

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



PCT

SOLICITUD DE
PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. **08-134632**

54. TITULO: METODO PARA PRODUCIR LIPASA, CELULA DE
YARROWIA LIPOLYTICA TRANSFORMADA CAPAZ DE
PRODUCIR LA LIPASA Y SUS USOS

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C12N 9/20, C07K 14/39,
A61K 38/46, C12P 21/02

71. SOLICITANTE: LABORATORIES MAYOLY SPINDLER

DOMICILIO: 6, avenue de l'Europe, 78400 Chatou -
FRANCIA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., 18 DIC. 2008



No. 08-134632- -00000-0000

Fecha: 2008-12-18 14:34:53 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTE CIVIL Eje. 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Fojos. 72

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRÁMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ()	(X)	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	(X)	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	()
- Descripción de la invención	(X)	()
- Dibujos de ser estos pertinentes	(X)	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	(X)	()

COMPLETA (X) 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 ()

EZQUEMA DE TRAZADO ()

- 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 del Esquema de Trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma responsable:

Sandra Rodríguez

Fecha:

D.C. - 18. 2008



No. 08-134632-00000-0000

Fecha: 2008-12-18 14:34:53 Dep. 2020 NUESTRACIÓN
Trá. 11 PATENTE/II Cva. 378 - NASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACIÓN Folios: 72

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

15 ene 2009

SOLICITUD DE PATENTE EN COLOMBIA

①

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☒ Capítulo I☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)Nombre: **LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER**Dirección: **6, avenue de l'Europe
78400 Chatou - FRANCIA**Domicilio: **Chatou - FRANCIA**Lugar de Constitución: **FRANCIA**

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO (74)**Nombre: **MARGARITA CASTELLANOS A.**Dirección: **CALLE 94A No. 7A-09**Teléfono: **610 7420** Fax: **610 0706**E-mail: **info@castellanosyco.com****IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número **39'779.654** TPA **70,819****INVENTOR (ES) (72)****YVES LEBLOND****6 rue d'Artois
F-78630 Orgeval
FRANCIA****NICOLAS MOUZ** (Ver pto 79
Maubourg Au Merle - Nuevas invenciones)
**F-38760 St Paul de Varces
FRANCIA**

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/FR2006/061352

Fecha

15/06/2006

Publicación Internacional No.

WO 2007/144475 A1

Fecha

21/12/2007

⑥

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

⑦

Clasificación Internacional (51)

C12N 9/20; C07K 14/39; A61K 38/46; C12P 21/02

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☐NO ☒

⑨

Comprobante de pago No.

08-97.972

Fecha

Diciembre 17 de 2008

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

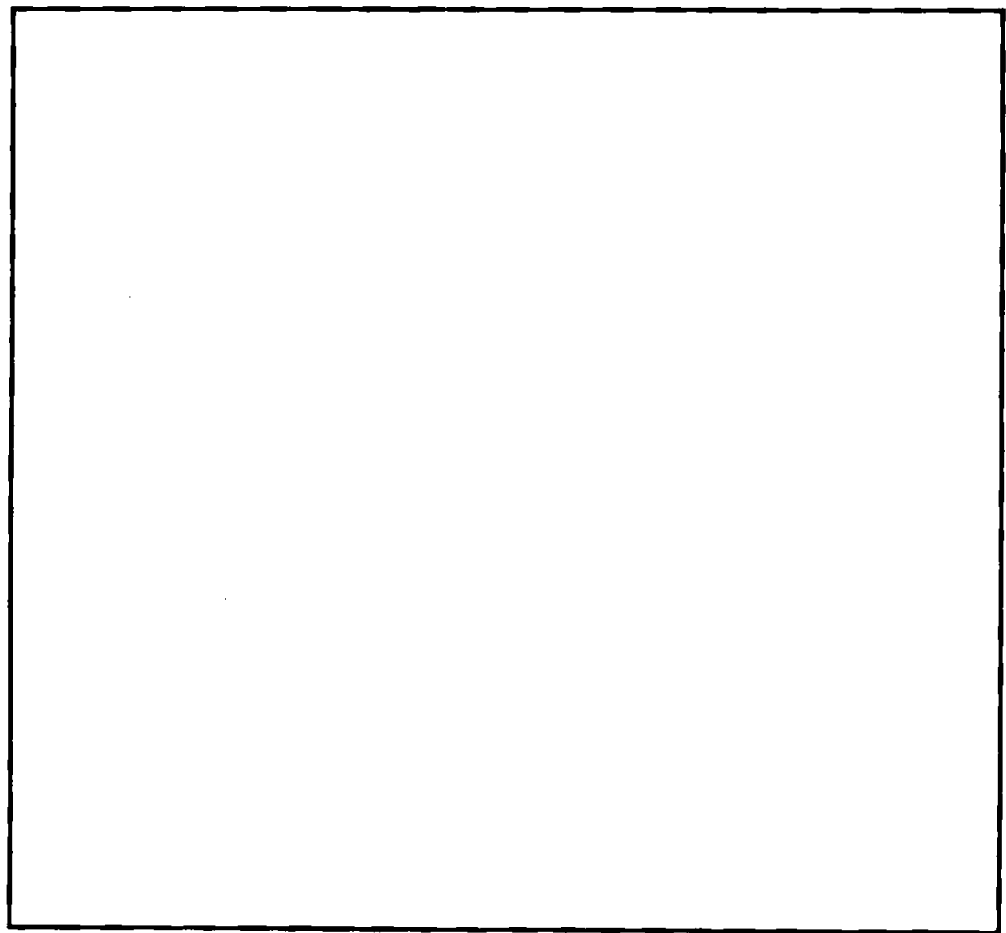
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ 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 internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional 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.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros Tarjeta Propietario y Extracto para la Publicación

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA: Margarita Castellanos
C.C. No. 39'779.654 Usaquéen - TPA 70.819 C.S.J.

1 de Dic. 2008

P1677³

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 97,972
FECHA : DICIEMBRE 17 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-134632-00000-0000

Fecha 2008-12-18 14:34:53 Dep 2020 NUECREACION
Tra 11 PATENTE/II Evt 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Fojos. 72

===== CONSIGNACION =====

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	81249453	17/12/2008	7,699,000.00

===== CONCEPTO =====

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 décembre 2007 (21.12.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/144475 A1

(51) Classification internationale des brevets :

C12N 9/20 (2006.01) C12N 1/16 (2006.01)
C07K 14/39 (2006.01) A61K 38/46 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2006/001352

(22) Date de dépôt international : 15 juin 2006 (15.06.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LABO-
RATOIRES MAYOLY SPINDLER [FR/FR]: 6, Avenue
de L'Europe, F-78400 Chailou (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
IEBLOND, Yves [FR/FR]: 6 rue d'Artois, F-78630
Orgeval (FR), MOUZ, Nicolas [FR/FR]: Maubourg Au
Merle, F-38760 St Paul de Varces (FR).

(74) Mandataire : CABINET ORES: 36 Rue de St Péters-
bourg, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BR, 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, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, 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, LV, 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
- avec la partie réservée au listage des séquences de la des-
cription publiée séparément sous forme électronique et dis-
ponible sur demande auprès du Bureau international

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: METHOD FOR PRODUCING LIPASE, TRANSFORMED YARROWIA LIPOLYTICA CELL CAPABLE OF PRO-
DUCING SAID LIPASE AND THEIR USES

(54) Titre : PROCEDE DE PRODUCTION DE LIPASE, CELLULE DE YARROWIA LIPOLYTICA TRANSFORMEE APTÉ A
PRODUIRE LA DITE LIPASE ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: Method for producing *Yarrowia lipolytica* acid-resistant recombinant lipase utilizing a culture medium without any
products of animal origin or non-characterized mixtures such as tryptone, peptone or lactoserum, in addition to its uses. Recombinant
strain of *Yarrow lipolytica* producing an excessive amount of lipase Lip₂ referred to as YL-LIP2-6C and filed with the Collection
Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.) under number I 3542, on December 15 2005 and its uses.

(57) Abrégé : Procédé de production d'une lipase recombinante acido-résistante de *Yarrowia lipolytica* mettant en œuvre un milieu
de culture dépourvu de produits d'origine animale ou de mélanges non caractérisés comme le tryptone, le peptone ou le lactosérum,
ainsi que ses applications. Souche recombinante de *Yarrowia lipolytica* surproductrice de lipase Lip₂, dénommée YL-LIP2-6C et
déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.) sous le numéro I 3542, le 15 décembre 2005
et ses applications.

WO 2007/144475 A1

Procédé de production de lipase, cellule de *Yarrowia lipolytica* transformée apte à produire ladite lipase et leurs applications.

La présente invention est relative à un procédé de production de lipase mettant en œuvre des cellules de levure *Yarrowia lipolytica*, productrices d'une lipase recombinante acido-résistante, lequel procédé permet l'obtention d'une lipase apte à être mise en œuvre comme médicament ; la présente invention est également relative à une souche de *Yarrowia lipolytica* surproductrice de lipase recombinante acido-résistante et à ses applications.

