



(12) PATENT

(19) NO

(11) 334484

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12P 33/06 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20030606	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.07.24 PCT/FR2001/02417
(22)	Inng.dag	2003.02.07	(85)	Videreføringsdag	2003.02.07
(24)	Løpedag	2001.07.24	(30)	Prioritet	2000.08.08, FR, 0010437
(41)	Alm.tilgj	2003.02.07			
(45)	Meddelt	2014.03.17			
(73)	Innehaver	Aventis Pharma SA, 20, avenue Raymond Aron, FR-92160 ANTONY, Frankrike			
(72)	Oppfinner	Bruno Dumas, 4, rue l'Eglise, F-78117 Chateaufort, Frankrike Gilles Cauet, 8, rue du Maréchal Leclerc, F-67370 Griseim-sur-Souffel, Frankrike Tilman Achstetter, Buxtorffstrasse 26, D-28213 Bremen, Tyskland Eric Degryse, 10-12, allée de la Toison d'or, F-94000 Créteil, Frankrike			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Gjærstamme med redusert 20alfa-hydroksystem-dehydrogenase (20alfaHSD)-aktivitet og anvendelser derav, nærmere bestemt for fremstilling av steroidderivater.			
(56)	Anførte publikasjoner	JP 2031680 A OECHSNER ULRICH ET AL., FEBS LETTERS, vol. 238, no. 1, 1988, s. 123-128 WO 9925865 A			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse gjelder nye gjærstammer, fremgangsmåter og genetiske konstruksjoner for fremstilling av disse, og anvendelse av dem for syntese eller modifisering av steroide forbindelser. Nærmere bestemt beskriver oppfinnelsen stammer med redusert 20ochSD aktivitet, nærmere bestemt ved modifisering av GCYI-genet og/eller YPRI-genet. Gjærstammene ifølge oppfinnelsen gjør det mulig å forbedre synteseeffektiviteten eller å forbedre fremgangsmåtens selektivitet eller utbytte, så vel som sluttproduktets kvalitet. Stammene, fremgangsmåtene og forbindelsene ifølge oppfinnelsen er anvendbare innen forskning, utvikling av og produksjon av produkter med terapeutisk eller profylaktisk aktivitet i mennesker eller dyr, fortrinnsvis av steroidderivater.

Foreliggende oppfinnelse gjelder områdene biologi og farmasi. Den gjelder nærmere bestemt nye preparater og fremgangsmåter som er anvendbare for fremstilling av steroide forbindelser eller for (selektiv) omdanning av steroide forbindelser. Den gjelder nærmere bestemt gjærstammer og genetiske fremgangsmåter og konstruksjoner for fremstilling av disse, og anvendelse av dem for syntese eller modifisering av steroide forbindelser. Gjærstammene ifølge oppfinnelsen gjør det mulig å forbedre synteseeffektiviteten og selektiviteten eller utbyttet i fremgangsmåten, samt kvaliteten på sluttproduktet. Stammene, fremgangsmåtene og forbindelsene ifølge oppfinnelsen er anvendbare innen forskning, utvikling og fremstilling av produkter med terapeutisk eller profylaktisk aktivitet i mennesker eller dyr, nærmere bestemt av steroidderivater.

