ha sido analizada en término de actividad y la calidad. Por lo contrario, la estabilidad genética de YL-LIP2-6C es analizada por determinación del número de loci del casete de expresión del gen LIP2.

1) Método de producción

Pre-cultivos y fermentación

Una ampolla de solución-madre del clon YL-LIP2 en glicerol es descongelada y 5 μ l se utilizan en cultivo en 25 ml de medio 02130S enriquecido, que contiene 1% (v/v) de la solución de vitaminas y 1% (v/v) de la solución de oligoelementos, en una botella Erlen Meyer de 250 ml. El cultivo es incubado a 28°C durante 36 horas bajo agitación (180 rpm). El precultivo de 25 ml resultante (precultivo 1) es sembrado en 200 ml de medio 02130S enriquecido en un frasco Erlen Meyer de 2 litros y después el cultivo es incubado 36 horas a 28°C bajo agitación (180 rpm). El precultivo 2 obtenido de esta manera (225 ml) es sembrado en un medio 0213S enriquecido en un fermentador.

En el tiempo T_0 del método de fermentación, 2 ml de solución de $FeSO_4$ se agregan al cultivo. Las 6 a 9 horas, de 2 a 3 ml de la solución se agregan al cultivo en fermentación y después de 34 horas de fermentación (a T_{12}), se inicia el aporte de glucosa. La alimentación de glucosa es progresivamente aumentada durante 14 horas y después es interrumpida a T_{17} (que corresponde a 48 horas de fermentación) y la inducción por el ácido oleico es iniciada. La alimentación en ácido oleico es progresivamente aumentada durante las 54 horas siguientes, después T_{33} (102 horas de fermentación) una DO_{600} de 340 es alcanzada y el método de fermentación es recuperado y conservado a -20°C.

Monitoreo de cultivos

Durante la fermentación, la temperatura, la presión parcial en oxígeno y el pH se monitorean y se mantienen a 28°C, 20% y 6.2 respectivamente. Las 3 horas completas, una muestra de cultivo es retenida y DO_{600} es medido con el fin de seguir la evolución del nivel de crecimiento. Los resultados se indican en la figura 2. Dos extractos de 1 ml de las muestras son centrifugados 5 min a 14000 rpm y los residuos y sobrenadantes son conservados a -20°C. La Tabla I muestra el monitoreo del método de fermentación.

20 15 10 5

T	Tiempo de fermentación (horas)	DO600	Rango de crecimiento (h-1)	Vitaminas agregadas 2 ml cada 12H	Agitación (rpm)	PO2 (%)	pH	Otras acciones y observaciones	Temp. (°C)
T0	0,00	0,28		2 ml	300	98	6,21	2 mL F9SC4	28
T1	3,00	0,3	0,02299762		300	98	6,47		28
T2	6,00	0,32	0,02151284		300	98	6,51		28
T3	9,00	0,34	0,02020821		300	98	6,53		28
T4	12,00	0,4	0,05417288	2 ml	300	100	6,57		28
T5	15,00	0,5	0,07438118		300	98	6,2	ajuste de pH con ácido ortofosforico	28
T6	18,00	0,62	0,07170379		300	97	6,2		28
T7	21,00	0,92	0,1315514	2 ml	300	92,7	6,19		28
T8	24,00	1,54	0,17172134		300	80,9	6,2		28
T9	27,00	2,36	0,14229307		300	61,4	6,19		28
T10	30,00	3,99	0,1750432		300	20	6,19		28
T11	31,00	4,67	0,15736784		331	20	6,2	Problema con alimentación de glucosa	28
T12	34,00	9,97	0,25280717		382	20,6	6,2	Principio de alimentación de glucosa	28
T13	38,00	11,96	0,09089358	2 ml	378	17,6	6,2		28
T14	39,00	21,5	0,19549596		401	19,7	6,23		28
T15	42,00	37,2	0,18275194		424	18,9	6,2		28
T16	45,00	61	0,16485503		445	20	6,2		28
T17	48,00	70	0,04587378	2 ml	470	20	6,4	Acido oleico de inducción	28
T18	51,00	89	0,08004704		366	20	6,38		28
T19	54,00	93,66	0,0172265		409	20,3	6,17		28
T20	57,00	85	-0,03305102		535	19,5	6,19		28
T21	60,00	95	0,03707521	2 ml	615	20,2	6,21		28
T22	63,00	105	0,03336115		563	21,5	6,2		28
T23	66,00	129	0,06861735		563	20,4	6,2		28
T24	69,00	159	0,06969727		580	21,2	6,18		28
T25	72,00	178	0,03762645	2 ml	563	19	6,18		28
T26	75,00	210	0,05510799		565	19,5	6,2		28
T27	78,00	216	0,00939029		565	20	6,2		28
T28	80,00	235	0,04215355		590	20	6,2		28
T29	83,50	240	0,00601526	2 ml	610	20	6,2		28
T30	90,50	280	0,02202153		640	21	6,2		28
T31	94,00	310	0,02908077		637	18,5	6,19		28
T32	99,00	342	0,01964769		681	20	6,19		28
T33	100	340	-0,00566512		860	20	6,2		28