Les aliments ingérés quotidiennement par l'homme sont constitués essentiellement de lipides, de protéines et de sucres. Tous ces constituants subissent, avant leur absorption, une hydrolyse catalysée par les enzymes du tractus digestif. Un déficit en l'une ou l'autre de ces enzymes peut donc entraîner des troubles digestifs, et conduire à une malnutrition importante. C'est par exemple le cas dans certaines situations pathologiques, comme la mucoviscidose ou l'insuffisance pancréatique exocrine, auxquelles est associé un déficit en lipase pancréatique. Il est classiquement proposé pour corriger ce déficit, d'administrer par voie orale des extraits pancréatiques. Toutefois l'efficacité de cette thérapeutique est limitée par le fait que les enzymes contenues dans ces extraits (lipases, amylases et protéases) sont rapidement inactivées par l'acidité du milieu gastrique.

Il a donc été proposé d'utiliser des préparations de lipases qui résistent aux conditions gastriques, telles que par exemple des préparations de lipase gastrique de mammifères produites par génie génétique, comme celle décrite dans la Demande de Brevet Français publiée sous le numéro 2 699 179, au nom de l'INSTITUT DE RECHERCHE JOUVENIAL SA ou des préparations de lipases de microorganismes possédant une activité correcte en milieu acide [ZENTLER-MONRO *et al.*, *Pancreas*, 7, 311-319 (1992)].

Parmi les lipases de microorganismes actives en milieu acide, on citera en particulier des lipases fongiques, telles que celles de *Candida ernobii*, [YOSHIDA *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 154, 586-588, (1968)], de *Trichosporon asteroides* [DHARMSTHITI *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 26, 111-116 (1997)], de *Rhizopus javanicus* [(UYTTENBROECK *et al.*, *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 374, 245-254, (1993)], ou de *Yarrowia lipolytica* [HADEBALL, *Acta Biotechnol.*, 2, 159-

167 (1991); NOVOTNY *et al.*, J. Basic Microbiol., 28, 221-227 (1988)]. Outre leur activité à pH acide, ces lipases présentent les caractéristiques communes d'être résistantes, en présence de leur substrat, à la digestion par les protéases (trypsine, chymotrypsine et pepsine), et d'être résistantes à l'action des sels biliaires (leur activité est
5 conservée en présence de 10 mM de taurocholate de sodium).

L'utilisation de *Yarrowia lipolytica* pour la production d'un gène d'intérêt a déjà été décrite. Ainsi, la Demande EP 1 108 043, aux noms de l'INRA et du CNRS, décrit l'utilisation d'un vecteur intégratif, comprenant une cassette d'expression d'un gène d'intérêt et des séquences zêta, correspondant aux séquences
10 LTR du rétrotransposon Ylt de *Yarrowia lipolytica*. Un tel vecteur d'expression permet l'intégration non homologue et dispersée de plusieurs copies de l'insert d'intérêt dans l'ADN génomique d'une souche de *Yarrowia lipolytica* dépourvue de séquences zêta. Ce système a notamment été utilisé pour l'intégration du gène *LIP2*, codant pour une lipase, dans l'ADN de *Yarrowia lipolytica* et a permis, dans des conditions de culture
15 qui ne sont pas détaillées, une sécrétion de lipase 10 à 15 fois supérieure à celle des souches non transformées.

D'autres études décrivent l'utilisation du même vecteur d'expression que celui décrit dans la Demande de Brevet EP 1 108 043, pour la production d'une lipase recombinante chez *Yarrowia lipolytica* (Demande Internationale WO 01/83773 ;
20 PIGNEDE *et al.*, Journal of Bacteriology, Vol 182, No.10, p.2802-2810 (2000) et PIGNEDE *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No.8, p3283-3289 (2000)). Ainsi :

- la Demande Internationale WO 01/83773, au nom des Laboratoires MAYOLY SPINDLER, décrit l'obtention du clone de *Yarrowia lipolytica* MS4
25 (CNCM 1-2294), comprenant 10 copies de la cassette d'expression du gène *LIP2* intégrées dans son ADN, ainsi que son utilisation pour la production de lipase avec un rendement de l'ordre de 0,5 g de lipase par litre de surnageant de culture, et une activité catalytique de 12 000 U/ml, mesurée en utilisant l'huile d'olive comme substrat, une Unité correspondant à la quantité d'enzyme capable de catalyser la
30 libération de 1 μ mole d'acide gras par minute, c'est-à-dire 200 fois plus que la souche initiale. Cependant, le procédé de production de lipase décrit dans cette Demande présente un inconvénient majeur, puisque il met en œuvre des milieux de culture

7

contenant du bactopectone ou du bactotryptone. Ces produits, qui ne sont pas caractérisés et qui contiennent divers hydrolysats protéiques, sont classiquement utilisés comme source d'azote et de carbone. En conséquence, le procédé décrit dans cette Demande ne permet pas d'obtenir une lipase directement utilisable comme médicament.

- PIGNEDE *et al.* (Journal of Bacteriology, 2000) ont plus particulièrement caractérisé la lipase extracellulaire codée par le gène *LIP2* de *Yarrowia lipolytica* (souche PO1d). Dans cet article sont ainsi étudiées :

- la sécrétion de la lipase à partir de différentes souches sauvages (PO1d dans laquelle *Ylt1* est absent et E150, dans laquelle *Ylt1* est présent) et de différentes souches recombinantes dont JMY184 (PO1d-6-15) et JMY279 (PO1d-6-17) ainsi que
- la surproduction de lipase notamment par le transformant JMY184.

Cet article de PIGNEDE *et al.* compare la production de lipase par des souches sauvages, des souches mutantes et des souches recombinantes obtenues selon le procédé décrit plus haut (Demande Internationale WO 01/83773). Les souches sauvages sécrètent entre 30 et 50 U de lipase/ml alors que des souches mutantes, obtenues par l'action du N-méthyl-N'nitro-N-nitrosoguanidine (NNNG), produisent 25 fois plus de lipase, c'est-à-dire 1 200 U/ml dans des conditions de culture optimisées faisant intervenir un milieu contenant du peptone (milieu de préculture) et un milieu contenant du lactosérum (milieu de fermentation) (voir également DESTAIN *et al.*, 1997). Les souches recombinantes sont obtenues à l'aide de la construction comprenant le gène *LIP2* régulé par le promoteur POX2 et par l'intégration non homologue, en multicopies et de façon dispersée, de cette cassette d'expression. PIGNEDE *et al.* ont obtenu des transformants stables (par exemple la souche JMY184) qui produisent 2 000 U/ml dans des conditions non optimisées, c'est-à-dire en milieu YPDH (comprenant 10g/l d'extrait de levure, 10g/l de bactopectone, 10g/l de glucose et 10g/l d'huile d'olive) correspondant à environ 0,5 g de lipase/l de surnageant. De la même manière que précédemment, les préparations de lipase décrites par PIGNEDE *et al.* et par DESTAIN *et al.*, sont impropres, en tant que telles, à un usage médical et plus particulièrement à la constitution de lots cliniques, puisque leur production nécessite l'utilisation de milieux de culture contenant des peptones ou du lactosérum.

- Poursuivant ses travaux, l'équipe de PIGNEDE (Applied and Environmental Microbiology, 2000) a étudié des souches de *Yarrowia lipolytica* transformées par un vecteur comprenant une cassette d'expression du gène *LIP2*. Les Auteurs ont déterminé que pour 8 de ces transformants, le nombre de copies de la cassette d'expression du gène *LIP2* est compris entre 6 et 16 (10 copies en moyenne), ce qui se traduit par 2 à 15 événements d'intégration de ladite cassette à des loci différents. La souche JMY184 comprend ainsi 12 copies de la cassette d'expression du gène *LIP2*, intégrées à 4 loci différents. Les Auteurs ont par ailleurs plus précisément étudié ce transformant JMY184. Ils confirment que la souche JMY184 produit 0,5 g de lipase/l de surnageant avec une activité de 1 500 U/ml sur milieu riche YPDH (qui contient du bactopeptone) (contre 50 U/ml pour une souche sauvage PO1d), mesurée en utilisant l'huile d'olive comme substrat. Ces valeurs permettent de déduire une activité spécifique d'environ 3 000 U/mg de lipase. Les Auteurs annoncent en outre que la production optimisée de lipase en fermenteur par la souche JMY184 permet d'obtenir des préparations ayant une activité jusqu'à 10 000 U/ml. Cependant les conditions de culture qui ont permis ce résultat ne sont pas divulguées. Dans cet article, les Auteurs ont en outre étudié la stabilité en culture de ces transformants, et notamment du clone JMY184, et ont montré leur stabilité pendant 120 générations. PIGNEDE *et al.* ont considéré que pour optimiser la production de lipase, les facteurs à prendre en compte sont la stabilité des transformants et les conditions de culture.

Par ailleurs, ils ont montré qu'il existe une forte corrélation entre le nombre de copies du gène *LIP2* intégrées et la surproduction de lipase.

Cependant, pour la production de lipase, les seuls milieux de culture envisagés dans cet article sont des milieux qui contiennent des peptones, tels que le milieu riche YPDH.

Les procédés de production de lipase de l'art antérieur, même s'ils permettent d'obtenir des rendements améliorés en lipase, ne sont pas adaptés à la production d'une lipase apte à être utilisée à des fins médicales.

En effet, les milieux de culture habituellement mis en œuvre contiennent tous des mélanges non caractérisés et/ou des produits d'origine animale, tels que des peptones, des tryptones ou du lactosérum. Il existe donc un besoin de

développer un système permettant la production de préparations de lipase recombinante adaptée à un usage médical.