Mikroorganismers naturlige evne til å omdanne steroider er omfattende beskrevet i litteraturen. I denne sammenheng representerer mikroorganismene et fordelaktig alternativ for fremstilling av steroidderivater som er vanskelige å erholde ved kjemisk syntese. Gjær er videre spesielt anvendbar for ekspresjon av cDNA som koder for enzymer som er aktive i organeller. Følgelig har gjær som *S. cerevisiae* blitt hyppig anvendt for ekspresjon av cDNA som koder for steroidogene enzymer, for eksempel mikrosomale eller mitokondrielle P450. Videre har undersøkelser rettet mot ekspresjon av enzymer som inngår i reaksjonsveien for biosyntese av hydrokortison gjort det mulig å vise at gjær effektivt kan konvertere visse intermediater. Anvendelse av transformerte gjærceller som tillater ekspresjon av ett eller flere pattedyrenzymer som deltar i reaksjonsveien for biosyntese av steroider har således blitt beskrevet, for eksempel i patentsøknad EP340878, US patentskrift nr. 5 137 822 og i Dumas et al. JP 2031680A tilveiebringer bovint adrenalt cytokrom P450 C21 ved å syntetisere et plasmid i *Saccharomyces cerevisiae* der plasmidet inneholdende både en gjær alkohol dehydrogenase promoter og et bovin adrenalt cytokrom P450C21 gen. Gjærcellene eller P450 C21 genet kan brukes som en bioreaktor for syntese av steroider. 21 hydroksyprogesteron eller 11-deoksykortisol kan produseres ved å tilsette progesteron eller 17 α -hydroksyprogesteron til gjær kulturmediet. Likeså har søkerne funnet at Δ^5 -3 β -hydroksysteroider, for eksempel pregnenolon, 17 α -hydroksypregnenolon og DHEA ble omdannet til de tilsvarende acetat estere av gjær. Søkerne har også vist at denne omdanning i det vesentlige ble utført av produktet fra ATF2-genet (Cauet et al., 1999). Gjær representerer således en spesielt anvendbar organisme fra et industrielt synspunkt for fremstilling av steroidderivater.

Det er imidlertid også kjent at 17 α -hydroksyprogesteron kan, under visse betingelser, reduseres av gjær til 4-pregnen-17 α , 20 α -diol-3-on (Dumas et al., 1994), og at dannelsen av dette biprodukt påvirker synteseutbyttet og kvaliteten av sluttproduktet. Inntil nå har imidlertid den eller de enzymatiske aktiviteter som er ansvarlige for denne reaksjon av 20 α -hydroksysteroid-dehydrogenase (20 α HSD)-type ikke blitt identifisert.

Foreliggende oppfinnelse er nettopp et resultat av undersøkelser vedrørende de endogene aktiviteter i gjær som virker på hydroksyprogesteron, og beskriver påvisning av to gener som koder for enzymer med 20 α HSD-typeaktivitet. Nærmere bestemt viser den foreliggende patentsøknad at

genene GCY1 og YPR1 bærer 20 α HSD-typeaktivitet i gjær, og at produktet fra disse genene for eksempel gjør det mulig å overføre hydroksyprogesteron til biprodukter *in vitro*. Oechsner et al., FEBS letters, vol. 238, nr. 1, 1988, s. 123-128 gjør kjent en gjærstamme av arten *Saccharomyces cerevisiae* hvor genet GCY1 er erstattet av markørgenet URA3. WO 99/25865A omhandler metoder for identifisering og isolering av gener som er involvert i regulering av fungal gen-ekspressjon og angir en metode for fremstilling av en transgen fungal celle med økt sekundær metabolittproduksjon. Metoden innebærer å introdusere et fremmed gen, herav YPR1, inn i en fungal celle etterfulgt av utvelgelse av den cellen som uttrykker genet i den hensikt å produsere et protein. Transgenet kan ha en dominant-inaktiv mutasjon. Forliggende patentsøknad viser videre at suppresjon av disse geners aktivitet i gjær i vesentlig grad reduserer eller undertrykker dannelsen av biprodukter av 4-pregnen-17 α , 20 α -diol-3-on-type og gjør det mulig i vesentlig grad å forbedre synteseutbyttet av steroidderivater og/eller å overføre hydroksyprogesteron (eller forløpere derav) til steroidderivater på en mer selektiv måte. Foreliggende patentsøknad beskriver følgende nye preparater og fremgangsmåter som kan anvendes for syntese av steroidderivater med bedre selektivitet.

Foreliggende oppfinnelse gjelder en gjærstamme med redusert 20 α -hydroksysteroid-dehydrogenase (20 α HSD)-aktivitet, hvor den besitter en inaktiverende genetisk modifisering av YRP1-genet eller en inaktiverende genetisk modifisering av GCY1-genet og YRP1-genet.

Oppfinnelsen beskriver nærmere bestemt nye gjærstammer med redusert aktivitet av 20 α HSD-type som i det vesentlige ikke kan omdanne hydroksyprogesteron til biprodukter av 4-pregnen-17 α , 20 α -diol-3-on-type. Oppfinnelsen kan også anvendes for å forhøye dannelsen av slike produkter for anvendelse av disse som aktive forbindelser eller for overføring til aktive forbindelser.