Tabla I. Monitores de método de fermentación

Purificación de lipasa

Opcionalmente, una etapa adicional de purificación de la lipasa es realizada.

La lipasa es separada del cultivo de un dispositivo de microfiltración tangencial en la membrana cerámica (piloto X6 de PALL) que permite la retención de levaduras de medida superior en umbral de corte ($0.1 \mu\text{m}$). El permeado que contiene lipasa es recuperado de antemano en modo de concentración, después en modo de diafiltración. Estas etapas se utilizan siguiendo las recomendaciones del fabricante con sus modificaciones apropiadas. La concentración en microorganismos contenidos en el permeado es enseguida reducida por filtración ($0.2 \mu\text{m}$)(Millipore) de manera que se obtiene una biocarga inferior a 10 cfu/ml. Con la ayuda del dispositivo Profux M12 (Millipore), la solución de lipasa es concentrada, hasta un volumen de aproximadamente 5 litros, se somete a una ultrafiltración tangencial utilizando una membrana Pellicon standard Biomax 10 kDa con el fin de eliminar los contaminantes de pesos moleculares escasos. El ultrafiltrado que no contiene lipasa es eliminado. La solución de lipasa es otra vez purificada por eliminación de microorganismos, como se indica anteriormente, de manera que se obtiene una biocarga inferior a 5 cfu/ml. La lipasa también purificada puede sufrir una liofilización.

3) Característica de lipasa recombinante por la cepa YL-LIP2-6C durante el método de fermentación

En cada punto de medida, una muestra de cultivo es sometida a centrifugación y el sobrenadante es analizado por SDS-PAGE. 75 μl de sobrenadante son mezclados con 75 μl de agua después son cargados en un gel de 26 pozos. Las muestras que contienen cantidades conocidas de lipasa Lip2 son igualmente analizadas. Los resultados son ilustrados en la Figura 4. Comparando la cantidad de lipasa obtenida para la fermentación (T33), el gradiente de cantidades conocidas de lipasa Lip2, la concentración de lipasa obtenida después de 100 horas de fermentación puede estimarse a 1.5 g/l.

Por el contrario, los inventores han utilizado en método de producción de lipasa de acuerdo con la invención para un volumen final de aproximadamente 35 litros, lo que permite la obtención de lipasa de acuerdo con un rendimiento situado entre 1 y 3 g por litro de sobrenadante de cultivo.

5 b) Determinación de la concentración proteica y estimación de rendimiento de producción de lipasa recombinante

La concentración proteica en el sobrenadante de cultivo es determinada como se indica en el ejemplo 1 (método de Bradford). Siete medidas independientes han sido efectuadas y la concentración de proteínas en el sobrenadante es de 2.3 g/l. La pureza de la proteína Lip2 en el sobrenadante es estimada por SDS-PAGE. Los resultados son ilustrados en la Figura 5. El nivel de pureza es estimado a aproximadamente 70%. El rendimiento resultante de producción de lipasa de la etapa de fermentación con el clon YL-LIP2-6C es de 1.6 g/l.