Pour résoudre ce problème, les Inventeurs ont mis au point un procédé de production de lipase qui répond mieux à ces besoins que les procédés de production de l'art antérieur. Plus précisément, les Inventeurs ont mis au point un procédé de production de lipase dans lequel le milieu de culture mis en œuvre est dépourvu des produits précités, c'est-à-dire qu'il ne contient aucun produit d'origine animale ni aucun mélange non caractérisé, tel que le peptone, le tryptone ou le lactosérum. Les Inventeurs ont en outre sélectionné une nouvelle souche de *Yarrowia lipolytica* recombinante productrice de la lipase Lip2, qui, associée audit procédé, permet en outre d'augmenter de manière significative, le rendement en lipase produite.

La présente invention a donc pour objet un procédé de production de lipase, mettant en œuvre une souche de *Yarrowia lipolytica* transformée par un vecteur comprenant une cassette d'expression d'une lipase acido-résistante de levure, caractérisé en ce que le milieu de culture utilisé ne contient pas de produits d'origine animale ni de mélanges non caractérisés, tel que le peptone, le tryptone ou le lactosérum.

Plus précisément, la présente invention a pour objet un procédé de production de lipase, comprenant :

a) une étape de mise en culture de cellules de *Yarrowia lipolytica* transformées par un vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression d'une lipase acido-résistante de levure, dans des conditions permettant la production de lipase ;

b) une étape de récupération, dans le surnageant de ladite culture, de la lipase ainsi produite ;

lequel procédé est caractérisé en ce que l'étape a) de mise en culture est mise en œuvre dans un milieu de culture dépourvu de produits d'origine animale ou de mélanges non caractérisés constitués de matières protéiques d'origine animale (lactosérum par exemple) ou de leurs produits de digestion enzymatique (tryptone, ou peptone par exemple).

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit milieu de culture selon l'étape a) comprend :

- comme source d'azote, de l'azote minéral, et de préférence du sulfate d'ammonium ;

- une source de carbone sélectionnée parmi les sources de carbone d'origine glucidique, les polyalcools tel que le glycérol, et les sources de carbone d'origine lipidique tels que des acides gras et des acylglycérols ; et
- 5 - des sels minéraux, des oligoéléments et des vitamines ;

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, l'étape a) comprend :

- a1) une étape de pré-culture des cellules transformées de *Yarrowia lipolytica* telles que définies ci-dessus dans un milieu contenant une source de carbone d'origine glucidique ; et
- 10

- a2) une étape de la fermentation desdites cellules comprenant une phase de croissance cellulaire dans un milieu contenant une source de carbone d'origine glucidique et une phase de synthèse de la lipase dans un milieu contenant comme seule source de carbone un acide gras choisi parmi les triglycérides à chaîne courte, moyenne ou longue. Ainsi, la fermentation est mise en œuvre dans un premier temps de façon à permettre la croissance cellulaire, par exemple en présence d'une source de carbone d'origine glucidique, et dans un deuxième temps dans des conditions permettant la biosynthèse de ladite lipase, par exemple en présence, comme
- 15
- seule source de carbone, d'un inducteur chimique de type acide gras, tel qu'un triglycéride à chaîne courte (tel que la tributyrine), moyenne (telle que la trioctanoïne ou trioctanoylglycérol) ou longue (tel que l'huile d'olive ou trioléine).
- 20

La fermentation est avantageusement mise en œuvre avec une pO₂ constante comprise entre 15 % et 25 % et un pH de préférence inférieur à 6,5. La fermentation peut par exemple être mise en œuvre avec un débit d'air d'environ 1 vvm, une unité vvm étant 1 volume d'air par volume de liquide par minute (par exemple pour un fermenteur de 30 litres, 1 vvm est égal à 30 l/min et pour un fermenteur de 5 litres, 1 vvm est égal à 5 l/min).

25

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, l'étape a1) de pré-culture est réalisée jusqu'à atteindre une valeur de DO_{600nm} comprise entre 3 et 10 pour 1 ml, et à l'étape a2) de fermentation, ladite phase de synthèse de

30

lipase est initiée lorsque la DO_{600nm} de la culture atteint une valeur comprise entre 60 et 70 pour 1 ml.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, l'étape b) est initiée lorsque la DO_{600nm} atteint une valeur comprise entre 300 et

5 350 par ml. L'étape b) peut en outre comprendre :

b1) la séparation de la lipase dudit surnageant de culture ;

b2) la purification de la lipase obtenue en b1).

Ces deux étapes sont réalisées par des techniques classiques connues en elles-mêmes : séparation physique (filtration, chromatographie, centrifugation) ou
10 physico-chimique (précipitation).

La séparation de la lipase du surnageant peut être mise en œuvre par l'homme du métier par exemple par une technique choisie parmi la filtration tangentielle en fibre creuse, la filtration frontale et la centrifugation continue ou discontinue.

La purification de la lipase consiste notamment à réduire la
15 biocharge, c'est-à-dire la présence de microorganismes, et peut être mise en œuvre par toute technique de purification adéquate connue de l'homme du métier, telle qu'une technique choisie parmi la filtration, la précipitation fractionnée, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'interactions hydrophobes et la chromatographie par gel-filtration.

20 Optionnellement, le procédé de production de lipase selon l'invention peut également comprendre une étape de concentration, ou enrichissement, consistant en l'augmentation de la concentration en lipase dans la préparation. Une telle étape peut être mise en œuvre par exemple après l'étape de purification. Elle peut également avoir lieu simultanément à cette étape de purification.

25 Le procédé de production selon l'invention permet notamment de produire la lipase recombinante en quantités situées entre environ 1 à 3 g de lipase purifiée par litre de surnageant de culture. De manière particulièrement avantageuse, le procédé selon l'invention permet l'obtention d'une préparation de lipase recombinante avec une activité catalytique supérieure à 15000 U par ml de surnageant de culture. De
30 manière préférée, ladite préparation possède une activité supérieure à 20000 U/ml de surnageant de culture. Ces valeurs sont déterminées à pH 6, en utilisant la trioctanoïne comme substrat. Cette valeur d'activité de la préparation de lipase revêt un intérêt tout

particulier dans le cadre du développement de produits pharmaceutiques. Il est en effet maintenant envisageable d'administrer des doses réduites de lipase, produite par le procédé selon l'invention, tout en gardant une efficacité suffisante pour obtenir l'effet thérapeutique désiré, qui peut être par exemple la correction d'une malabsorption de graisse liée à une insuffisance pancréatique associée à un déficit en lipase.

Le fait de pouvoir désormais produire la lipase Lip2 en utilisant des souches de *Yarrowia lipolytica* recombinantes sans faire appel à des produits d'origine animale, comme c'est le cas avec le procédé selon l'invention, constitue un avantage considérable et facilite grandement l'utilisation de la lipase à des fins médicales.

Le vecteur d'expression utilisé pour obtenir les cellules de *Yarrowia lipolytica* recombinantes utilisées dans le procédé de la présente invention est un vecteur intégratif possédant au moins une copie du gène *LIP2* et des éléments de régulation de l'expression. Ce vecteur peut être alors intégré soit dans l'ADN plasmidique soit dans l'ADN génomique de la levure. Un exemple de vecteur intégratif particulièrement préféré est le vecteur JMP6 ou le vecteur JMP10 tels que décrits dans la Demande Internationale WO01/83773. Le vecteur JMP6 comprend une cassette d'expression du gène *LIP2*, codant pour le précurseur Lip2p de la lipase Lip2 de *Yarrowia lipolytica*, en amont duquel est placé le promoteur de l'acyl CoA oxydase ACO2 de *Yarrowia lipolytica*, dénommé POX2. Le vecteur JMP10 comprend également le gène *LIP2*, en amont duquel se trouve le promoteur de la lipase Lip2 de *Yarrowia lipolytica*. Ces deux promoteurs sont inductibles par les triglycérides et les acides gras. Dans chacun de ces vecteurs, la cassette d'expression et le promoteur sont placés entre des séquences zêta comme décrit plus haut. L'intégration peut être ciblée, c'est-à-dire dirigée sur des sites, ou bien aléatoire. Ainsi, lorsque la souche de *Yarrowia lipolytica* transformée est dépourvue de séquence zêta (c'est par exemple le cas pour la souche PO1d), l'intégration de la cassette d'expression est dispersée dans l'ADN génomique de ladite souche. En revanche, lorsque la souche de *Yarrowia lipolytica* comporte des séquences zêta (c'est par exemple le cas de la souche E150), l'intégration est principalement ciblée au niveau de ces séquences.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, la souche transformée de *Yarrowia lipolytica* est de préférence la souche dénommée YL-LIP2-6C, déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures de

Microorganismes (C.N.C.M.), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 15 décembre 2005, sous le numéro I-3542. Cette souche YL-LIP2-6C est génétiquement stable.