En første utførelse av oppfinnelsen består nærmere bestemt i en fremgangsmåte for modifisering av en steroidforbindelse som omfatter å sette forbindelsen (eller en forløper derav) i forbindelse med en gjær med redusert 20 α HSD-typeaktivitet, nærmere bestemt en gjær med ikke-funksjonelt, fortrinnsvis oppbrutt, GCY1- og/eller YPR1-gen, mer foretrukket en gjær av slekten *Saccharomyces*, eller et preparat avledet fra en slik gjærtype.

Oppfinnelsen gjelder også anvendelse av gjær med redusert 20 α HSD-typeaktivitet, nærmere bestemt gjær med et ikke-funksjonelt, fortrinnsvis oppbrutt, GCY1- og/eller YPR1-gen, mer foretrukket en gjær fra slekten *Saccharomyces* eller et preparat avledet fra en slik gjær, for fremstilling, produksjon, syntese, modifisering og/eller forbedring av steroide forbindelser *in vitro* eller *ex vivo*.

Oppfinnelsen gjelder også enhver fremgangsmåte for fremstilling av steroidderivater fra hydroksysteroidforbindelser, nærmere bestemt hydroksyprogesteron eller forløpere derav, ved anvendelse av en gjærtype med reduserte aktivitet av 20 α HSD-type, nærmere bestemt en gjær med et ikke-funksjonelt, nærmere bestemt oppbrutt, GCY1- og/eller YPR1-gen, mer foretrukket en gjær fra slekten *Saccharomyces*, eller et preparat avledet fra en slik gjær.

Oppfinnelsen gjelder også en fremgangsmåte for omdanning av 17 α -hydroksyprogesteron, fortrinnsvis til 11-deoksykortisol, ved anvendelse av en gjærtype med redusert aktivitet av 20 α HSD-

type, nærmere bestemt en gjær med et ikke-funksjonelt, fortrinnsvis oppbrutt, GCY1- og/eller YPR1-gen, mer foretrukket en gjær fra slekten *Saccharomyces*, eller et preparat avledet fra en slik gjær.

Oppfinnelsen omfatter også anvendelse av en gjærtype med redusert 20 α HSD-aktivitet, nærmere bestemt gjær med et ikke-funksjonelt, fortrinnsvis oppbrutt, GCY1- og/eller YPR1-gen, mer foretrukket en gjær fra slekten *Saccharomyces*, eller et preparat avledet fra en slik gjær, for overføring av 17 α -hydroksyprogesteron til 11-deoksykortisol.

En annen utførelse av oppfinnelsen består også i en fremgangsmåte for modifisering av aktiviteten av 20 α HSD-type i en gjær som omfatter modifisering av aktiviteten til GCY1-genet og/eller YPR1-genet i gjæren. Den omfatter nærmere bestemt en fremgangsmåte for å redusere eller inhibere 20 α HSD-aktiviteten i en gjær som omfatter inaktivering av GCY1- og/eller YPR1-genet i gjæren, fortrinnsvis ved genoppbrytning, og ytterligere mer foretrukket, med gjær fra slekten *Saccharomyces*.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også spesielle gjærstammer med redusert aktivitet av 20 α HSD-type. Mer foretrukket omfatter denne gjær, som besitter et ikke-funksjonelt YPR1-gen, gjær som besitter et ikke-funksjonelt GCY1-gen og YPR1-gen og visse gjærtyper som besitter et ikke-funksjonelt GCY1-gen.

Oppfinnelsen gjelder også ethvert acellulært preparat avledet fra en gjær som beskrevet ovenfor, nærmere bestemt et cellelysatsat, et cellehomogenat, en dyrknings supernatant eller en derav avledet, anrikt eller (for)-renset løsning ol.

Som antydnet ovenfor, beskriver foreliggende oppfinnelse for første gang gjærstammer (eller gjærceller eller gjærkulturer) og avledede preparater med redusert eller ikke-påvisbar aktivitet av 20 α HSD-type. Oppfinnelsen beskriver faktisk påvisning av gjærgener som bærer denne aktivitet, GCY1-genet og YPR1-genet, og viser at disse genene kan modifiseres spesifikt, nærmere bestemt ved hjelp av genetiske rekombinasjonsteknikker, uten å skade cellenes vekst eller overlevelsessevne, eller deres evne til å transformere eller konvertere steroide forbindelser. Oppfinnelsen tilveiebringer således for første gang fremgangsmåte for syntese, produksjon, modifikasjon og/eller overdanning av steroide forbindelser ved anvendelse av fordelaktige gjærtyper.