15 c) Medida de la actividad específica de lipasa recombinante producida por YL-LIP2-6C

La actividad específica de lipasa producida por el clon YL-LIP2-6C es medida de acuerdo a como se indica en el ejemplo 1. La muestra que corresponde al sobrenadante de fermentación es diluida 100 veces en un tampón que contiene 50 mM de Na₂HPO₄, 50 mM de KH₂PO₄, 150 mM de NaCl, pH 6.0. La actividad catalítica determinada a 37°C con trioctanoína en 3 experimentos independientes es de 21883.33 U/ml de sobrenadante (Tabla II).

25	Actividad lipasica (U/ml)				
	Ensayo				
	Muestra	20800.00	22750.00	22100.00	21883.33 992.89

30 Tabla II: medida de la actividad de muestras del sobrenadante de fermentación

Después de la concentración estimada de lipasa Lip2 en el sobrenadante (ver más arriba), la actividad específica de lipasa es de 13675 U/mg, en comparación con la actividad específica de lipasa producida por los estudios clínicos. La actividad específica de lipasa producida por el clon YL-LIP2-6C es conforme a las condiciones requeridas por los lotes clínicos.

d) Masa molecular de lipasa recombinante

El análisis de espectro de masa (ver ejemplo 1) se hace en el sobrenadante de cultivo de fermentación después de la centrifugación sin purificación. El resultado es ilustrado en la figura 6. El pico mayor observado revela una masa molecular de 37648 Da. La lipasa Lip2 producida por YL-LIP2-6C tiene una masa molecular correcta puesto que el valor observado es conforme a las condiciones requeridas por los lotes clínicos, es decir 37500 +/- 1000 Da.

Este ejemplo muestra la selección de un clon estable, YL-LIP2-6C (en especie, 100% de clones analizados después de 30 generaciones presentan el mismo número de Loci del gen LIP2 que el clon inicial). Entre otras, la estabilidad genética del clon no es afectada por las condiciones de cultivos utilizadas para la producción de lipasa (durante los pre-cultivos; justo antes de la fermentación).

3) Estabilidad genética del Clon YL-LIP2-6C

La estabilidad genética del clon YL-LIP2-6C durante el método de producción de lipasa, que comprende una etapa de precultivo y una etapa de fermentación, es analizada determinando el número de eventos de integración del casete de expresión del gen LIP2 con loci diferentes en ADN de *Yarrowia lipolytica*, en las colonias seleccionadas en T0, T17 y T33,

a) Selección de colonias

Una muestra del precultivo 2 (T0, iniciación de la fermentación), una muestra del cultivo en condición de fermentación en T17 (justo antes de la inducción) y en T33 (fin de la fermentación) son diluidas, en un primer tiempo hasta alcanzar un DO600=1, después son diluidas con 1/1000. 10 µl de

estas soluciones diluidas son colocadas en 3 placas de cultivo en el medio YPD. Las placas son enseguida incubadas a 28°C durante 48 horas y después se conservan a 4°C hasta la selección de las colonias para analizar el nombre de loci.

5 20 colonias derivadas de la muestra retenida en el punto de partida de la fermentación (T0), 20 colonias derivadas de la muestra retenida justo antes de la inducción (T17) y 100 colonias derivadas de la muestra retenida en el fin de la fermentación (T33) son sembradas por separado en 4 ml de medio 02130S enriquecido, y después se colocan en cultivo durante 72 horas. En
10 seguida, las sustancias guardadas en glicerol 30% se constituyen en la previsión de la extracción de ADN y el análisis por mancha tipo Southern (Materiales y Métodos).

c) Determinación del número de eventos de integración del gen LIP2 con loci diferentes para 140 colonias derivadas de la cepa YL-LIP2-6C

15 Los resultados del análisis de tipo Southern del número de eventos de integración con loci diferentes del gen LIP2 en 20 colonias retenidas en tiempo T0 (principio de fermentación), 20 colonias retenidas en tiempo T17 (48 horas de fermentación) y 100 colonias retenidas en el tiempo T33 (100 horas de fermentación) son ilustradas en la figura 3. Estos resultados
20 muestran que todas las colonias analizadas contienen 6 loci del gen LIP2. En la medida en donde la cepa salvaje contiene una copia del gen LIP5 endógeno, la cepa YL-LIP2-6C contienen 5 loci de integración del casete de expresión del gen LIP2. El clon YL-LIP2-6C es de esta manera 100% estable durante el método de fermentación de 100 horas.