Au sens de la présente invention, les expressions « stable »
5 « génétiquement stable », « stabilité génétique », ainsi que leurs variantes, sont utilisées en référence à la conservation d'un même nombre de loci d'intégration d'un acide nucléique d'intérêt dans l'ADN du clone considéré, pendant au moins 30 générations. Ce nombre de 30 générations est choisi comme base de calcul de la stabilité génétique car les inventeurs ont constaté qu'il correspond à un nombre de doublings de la
10 population cellulaire suffisant pour permettre la production de lipase en utilisant un procédé comprenant au moins une étape de pré-culture de cellules *Yarrowia lipolytica* recombinantes et une étape de production de lipase proprement dite en condition de fermentation. Au sens de la présente invention, une génération est définie par le doublement de la population cellulaire et peut être calculée selon la formule $Y = X \cdot 2^g$
15 où Y est la population cellulaire au temps t (par exemple exprimée en densité cellulaire), X est la population cellulaire initiale au temps t_0 et g représente le nombre de générations nécessaires pour que la population cellulaire passe de la valeur X à la valeur Y. De manière préférée, le clone est dit génétiquement stable lorsque au moins 90% des colonies analysées, après au moins 30 générations, contiennent le même
20 nombre de loci du gène d'intérêt que le clone de départ. Ainsi, comme il ressort des exemples, le clone YL-LIP2-6C est dit stable car près de 100% des colonies analysées après 100 générations contiennent 6 loci du gène *LIP2* (un locus correspondant au gène *LIP2* endogène + 5 loci d'intégration de la cassette d'expression du gène *LIP2*).

De manière surprenante, lorsque le procédé selon l'invention met en
25 œuvre cette souche particulière, les Inventeurs ont réussi à produire la lipase recombinante en grande quantité et à avoir un meilleur contrôle sur ladite production. Les Inventeurs ont en effet réussi à améliorer le rendement de production de lipase et ont notamment pu obtenir une production de l'ordre de 1 à 3 g de lipase pure par litre de surnageant de culture. Ils ont également pu obtenir des préparations de lipase
30 présentant une activité proche de 20 000 U/ml.

Au sens de la présente invention, l'activité de la lipase correspond à son activité enzymatique. L'activité catalytique d'une solution de lipase est exprimée

en unité (U) par ml de solution analysée. L'activité spécifique est exprimée en unité (U) par mg de protéine (lipase) purifiée. Une unité correspond à la quantité d'enzyme capable de catalyser la libération de 1 μ mole d'acide gras par minute. L'activité spécifique d'une lipase varie en fonction de la nature du triglycéride utilisé comme substrat.

Outre l'amélioration du rendement de production de la lipase, les Inventeurs ont également pu assurer une meilleur reproductibilité du procédé de production, améliorer l'homogénéité du produit final et améliorer les conditions de purification de la lipase.

Ces différentes modifications permettent donc d'obtenir une lipase répondant aux conditions requises pour un usage médical. En effet, dans le cadre de leur recherche, les Inventeurs ont maintenant observé que la lipase Lip2 est active dans des valeurs de pH supérieures à 3 et jusqu'à une valeur de pH proche de 8, avec une activité optimale pour un pH compris entre 5 et 6. En revanche, elle est inactivée de manière irréversible lors d'une incubation de 2 heures à pH3 ou pH8,5. L'activité spécifique de la lipase Lip2 a également été analysée en fonction de différents substrats et les Inventeurs ont ainsi déterminé à pH4 les valeurs d'environ 10 760 U/mg, environ 16 920 U/mg et environ 12 260 U/mg de lipase purifiée, respectivement avec des triglycérides à chaîne courte (tributyryne), moyenne (trioctanoïne) et longue (huile d'olive). Enfin, les Inventeurs ont constaté de manière surprenante que la lipase Lip2 est active en présence de sels biliaires et que cette activité augmente avec la concentration en sels biliaires. Cette activité en présence de sels biliaires avait jusqu'à présent seulement été observée avec la lipase gastrique et la lipase pancréatique associée à la co-lipase. Ainsi l'utilisation de lipase Lip2 avec une importante activité spécifique ne nécessite pas la présence de co-lipase.

Le clone YL-LIP2-6C contient plusieurs copies de la cassette d'expression de cette lipase Lip2 se traduisant par 5 événements d'intégration du gène *LIP2* à des loci différents. Lorsqu'il est mis dans des conditions adaptées à la production de lipase, le clone YL-LIP2-6C produit davantage de lipase que les souches transformées de *Yarrowia lipolytica* de l'art antérieur. La lipase est produite selon un rendement supérieur à 1 g/l de surnageant de culture, c'est-à-dire supérieur au rendement observé avec les clones de l'art antérieur, décrits plus haut.

La présente invention a également pour objet une préparation de lipase susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite préparation de lipase, elle présente une activité au moins égale à 15000 U/ml, de préférence
5 supérieure à 20000 U/ml lorsqu'elle est déterminée comme indiqué plus haut.

L'invention a en outre pour objet l'utilisation de la préparation de lipase selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une pathologie associée à un dérèglement de l'absorption des graisses (par exemple acides gras à chaînes courtes, moyennes ou longues), notamment lié à une insuffisance
10 pancréatique, notamment exocrine.

L'invention a également pour objet un médicament, caractérisé en ce qu'il comprend une préparation de lipase telle que définie ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une cellule de *Yarrowia lipolytica* transformée par un vecteur d'expression d'une lipase
15 acido-résistante de levure, caractérisée en ce qu'il s'agit du clone dénommé YL-LIP2-6C, déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 15 décembre 2005 sous le numéro 1-3542.

La présente invention a, en outre, pour objet l'utilisation d'une
20 cellule telle que définie ci-dessus pour la production de lipase acido-résistante de levure.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux
25 dessins annexés, dans lesquels :

- La figure 1 représente l'approche globale du contrôle de la stabilité génétique du clone YL-LIP2-6C au cours du procédé de production de lipase.

- La figure 2 représente la variation de la densité optique à 600 nm (DO_{600} , axe des ordonnées gauche) (-♦-) et la variation du taux de croissance (h^{-1} , axe des ordonnées droit) (-■-) en fonction du temps (heures, axe des abscisses) durant le
30 procédé de fermentation. La flèche indique l'induction de la production de lipase.

- La figure 3 représente l'analyse par Southern blot du nombre d'événements d'intégration du gène *LIP2* à des loci différents dans le génome de 23 colonies (pistes 24 à 43) prélevées au temps T33, correspondant à la fin de la fermentation, environ 100 heures après le début de la fermentation. Copies 1 à 6 : 6 loci du gène *LIP2* (5 loci pour l'intégration de la cassette d'expression du gène *LIP2* + un locus pour le gène *LIP2* endogène). M : marqueur de taille.

- La figure 4 représente le suivi, par SDS-PAGE, de la production de lipase recombinante par le clone YL-LIP2-6C pendant le procédé de production, de T16 à T33. La flèche indique l'induction de la production de lipase (T17, 48 heures de fermentation). M : échelle de poids moléculaire ; les cinq pistes de la partie droite du gel correspondent à des quantités connues (2,5 µg à 20 µg) de la lipase Lip2 purifiée.

- La figure 5 représente l'analyse, par SDS-PAGE, de la pureté de la lipase dans le surnageant au temps T33 (fin du procédé de fermentation). MW : échelle de poids moléculaire ; Ref.Lip2 F5 : gamme de lipase Lip2 de 1 à 10 µg ; YL-LIP2-6C surnageant : volumes, en µl, du surnageant analysé.

- La figure 6 représente le spectre de masse, déterminé par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, de la lipase recombinante produite par le clone YL-LIP2-6C.

EXEMPLE 1 – MATERIELS ET METHODES

1) Milieux utilisés

Les concentrations finales indiquées sont les concentrations dans les solutions-mères.

Milieu de base 02130S non enrichi

Ingrédients	concentration finale
Glucose	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 (Glutamate)	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

Le milieu 02130S enrichi comprend en outre les additifs suivants :

Additifs	Concentration finale
Solution d'oligoéléments	1 ml/l
Solution de vitamines	1 ml/l

Composition de la solution d'oligoéléments

Ingrédients	Concentration finale
CoCl ₂	0,5 g/l
Na ₂ MoO ₄	0,06 g/l
CuSO ₄	0,9 g/l

Composition de la solution de vitamines

Ingrédients	Concentration finale
D-biotine	0,05 g/l
Pantothénate de calcium	1 g/l
Acide nicotinique	1 g/l
Myoinositol	25 g/l
Thiamine HCl	0,25 g/l
Pyridoxol HCl	0,25 g/l
Acide p-aminobenzoïque	0,05 g/l

Composition de la solution de sels minéraux

Ingrédients	Concentration finale
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

Composition de la solution de FeSO₄

Ingrédients	Concentration finale
FeSO ₄	0,9 g/l

Solution d'ammoniac, 14%

Solution anti-mousse : Struktol J673 diluée au 1/10 (Schill+Seilacher AG, Moorfleeter Str.28,22113, Hamburg, Allemagne)

2) Extraction d'ADN génomique et analyse Southern blot

a) Extraction de l'ADN génomique

Le culot cellulaire obtenu à partir d'une culture de 4 ml est mis en suspension dans 0,5 ml de tampon sorbitol (0,9 M de sorbitol ; 0,1 M de Tris-HCl, pH = 8,0 ; 0,1 M d'EDTA). 50 µl de Zymolase® 20T (6 mg/ml) (Euromedex, 67458 Mundolsheim cedex, France), 50 µl de 2-mercaptoéthanol à 0,28 M sont ajoutés et la solution est incubée 1 heure à 37°C sous agitation (180 rpm). La solution est soumise à centrifugation et le culot est mis en suspension dans 0,5 ml de tampon TE (50 mM de Tris-HCl, pH = 8; 20 mM d'EDTA). 50 µl de SDS 10% sont ajoutés et la solution est mélangée par retournements et incubée 20 min à 65°C. 0,2 ml d'acétate de potassium 5M sont ajoutés, puis la solution est mélangée et gardée dans la glace pendant 30 min, puis centrifugée pendant 5 min.