Et formål for oppfinnelsen består følgelig nærmere bestemt i anvendelse av en gjærstamme (eller gjærceelle eller gjærkultur), kjennetegnet ved at den besitter en genetisk modifisering og at den har redusert 20 α HSD-aktivitet for fremstilling av steroide forbindelser. Foreliggende oppfinnelse anvender nærmere bestemt en gjærstamme som særpreges ved at den besitter:

- et genetisk modifisert GCY1-gen, eller
- et genetisk modifisert YPR1-gen, eller
- et genetisk modifisert GCY1-gen og YPR1-gen.

Nærmere bestemt er den eller de genetiske modifikasjonene som foreligger i gjærtypene ifølge oppfinnelsen inaktiverende modifikasjoner, dvs. at de fører til tap av genets aktivitet og/eller aktiviteten til det tilsvarende protein. En spesielt foretrukket type inaktiverende, genetisk

modifisering ifølge oppfinnelsen, er en genoppbrytning, som vil beskrives i detalj i den følgende teksten.

Nærmere bestemt består således oppfinnelsen i anvendelse av gjær hvor:

- GCY1-genet er ikke-funksjonelt,
- YPR1-genet er ikke-funksjonelt, eller
- GCY1-genet og YPR1-genet er ikke-funksjonelt,

for fremstilling av steroide forbindelser.

Slike gjærtyper besitter en redusert, eller ikke påvisbar, 20 α HSD-aktivitet og er spesielt fordelaktig for fremstilling, modifisering eller omdanning av steroide forbindelser.

Ifølge en foretrukket utførelse av oppfinnelsen tilhører gjærtypene mer foretrukket til slekten *Saccharomyces*, fortrinnsvis *S. cerevisiae*. I en mer spesifikk utførelse består således foreliggende oppfinnelse i fremgangsmåter eller anvendelser av celler (eller stammer, eller kulturer) av gjær av type *S. cerevisiae*, som omfatter et ikke-funksjonelt, fortrinnsvis oppbrutt, GCY1-gen og/eller YPR1-gen.

Selv om eksemplene nærmere bestemt gjelder gjærtypen *Saccharomyces cerevisiae* bør det imidlertid forsås at oppfinnelsens lære ikke er begrenset til denne spesielle gjærtypen, og at den i det vesentlige kan utvides til enhver gjærtype med en naturlig aktivitet av 20 α HSD-type, eller som inneholder et GCY1-gen eller YPR1-gen. I denne sammenheng kan spesielt nevnes gjærtypene *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* (nærmere bestemt *K. lactis*), *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* (nærmere bestemt *P. pastoris*), *Candida* (nærmere bestemt *C. maltosa*) ol., hvis dyrking i fermentorer og genetiske modifisering er beskrevet innen teknikkens stand.

For oppfinnelsens formål betyr videre uttrykket GCY1-genet GCY1-genet fra *S. cerevisiae*, som beskrevet i GenBank under referansen X96740 (Bandlow et al., Gene 90 (1), 1990, 105-114), så vel som enhver funksjonell variant eller homolog av dette som foreligger i gjærceller. På tilsvarende måte betegner YPR1-genet YPR1-genet (eller YDR368w)-genet fra *S. cerevisiae*, som beskrevet i GenBank under referansen x80642, så vel som enhver funksjonell variant eller homolog derav, som foreligger i gjærceller. Sekvensen til disse genene kan også erholdes fra andre sekvensdatabaser hvor den komplette sekvens til genomet til gjærtypen *S. cerevisiae* beskrives (Stanford University, MIPS ol.). De funksjonelle homologene kan påvises ved sekvenshomologisøk eller ved hybridiseringskloning, ved anvendelse av prober avledet fra GCY1-genet og YPR1-genet fra *S. cerevisiae*, ifølge konvensjonelle, molekylærbiologiske teknikker.