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de lipasa recombinante, comprende:
 - a) una etapa en la cual se procede a poner en cultivo las células *Yarrowia lipolytica* transformadas por un vector que comprende un casete de expresión de una lipasa ácido-resistente de levadura, y
 - b) una etapa en la cual se recoge, en el sobrenadante de cultivo, la lipasa recombinante producida por las células anteriores,
 - c) el método es caracterizado porque la etapa a) de utilizar un medio de cultivo derivado de productos de origen animal o de mezclas no caracterizadas constituidas de materias proteicas de origen animal o de sus productos de digestión enzimática.
2. Método de producción de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de cultivo comprende:
 - como fuente de azoto, azoto mineral, y de preferencia sulfato de amonio;
 - una fuente de carbono seleccionada entre las fuentes de carbono de origen glucídico, los polialcoholes tales como glicerol, y las fuentes de carbono de origen lipídico tales como ácidos grasos y acilglicerol; y
 - sales minerales, oligoelementos y vitaminas.
3. Método de producción de acuerdo con la reivindicación en donde la reivindicación 2, caracterizada porque la etapa a comprende:
 - a1) el pre-cultivo de células transformadas de *Yarrowia lipolytica* en un medio que contiene una fuente de carbono de origen glucídico;
 - a2) una etapa de fermentación que comprende una fase de crecimiento celular en un medio que contiene una fuente de carbono de origen glucídico y una fase de producción de lipasa en un medio que contiene como una sola fuente carbono en ácido graso entre los triglicéridos de cadena corta, media o larga.
4. Método de producción de acuerdo con la reivindicación 3,

caracterizado porque la fermentación es ventajosamente utilizado con un pO₂ constante comprendido entre 15% y 25% y un pH de preferencia inferior a 6.5.

5 5. Método de producción de acuerdo con la reivindicación 3 en donde la reivindicación 4, caracterizado porque la etapa a1) de pre-cultivo es realizada hasta obtenerse un valor de DO_{600nm} comprende entre 3 y 10 por 1 ml, y porque la etapa a2) de fermentación, la fase anterior de producción de lipasa es iniciada cuando DO_{600nm} del cultivo alcanza un valor que comprende entre 60 y 80 por 1 ml.

10 6. Método de producción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la etapa b) en la cual se recoge la lipasa es realizada cuando DO_{600nm} alcanza un valor entre 300 y 350 por 1 ml.

7. Método de producción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la etapa b) comprende:

- 15 b1) la separación de lipasa del sobrenadante de cultivo, y
b2) la purificación de lipasa obtenida en b1.

20 8. Método de producción de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque la separación es efectuada por una técnica elegida entre la filtración tangencial en fibra honda, la filtración frontal y la centrifugación continua o discontinua, y la purificación es efectuada por una técnica elegida entre la filtración, la precipitación fraccionada, la cromatografía por gel-filtración.

25 9. Método de producción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la etapa a) consiste de poner en el cultivo del clon denominado YL-LIP2-6C, registrado ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, por sus siglas en Francés), 28 rue de Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, bajo el número I-3542, el 15 de diciembre de 2005.

10 10. Preparación de lipasa recombinante ácido-resistente de levadura, caracterizada porque es susceptible de obtenerse por un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9.

30 11. Preparación de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada

porque una actividad catalítica de pH6 de al menos 15000 unidades por ml de sobrenadante de cultivo, de preferencia superior a 20000 unidades por ml de sobrenadante de cultivo, una unidad que corresponde a la cantidad de enzima capaz de catalizar la liberación de 1 μ mol de ácido graso por minuto puesto que
5 el sustrato utilizado es la trioctanoína, y/o que la concentración de la lipasa en la preparación es superior a 1 g d lipasa por litro.

12. Uso de una preparación de lipasa de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11 por la obtención de un medicamento destinado al tratamiento de un síndrome de mala absorción de grasas, ligado a
10 una insuficiencia pancreática.

13. La célula de *Yarrowia lipolytica* transformada por un vector que comprende un casete de expresión de una lipasa extracelular ácido-resistente de levadura, caracterizada porque se trata de un clon denominado YL-LIP2-6C, registrado ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos
15 (C.N.C.M.) bajo el número I-3542, el 15 de diciembre de 2005.