Le surnageant est transféré dans un tube de 1,5 ml puis 0,8 ml d'éthanol 100%, préalablement refroidi dans la glace, sont ajoutés. La solution est

mélangée par retournements puis centrifugée. Après élimination du surnageant, 0,4 ml de tampon TE contenant 100 µg/ml de RNase A (Invitrogen, USA) sont ajoutés et la solution est incubée 1 heure à 37°C. Après l'ajout de 1 ml d'éthanol 100%, préalablement refroidi dans la glace, la solution est délicatement mélangée jusqu'à la précipitation de l'ADN, puis est centrifugée. Le surnageant est éliminé puis le culot d'ADN est séché à l'air libre puis mis en suspension dans 100 µl d'eau stérile puis incubé une nuit à 4°C.

b) Digestion par l'enzyme HindIII

La concentration en ADN génomique est mesurée par détermination de l'absorbance à 260 nm (A_{260}) et à 280 nm (A_{280}). 1 µg de l'ADN génomique est mélangé avec de l'eau stérile jusqu'à un volume final de 42,5 µl. 5 µl de tampon (5X) et 2,5 µl de HindIII (50 u/µl) (Invitrogen, USA) sont ajoutés et la solution est incubée à 37°C pendant 4 heures.

c) Analyse Southern Blot

Les transferts de type Southern blot sont effectués en suivant les procédures du kit « DIG High Prime DNA Labeling and Detection » de la société Roche Diagnostic.

d) Procédure de marquage de la sonde

La sonde correspondant à la totalité du gène codant pour la lipase Lip2 est obtenue par PCR effectuée sur l'ADN génomique à l'aide de l'enzyme Phusion DNA polymerase (Finnzyme) et des deux amorces suivantes :

Amorce sens : 5'-GTGTACACCTCTACCGAGACCTCT-3' (SEQ ID NO: 1)

Amorce antisens : 5'-TTAGATACCACAGACACCCTCGGT-3' (SEQ ID NO: 2)

Après la réaction de PCR, la sonde est purifiée sur gel à l'aide du kit « Nucleospin Extract II » (Macherey Nagel). La sonde purifiée est ensuite marquée à froid (digoxynine) à l'aide du kit « DIG high prime DNA labeling » de Roche.

e) Séparation sur gel, transfert d'ADN et détection du signal

2 µg de l'ADN digéré par HindIII est mélangé avec du tampon de charge puis est déposé sur un gel d'agarose 0,8%. La migration est effectuée sous 50 V pendant 2h30 puis l'ADN est transféré sur membrane Hybond+ (Amersham Bioscience). Le nombre de loci du gène *Lip2* dans l'ADN génomique est détecté grâce

à l'hybridation, sur les membranes, de la sonde marquée, suivie de la visualisation par l'exposition aux rayons X.

3) Détermination de la concentration protéique

La concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford. Les protéines sont quantifiées à l'aide de la méthode de Bradford directement sur le surnageant de la culture en fermentation. La quantité de protéines ainsi déterminée est comparée avec des quantités connues de lipase Lip2 purifiée. 20 µl d'échantillons de standards, aux dilutions appropriées, sont mélangés dans des tubes avec 1 ml du réactif dilué (5 fois) contenant le colorant. La DO₅₉₅ est alors déterminée relativement à la DO₅₉₅ obtenue pour le contrôle (colorant dilué seul).

4) Mesure de l'activité spécifique de la lipase recombinante

L'activité de la lipase est mesurée potentiométriquement à 37°C à l'aide d'un dispositif pH-stat (RADIOMETER). Le substrat utilisé est la trioctanoïne. 10 mM de substrat sont mis en émulsion dans 15 ml de tampon de réaction contenant 1 mM de Tris-HCl (pH 5,5), 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ et 4 mM de taurodésoxycholate de sodium (SIGMA). Une unité d'activité spécifique est définie comme 1 µmole d'acide gras libéré par min et par mg de protéine.

4) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE)

12 µl d'un échantillon comprenant 25% d'un mélange contenant du SDS et des agents réducteurs sont chargés sur un gel bis tris 4-12% (Biorad). La migration est effectuée pendant 45 min à 160 V.

Le gel est ensuite analysé par coloration au bleu de Coomassie.

5) Détermination par spectrométrie de masse de type « Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice - Temps de Vol » (MALDI-TOF : Matrix-assisted Desorption Ionization-Time of Flight) de la masse moléculaire de la lipase Lip2 produite par le clone YL-LIP2-6C

Une analyse de spectrométrie de masse de type désorption/ionisation laser est effectuée en utilisant un spectromètre de masse « Voyager Elite XL time of flight » de la société Perseptive Biosystems (Framingham, MA) mis en œuvre avec un laser à azote émettant à 337 nm. Le spectre de masse en mode positif est obtenu en utilisant un mode d'extraction linéaire et retardé avec un potentiel d'accélération de

25 kV, une tension de grille de 0,3%, une tension de guide d'ion de 0,3%, et un temps de retard de 1000 ns pour la protéine Lip2. Chaque spectre est le résultat de la moyenne de 100 impulsions laser. Le matériel à analyser est mélangé à un volume égal d'une solution saturée d'acide sinapinique (Fluka) préparé dans une solution à 50% (v/v) d'acétonitrile/acide trifluoroacétique aqueux. Des aliquots de 2 µl de ce mélange sont déposés sur la plaque d'échantillon en acier inoxydable et sont séchés à l'air libre avant d'effectuer l'analyse. La calibration externe est effectuée à l'aide de l'alpha chymotrypsinogène A (Sigma). Les valeurs exprimées sont des moyennes et correspondent à l'ion $[M+H]^+$.

0 **EXEMPLE 2 – Construction du vecteur d'expression et obtention du clone YL-LIP2-6C**

La souche YL-LIP2-6C est obtenue par transformation d'une souche de *Yarrowia lipolytica* PO1d, dépourvue de séquences zêta par un vecteur d'expression, dénommé JMP6, décrit dans la Demande EP 1 108 043, et comprenant le gène *LIP2* codant pour le précurseur Lip2p de la lipase Lip2 de *Yarrowia lipolytica* en amont duquel se trouve le promoteur ACO2. Ladite cassette est encadrée par des séquences zêta, comme décrit plus haut. La construction du vecteur JMP6 et la transformation de la souche PO1d sont réalisés selon le même mode opératoire que dans la Demande EP1108043. Cette souche YL-LIP2-6C, comprenant 5 loci différents d'intégration de la cassette d'expression du gène *LIP2*, a été déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, sous le numéro I-3542, le 15 décembre 2005.

EXEMPLE 3.- Production de la lipase avec la souche YL-LIP2-6C et vérification de la stabilité génétique de YL-LIP2-6C

La souche YL-LIP2-6C est mise en œuvre dans un procédé de production de lipase comprenant une étape de pré-culture et une étape de fermentation adaptée à la production de lipase. L'approche globale de ce procédé est illustrée à la figure 1. La lipase ainsi produite a ensuite été analysée en terme d'activité et de qualité. Par ailleurs, la stabilité génétique de YL-LIP2-6C est analysée par détermination du nombre de loci de la cassette d'expression du gène *LIP2*.

1) Procédé de production

Pré-cultures et fermentation

Une ampoule de solution-mère du clone YL-LIP2-6C dans du glycérol est décongelée et 5 µl sont mis en culture dans 25 ml de milieu 02130S enrichi, contenant 1‰ (v/v) de la solution de vitamines et 1‰ (v/v) de la solution d'oligoéléments, dans une bouteille Erlen Meyer de 250 ml. La culture est incubée à 28°C pendant 36 heures sous agitation (180 rpm). La préculture de 25 ml résultante (préculture 1) estensemencée dans 200 ml de milieu 02130S enrichi dans un flacon Erlen Meyer de 2 litres puis la culture est incubée 36 heures à 28°C sous agitation (180 rpm). La préculture 2 ainsi obtenue (225 ml) estensemencée dans du milieu 02130S enrichi dans un fermenteur.

Au temps T_0 du procédé de fermentation, 2 ml de la solution de FeSO_4 sont ajoutés dans la culture. Toutes les 6 à 9 heures, 2 à 3 ml de la solution de vitamines sont ajoutés à la culture en fermentation et après 34 heures de fermentation (à T_{12}), l'apport en glucose est initié. L'alimentation en glucose est progressivement augmentée pendant 14 heures puis est interrompue à T_{17} (correspondant à 48 heures de fermentation) et l'induction par l'acide oléique est alors initiée. L'alimentation en acide oléique est progressivement augmentée durant les 54 heures suivantes, puis à T_{33} (102 heures de fermentation) une DO_{600} de 340 est atteinte et le procédé de fermentation est arrêté. La culture finale de 3 litres est centrifugée (14000 rpm). Le surnageant est récupéré et conservé à -20°C .

Monitoring des cultures

Au cours de la fermentation, la température, la pression partielle en oxygène et le pH sont surveillés et maintenus à 28°C , 20% et 6,2 respectivement. Toutes les 3 heures environ, un échantillon de la culture est prélevé et la DO_{600} est mesurée afin de suivre l'évolution du taux de croissance. Les résultats sont indiqués dans la figure 2. Deux extraits de 1 ml de ces échantillons sont centrifugés 5 min à 14000 rpm et les culots et surnageants sont conservés à -20°C . Le Tableau I montre le monitoring du procédé de fermentation.