14. El uso de la célula de acuerdo con la reivindicación 13 para la producción de lipasa ácido-resistente de levadura.

15. Medicamento, caracterizado porque comprende una preparación de lipasa de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11.

RESUMEN

Método de producción de una lipasa recombinante ácido-resistente de *Yarrowia lipolytica* utilizando un medio de cultivo sin cualquier producto de origen animal o mezclas no caracterizadas como la triptona, peptona o lactosuero, así como sus aplicaciones. La cepa recombinante de *Yarrowia lipolytica* que produce una cantidad excesiva de lipasa Lip2, referida como a YL-LIP2-6C y depositada con la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (C.N.C.M.) bajo el número I-3542, el 15 de Diciembre de 2005, y sus usos.

F 269 - 39 PCT listado.ST25
LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER
LEBLOND, Yves
MOUZ, Nicolas
- <120> METODO PARA PRODUCIR LIPASA, CELULA DE Yarrowia lipolytica
YARROWIA LIPOLYTICA TRANSFORMADA CAPAZ DE t leurs applications.
PRODUCIR LA LIPASA Y SUS USOS
- <130> F269Cas39PCT
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> principio sentido
- <400> 1
gtgtacacct ctaccgagac ctct 24
- <210> 2
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> principio antisentido
- <400> 2
ttagatacca cagacaccct cggt 24

1/3

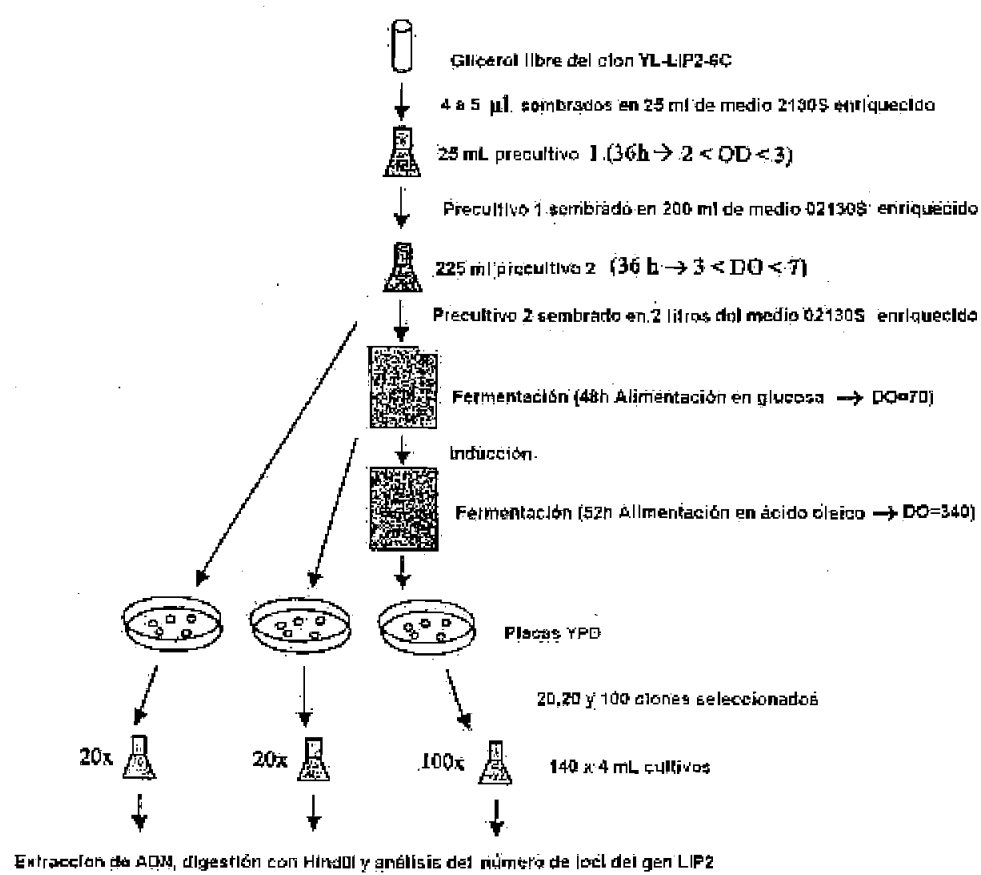


Fig. 1

2/3

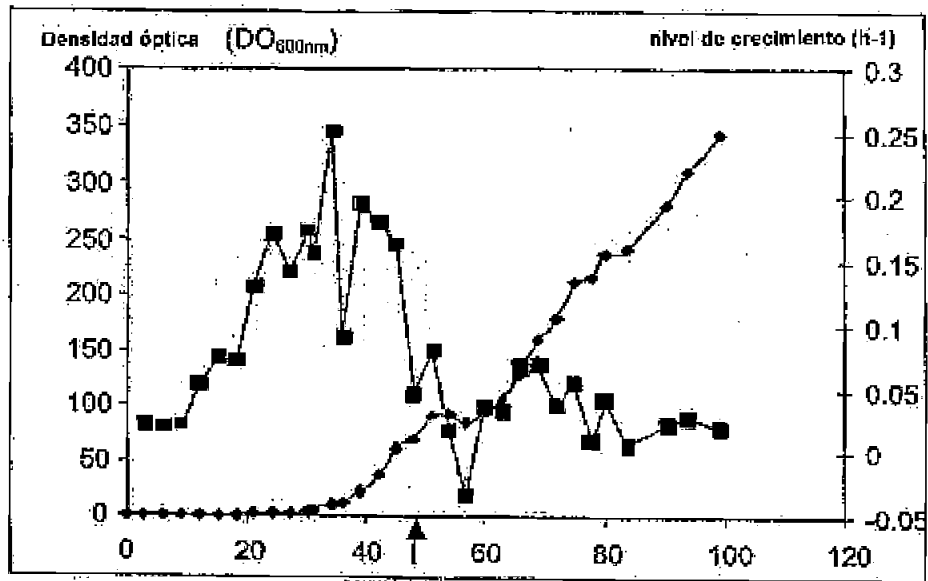


Fig. 2

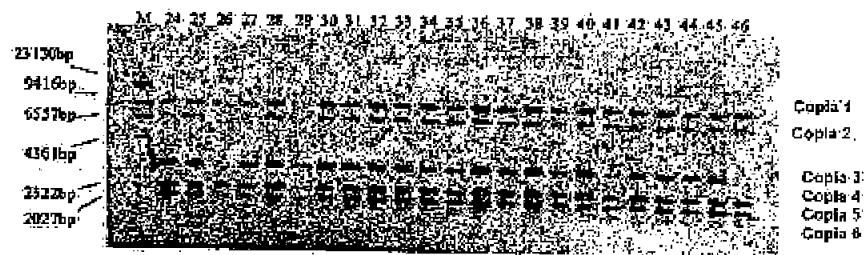


Fig. 3

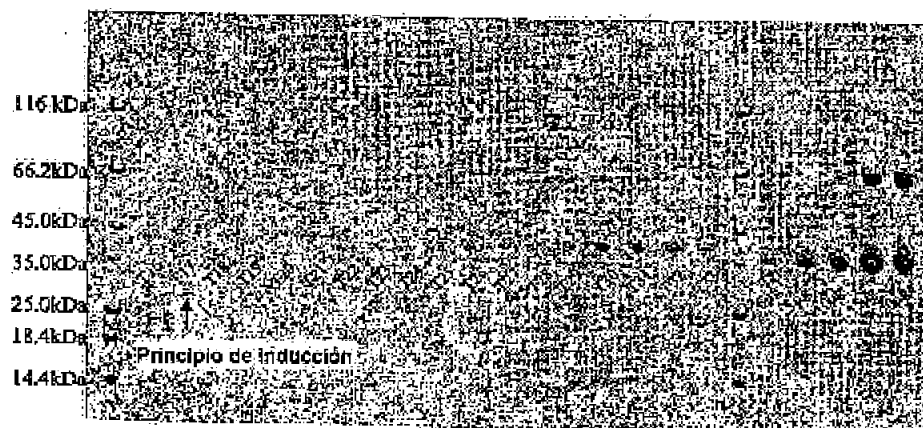


Fig. 4

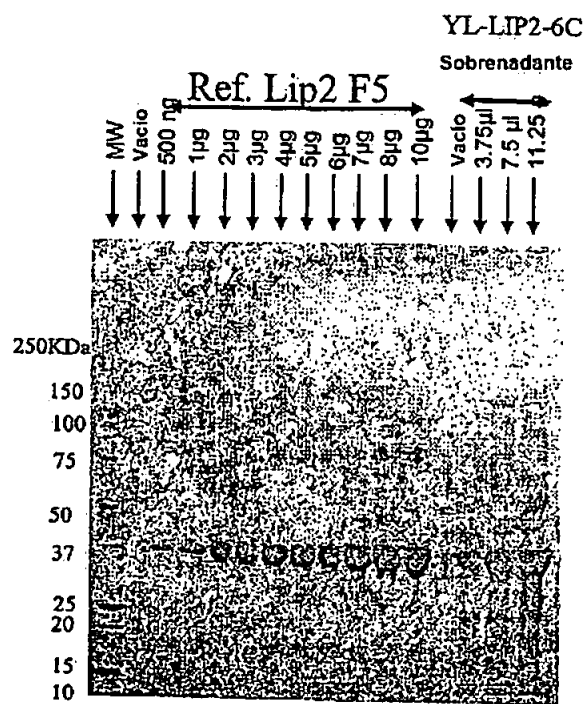


Fig. 5

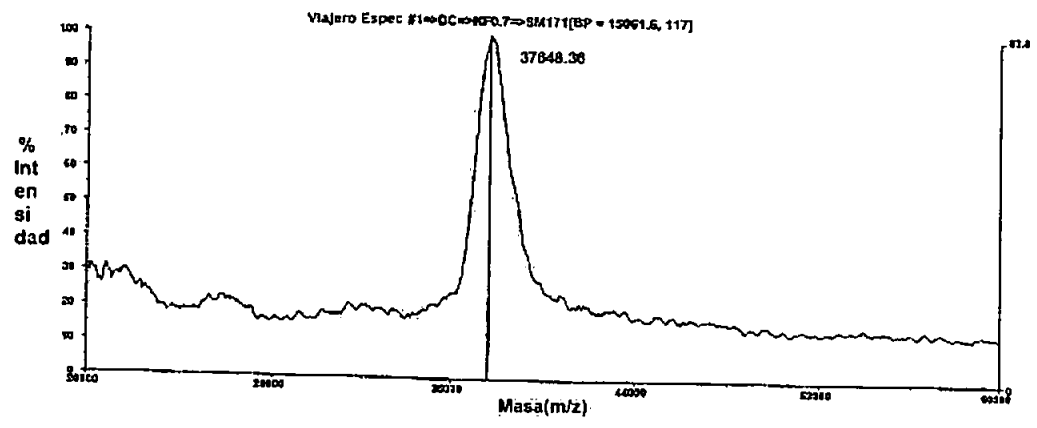


Fig. 6



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ☐ **PCT** ☒ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **DISEÑO INDUSTRIAL** ☐

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) **LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER**

(72) Inventor(es) **YVES LEBLOND, NICOLAS MOUZ**

(74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad

32) Fecha

(33) Pais

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 21/12/2007

Fecha de presentación de la solicitud: 15/06/2006

N° publicación: WO 2007/144475 A1

No. de solicitud PCT/FR2006/001352

(54) Título: **METODO PARA PRODUCIR LIPASA, CELULA DE YARROWIA LIPOLYTICA TRANSFORMADA CAPAZ DE PRODUCIR LA LIPASA Y SUS USOS**

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTELLANOS ABONDANO MARGARITA

REFERENCIA	Radicación No.	8 134632
	Solicitud internacional	pct/fr2006/001352
	Fecha inicio fase nacional	15/01/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1049

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 el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. 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, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

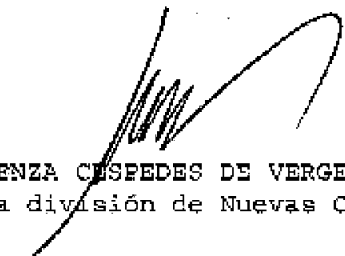
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud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

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 134632



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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____
jfernand

30 ENE 2009