T	Time of fermentation / hours	DO600	Growth rate (h ⁻¹)	Agitation (rpm)	PO2 (%)	pH	Other actions and remarks	Temp. (°C)
T0	0,00	0,28		300	98	6,21	2 mL FeSO ₄	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	8,00	0,34	0,02020821	300	98	6,53		28
T4	12,00	0,4	0,05417298	300	100	6,57		28
T5	15,00	0,5	0,07438118	300	98	6,2	pH adjustment with orthophosphoric acid	28
T6	18,00	0,62	0,07170379	300	97	6,2		28
T7	21,00	0,92	0,1315514	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	4,87	0,15736784	331	20	6,2	Problem with glucose feed	28
T12	34,00	9,97	0,25280717	392	20,6	6,2	Start glucose feed	28
T13	36,00	11,96	0,09099358	378	17,6	6,2		28
T14	39,00	21,5	0,19549506	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	0,04587379	470	20	6,4	Induction oleic acid	28
T18	51,00	89	0,08004704	366	20	6,38		28
T19	54,00	93,86	0,01772265	409	20,3	6,17		28
T20	57,00	85	-0,03305102	535	19,5	6,19		28
T21	60,00	95	0,03707521	615	20,2	6,21		28
T22	63,00	105	0,03336115	563	21,5	6,2		28
T23	66,00	129	0,06861735	583	20,4	6,2		28
T24	69,00	159	0,06969727	580	21,2	6,18		28
T25	72,00	178	0,03762645	563	19	6,18		28
T26	75,00	210	0,05510799	565	19,5	6,2		28
T27	78,00	216	0,00939029	589	20	6,2		28
T28	80,00	235	0,04215355	590	20	6,2		28
T29	83,50	240	0,00601526	610	20	6,2		28
T30	90,50	280	0,02232153	640	21	6,2		28
T31	94,00	310	0,02908077	587	19,5	6,19		28
T32	99,00	342	0,01954769	691	20	6,19		28
T33	100	340	-0,00586512	680	20	6,2		28

Tableau I: Monitoring du procédé de fermentation

Purification de la lipase

Optionnellement, une étape supplémentaire de purification de la lipase est réalisée.

La lipase est séparée de la culture à l'aide d'un dispositif de micro-
5 filtration tangentielle sur membrane céramique (pilote X6 de PALL) permettant la
rétention des levures de taille supérieure au seuil de coupure (0,1 μm). Le perméat
contenant la lipase est récupéré d'abord en mode concentration, puis en mode
diafiltration. Ces étapes sont mises en œuvre en suivant les recommandations du
fabricant avec les modifications appropriées. La concentration en microorganismes
10 contenus dans le perméat est ensuite réduite par filtration (0,2 μm) (Millipore) de façon
à obtenir une biocharge inférieure à 10 cfu/ml. A l'aide d'un dispositif Profux M12
(Millipore), la solution de lipase est concentrée, jusqu'à un volume d'environ 5 litres,
et soumise à une ultrafiltration tangentielle en utilisant une membrane Pellicon
standard Biomax 10 kDa afin d'éliminer les contaminants de faibles poids moléculaire.
15 L'ultrafiltrat, ne contenant pas la lipase, est éliminé. La solution de lipase est alors une
nouvelle fois purifiée par élimination des microorganismes, comme indiqué plus haut,
de façon à obtenir une biocharge inférieure à 5 cfu/ml. La lipase ainsi purifiée peut en
outre subir une lyophilisation.

3) Caractérisation de la lipase recombinante produite par YL- 20 LIP2-6C

a) Contrôle de la production de lipase par la souche YL-LIP2-6C au cours du procédé de fermentation

A chaque point de mesure, un échantillon de culture est soumis à
centrifugation et le surnageant est analysé par SDS-PAGE. 75 μl du surnageant sont
25 mélangés avec 75 μl d'eau puis 5 μl sont chargés sur un gel à 26 puits. Des échantil-
lons contenant des quantités connues de lipase Lip2 sont également analysés. Les
résultats sont illustrés à la figure 4. En comparant la quantité de lipase obtenue à la fin
de la fermentation (T33), avec le gradient de quantités connues de lipase Lip2, la
concentration de lipase obtenue après 100 heures de fermentation peut être estimée à
30 1,5 g/l.

Par ailleurs, les inventeurs ont mis en œuvre le procédé de produc-
tion de lipase selon l'invention pour un volume final d'environ 35 litres, ce qui a

permis l'obtention de lipase selon un rendement situé entre 1 et 3 g par litre de surnageant de culture.

b) Détermination de la concentration protéique et estimation du rendement de production de lipase recombinante

- 5 La concentration protéique dans le surnageant de culture est déterminée comme indiqué à l'exemple 1 (méthode de Bradford). Sept mesures indépendantes sont effectuées et la concentration de protéines dans le surnageant est de 2,3 g/l. La pureté de la protéine Lip2 dans le surnageant est estimée par SDS-PAGE. Les résultats sont illustrés à la figure 5. Le niveau de pureté est estimé à environ 70%.
- 10 Le rendement résultant de production de lipase de l'étape de fermentation avec le clone YL-LIP2-6C est donc de 1,6 g/l.

c) Mesure de l'activité spécifique de la lipase recombinante produite par YL-LIP2-6C

- 15 L'activité spécifique de la lipase produite par le clone YL-LIP2-6C est mesurée comme indiqué à l'exemple 1. L'échantillon correspondant au surnageant de fermentation est dilué 100 fois dans un tampon contenant 50 mM de Na_2HPO_4 , 50mM de KH_2PO_4 , 150 mM de NaCl, pH 6,0. L'activité catalytique déterminée à 37°C avec le trioctanoïne sur 3 expériences indépendantes est de 21883,33 U/ml du surnageant (Tableau II).

	Activité lipasique (U/ml)				
	Essais			Moyenne	SD
Echantillon	20800,00	22750,00	22100,00	21883,33	992,89

20 **Tableau II : mesure de l'activité d'échantillons du surnageant de fermentation**

- D'après la concentration estimée de lipase Lip2 dans le surnageant (voir plus haut), l'activité spécifique de la lipase est de 13675 U/mg, comparable à l'activité spécifique de la lipase produite pour les études cliniques. L'activité spécifique de la lipase produite par le clone YL-LIP2-6C est conforme aux conditions requises pour les
- 25 lots cliniques.

d) Masse moléculaire de la lipase recombinante

L'analyse du spectre de masse (voir exemple 1) est faite sur le surnageant de culture de fermentation après centrifugation sans purification. Le résultat est illustré à la figure 6. Le pic majeur observé révèle une masse moléculaire de 37648

Da. La lipase Lip2 produite par YL-LIP2-6C a une masse moléculaire correcte car la valeur observée est conforme aux conditions requises pour les lots cliniques, c'est à dire 37500 +/- 1000 Da.

Cet exemple illustre la sélection d'un clone stable, YL-LIP2-6C (en l'espèce, 100% des clones analysés après 30 générations présentent le même nombre de Loci du gène Lip2 que le clone initial). En outre, la stabilité génétique dudit clone n'est pas affectée par les conditions de culture mises en oeuvre pour la production de lipase (pendant les pré-cultures ; juste avant la fermentation ; juste avant l'induction par l'acide oléique de la production de lipase ; fin de la fermentation).

3) Stabilité génétique du clone YL-LIP2-6C

La stabilité génétique du clone YL-LIP2-6C au cours du procédé de production de lipase, comprenant une étape de préculture et une étape de fermentation, est analysée en déterminant le nombre d'évènements d'intégration de la cassette d'expression du gène *LIP2* à des loci différents dans l'ADN de *Yarrowia lipolytica*, dans les colonies sélectionnées à T0, T17 et T33.

a) Sélection des colonies

Un échantillon de la préculture 2 (T0, initiation de la fermentation), un échantillon de la culture en condition de fermentation à T17 (juste avant l'induction) et à T33 (fin de la fermentation) sont dilués, dans un premier temps jusqu'à atteindre une $DO_{600} = 1$, puis sont dilués au 1/1000. 10 µl de ces solutions diluées sont chacune étalées sur 3 plaques de culture sur milieu YPD. Les plaques sont ensuite incubées à 28°C pendant 48 heures puis sont conservées à 4°C jusqu'à la sélection de colonies pour l'analyse du nombre de loci.

20 colonies dérivées de l'échantillon prélevé au point de départ de la fermentation (T0), 20 colonies dérivées de l'échantillon prélevé juste avant l'induction (T17) et 100 colonies dérivées de l'échantillon prélevé à la fin de la fermentation (T33) sont ensemencées séparément dans 4 ml de milieu 02130S enrichi puis mis en culture pendant 72 heures. Ensuite, des stocks dans du glycérol 30% sont constitués en prévision de l'extraction de l'ADN et de l'analyse par Southern blot (Matériels et Méthodes).

c) Détermination du nombre d'évènements d'intégration du gène *LIP2* à des loci différents pour 140 colonies dérivées de la souche YL-LIP2-6C

Les résultats de l'analyse par Southern blot du nombre d'évènements d'intégration à des loci différents du gène *LIP2* sur 20 colonies prélevées au temps T0 (début de fermentation), 20 colonies prélevées au temps T17 (48 heures de fermentation) et 100 colonies prélevées au temps T33 (100 heures de fermentation) sont illustrés à la figure 3. Ces résultats montrent que toutes les colonies analysées contiennent 6 loci du gène *LIP2*. Dans la mesure où la souche sauvage contient une copie du gène *LIP2* endogène, la souche YL-LIP2-6C contient donc 5 loci d'intégrations de la cassette d'expression du gène *LIP2*. Le clone YL-LIP2-6C est donc 100% stable durant un procédé de fermentation de 100 heures.

REVENDICATIONS

1°) Procédé de production de lipase recombinante, comprenant :

a) une étape au cours de laquelle on procède à la mise en culture de cellules de *Yarrowia lipolytica* transformées par un vecteur comprenant une cassette d'expression d'une lipase acido-résistante de levure, et

b) une étape au cours de laquelle on recueille, dans le surnageant de culture, la lipase recombinante produite par lesdites cellules,

lequel procédé est caractérisé en ce que l'étape a) de mise en culture est mise en œuvre dans un milieu de culture dépourvu de produits d'origine animale ou de mélanges non caractérisés constitués de matières protéiques d'origine animale ou de leurs produits de digestion enzymatique.

2°) Procédé de production selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit milieu de culture comprend :

- comme source d'azote, de l'azote minéral, et de préférence du sulfate d'ammonium ;

- une source de carbone sélectionnée parmi les sources de carbone d'origine glucidique, les polyalcools tel que le glycérol, et les sources de carbone d'origine lipidique tels que des acides gras et des acylglycérols ; et

- des sels minéraux, des oligoéléments et des vitamines.

3°) Procédé de production selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que l'étape a) comprend :

a1) la pré-culture des cellules transformées de *Yarrowia lipolytica* dans un milieu contenant une source de carbone d'origine glucidique ;

a2) une étape de fermentation, comprenant une phase de croissance cellulaire dans un milieu contenant une source de carbone d'origine glucidique et une phase de production de lipase dans un milieu contenant comme seule source de carbone un acide gras choisi parmi les triglycérides à chaîne courte, moyenne ou longue.

4°) Procédé de production selon la revendication 3, caractérisé en ce que la fermentation est avantageusement mise en œuvre avec une pO₂ constante comprise entre 15 % et 25 % et un pH de préférence inférieur à 6,5.

5°) Procédé de production selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce que l'étape a1) de pré-culture est réalisée jusqu'à atteindre une valeur de DO_{600nm} comprise entre 3 et 10 pour 1 ml, et en ce qu'à l'étape a2) de fermentation, ladite phase de production de lipase est initiée lorsque la DO_{600nm} de la culture atteint une valeur comprise entre 60 et 80 pour 1 ml.

6°) Procédé de production selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'étape b) au cours de laquelle on recueille la lipase, est réalisée lorsque la DO_{600nm} atteint une valeur comprise entre 300 et 350 pour 1 ml.

7°) Procédé de production selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape b) comprend :

b1) la séparation de la lipase dudit surnageant de culture, et

b2) la purification de la lipase obtenue en b1).

8°) Procédé de production selon la revendication 7, caractérisé en ce que ladite séparation est effectuée par une technique choisie parmi la filtration tangentielle en fibre creuse, la filtration frontale et la centrifugation continue ou discontinue, et ladite purification est effectuée par une technique choisie parmi la filtration, la précipitation fractionnée, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'interactions hydrophobes et la chromatographie par gel-filtration.

9°) Procédé de production selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'étape a) consiste en la mise en culture du clone dénommé YL-LIP2-6C, déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, sous le numéro I-3542, le 15 décembre 2005.

10°) Préparation de lipase recombinante acido-résistante de levure, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

11°) Préparation selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle a une activité catalytique à pH6 d'au moins 15000 unités par ml de surnageant de culture, de préférence supérieure à 20000 unités par ml de surnageant de culture, une unité correspondant à la quantité d'enzyme capable de catalyser la libération de 1 μ mole d'acide gras par minute lorsque le substrat utilisé est la trioctanoïne, et/ou en

ce que la concentration de ladite lipase dans ladite préparation est supérieure à 1 g de lipase par litre.

12°) Utilisation d'une préparation de lipase selon la revendication 10 ou la revendication 11 pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement d'un syndrome de malabsorption de graisses, lié à une insuffisance pancréatique.

13°) Cellule de *Yarrowia lipolytica* transformée par un vecteur comprenant une cassette d'expression d'une lipase extracellulaire acido-résistante de levure, caractérisée en ce qu'il s'agit du clone dénommé YL-LIP2-6C, déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.) sous le numéro I-3542, le 15 décembre 2005.

14°) Utilisation de la cellule selon la revendication 13 pour la production de lipase acido-résistante de levure.

15°) Médicament, caractérisé en ce qu'il comprend une préparation de lipase selon la revendication 10 ou la revendication 11.

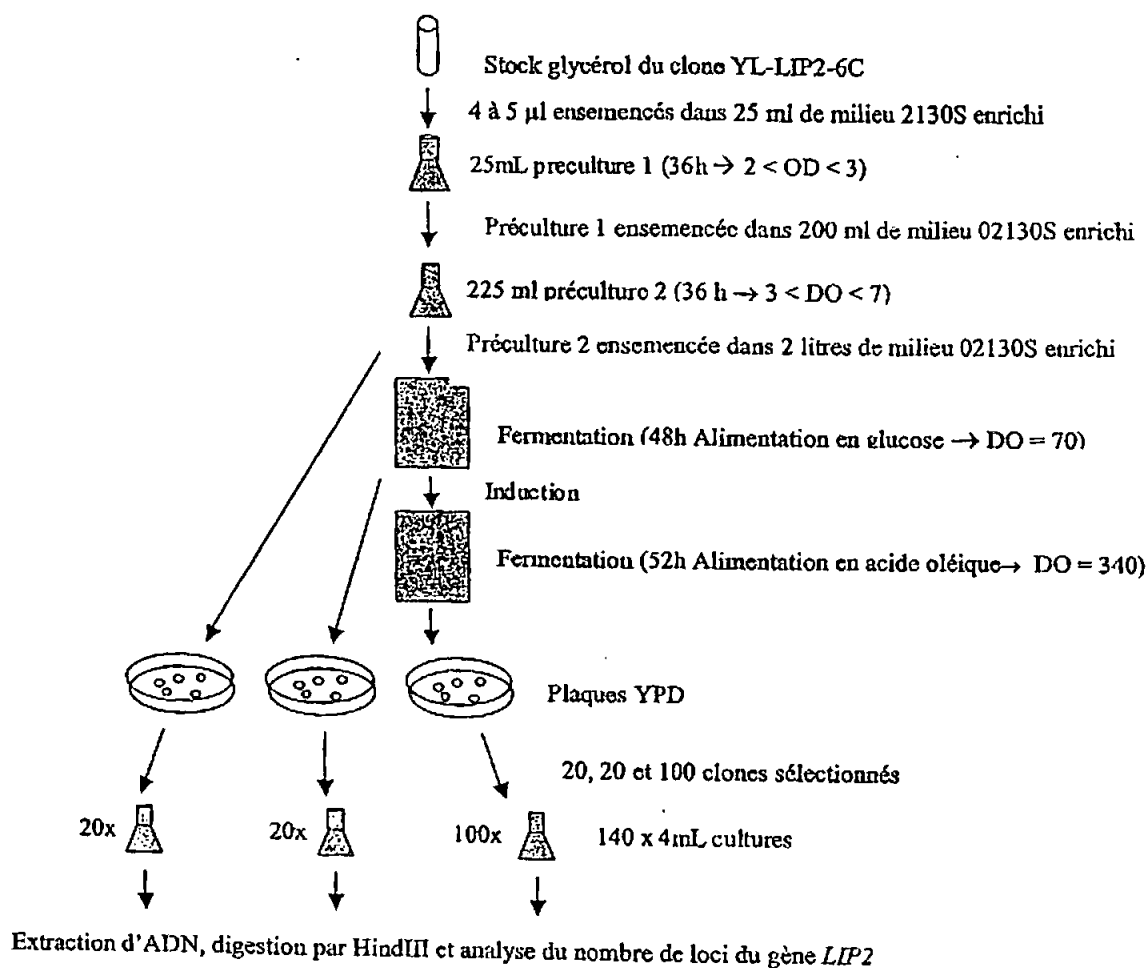


Figure 1

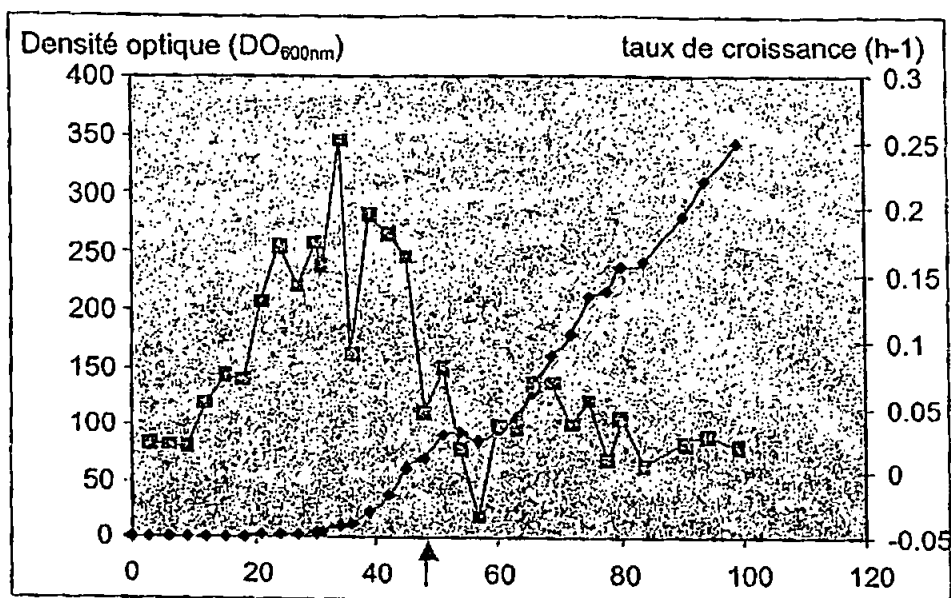


Figure 2

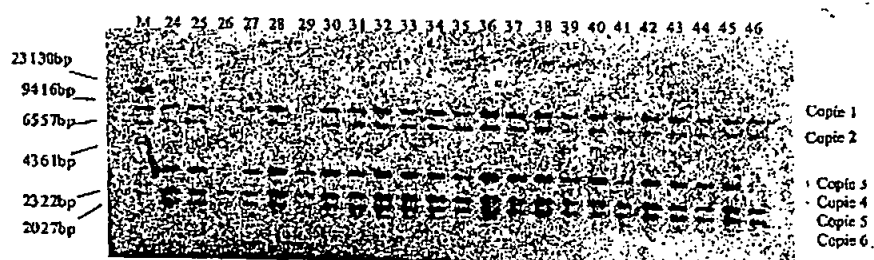


Figure 3

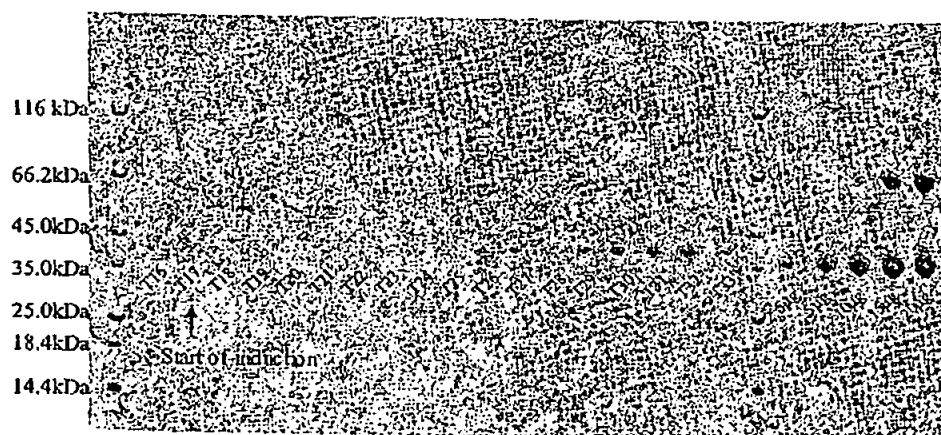


Figure 4

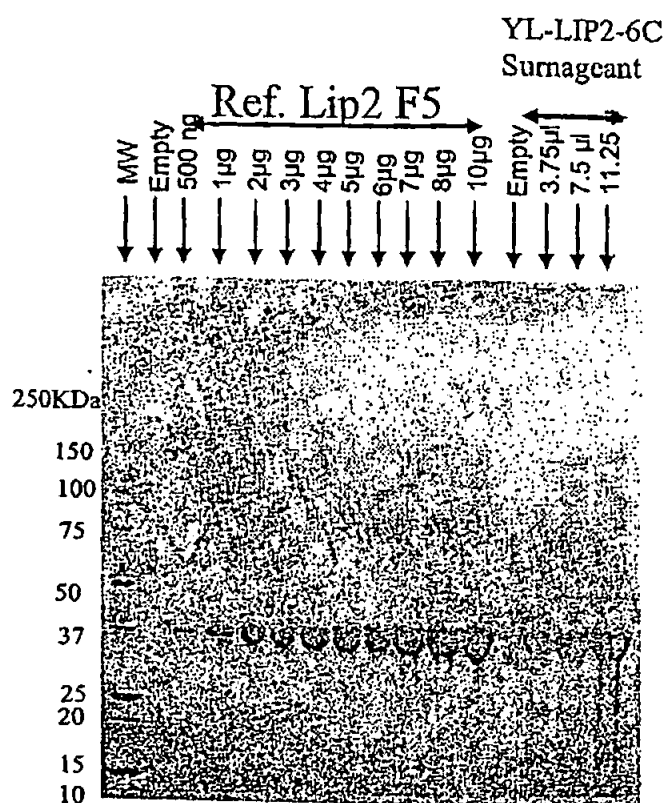


Figure 5

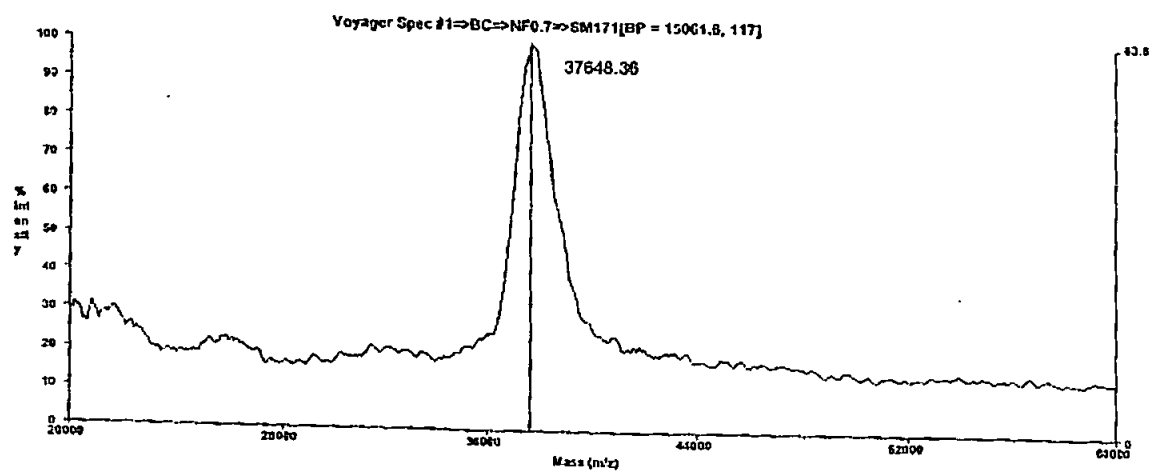


Figure 6

F 269 - 39 PCT listage.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER
LEBLOND, Yves
MOUZ, Nicolas

<120> Procédé de production de lipase, cellule de Yarrowia lipolytica transformée apte à produire ladite lipase et leurs applications.

<130> F269Cas39PCT

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce sens

<400> 1
gtgtacacct ctaccgagac ctct 24

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce antisens

<400> 2
ttagatacca cagacaccct cggt 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2006/001352

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/20 C07K14/39 C12P21/02 C12N1/16 A61K38/46

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)

C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/83773 A (MAYOLY SPINDLER LAB [FR]; SEMAN MICHEL [FR]; PIGNEDE GEORGES [FR]; FUD) 8 November 2001 (2001-11-08) cited in the application the whole document	1-15
X	WO 2006/039541 A2 (NOVOZYMES INC [US]; NOVOZYMES AS [DK]) 13 April 2006 (2006-04-13) example 29 page 43, line 26 - page 48, last line	10, 11, 15
A	ALONSO F.O.M. ET AL.: "Improvement of lipase production ..." BRAZILIAN JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING, vol. 22, no. 1, March 2005 (2005-03), pages 9-18, XP002414756 the whole document	1-15
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family 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

8 document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2007

Date of mailing of the international search report

26/01/2007

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Perez, Caroline

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2006/001352

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FICKERS PATRICK ET AL: "Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 27, no. 22, November 2005 (2005-11), pages 1751-1754, XP002414757 ISSN: 0141-5492 the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2006/001352

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0183773	A	08-11-2001	AU 4410500 A	12-11-2001
			DE 00925351 T1	15-04-2004
			EP 1276874 A1	22-01-2003
			ES 2200728 T1	16-03-2004
WO 2006039541	A2	13-04-2006	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2006/001352

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N9/20 C07K14/39 C12P21/02 C12N1/16 A61K38/46		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 01/83773 A (MAYOLY SPINDLER LAB [FR]; SEMAN MICHEL [FR]; PIGNEDE GEORGES [FR]; FUD) 8 novembre 2001 (2001-11-08) cité dans la demande le document en entier	1-15
X	WO 2006/039541 A2 (NOVOZYMES INC [US]; NOVOZYMES AS [DK]) 13 avril 2006 (2006-04-13) exemple 29 page 43, ligne 26 - page 48, dernière ligne -/-	10,11,15
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annex		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 15 janvier 2007		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 26/01/2007
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Fonctionnaire autorisé Perez, Caroline

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2006/001352

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ALONSO F.O.M. ET AL.: "Improvement of lipase production ..." BRAZILIAN JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING, vol. 22, no. 1, mars 2005 (2005-03), pages 9-18, XP002414756 le document en entier -----	1-15
A	FICKERS PATRICK ET AL: "Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast Yarrowia lipolytica" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 27, no. 22, novembre 2005 (2005-11), pages 1751-1754, XP002414757 ISSN: 0141-5492 le document en entier -----	1-15