Som antydnet består foreliggende oppfinnelse i fremgangsmåter eller anvendelser av gjær som viser en genetisk modifisering av ett eller flere gener som inngår i 20 α HSD-aktiviteten, nærmere bestemt GCY1- og/eller YPR1-genet, og som fortrinnsvis har redusert, eller til og med undertykt, 20 α HSD-aktivitet.

For oppfinnelsens formål betegner begrepet "genetisk modifisering" enhver endring av genomet til en celle oppnådd ved enhver mulig fremgangsmåte, for eksempel anvendelse av mutagene midler og/eller innføring av én eller flere modifikasjoner ved genetiske eller rekombinante midler. En genetisk modifikasjon er fortrinnsvis en modifikasjon av sekvensen til minst ett gen som

fører til modifisering av genets aktivitet, og nærmere bestemt til stimulering eller, fortrinnsvis inaktivering av genet. Inaktivering av et gen, eller et gens ikke-funksjonelle natur, kan vise seg ved fravær av ekspresjon av et protein, ved ekspresjon av en ikke-funksjonell form av proteinet, grunnet én eller flere mutasjoner, delesjoner, substitusjoner, insersjoner ol., eller ved ekspresjon av proteinet i lavt nivå, slik at det ikke oppnås tilstrekkelig aktivitet. Som et resultat at dette, kan genetisk modifisering av et gen påvirke i det vesentlige hele, eller en del av, det kodende området i genet, eller et regulatorisk område i genet (en promoter el.).

Fortrinnsvis omfatter den genetiske modifisering ifølge oppfinnelsen minst én mutasjon, substitusjon, delesjon og/eller insersjon av ett eller flere basepar i det regulatoriske område eller det kodende område i den angjeldende gen. Ytterligere mer foretrukket omfatter den en modifisering via delesjon av hele, eller en del av, det angjeldende gen, som kan erstattes av fremmede sekvenser, ifølge genoppbrytningsteknikker (eller "generstatnings"-teknikker). Genetisk modifisering via delesjon og/eller insersjon foretrekkes for utførelse av foreliggende oppfinnelse, siden disse teknikkene er selektive for det angjeldende gen og er stabile over tid. Nærmere bestemt består således den genetiske modifisering av erstatning av i det minste en del av det angjeldende gen med fremmede sekvenser. Denne modifiseringen kan oppnås ved kjente teknikker som består i å fremstille et modifisert gen *in vitro*, og innføring av genet i gjærcelegenomet ved dobbel homolog rekombinasjon som beskrevet i eksemplene (se også Baudin et al., *Nucleic Acids Res.* 21 (14) (1993) 3329).

En foretrukket utførelse av oppfinnelsen består således i fremgangsmåter eller anvendelser av gjærtyper hvor hele, eller en del av, GCY1- og/eller YPR1-genet har blitt erstattet med fremmede (eller heterologe) sekvenser, for eksempel av et markørgen (som koder for antibiotikaresistens). For genoppbrytning fremstilles nærmere bestemt en rekombinant nukleinsyre *in vitro* som omfatter en utvalgt, fremmed sekvens flankert av sekvenser som er homologe med kontinuerlige eller ikke-kontinuerlige områder i det angjeldende gen. Den fremmede sekvens kan for eksempel være et markørgen, et gen som komplementerer auxotrofi, en ekspresjonshet eller lignende. Nærmere bestemt kan den fremmede sekvens være et auxotrofisk seleksjonsgen som komplementerer et næringsmessig behov i vertsgjærstammen, for eksempel URA3-genet, LEU2-genet, TRP1-genet, HIS3-genet eller ADE2-genet, et dominant seleksjonsgen, for eksempel et gen for resistens overfor et antibiotikum (G418, fleomysin, hygromysin B ol.), eller et rapportørgen (β -galaktosidase ol.). Den kan også være en ekspresjonavbrytende enhet som for eksempel omfatter en transkripsjons-terminator, fortrinnsvis en gjærterminator utvalgt blant CYC1, TDH3, TEF1 eller PGK. Det bør forstås at enhver annen fremmed sekvens (dvs. en sekvens som ikke naturlig foreligger i denne form i det angjeldende gen) som gjør det mulig å endre ekspresjonsbetingelsene for genet og/eller den faktiske struktur av protein som kodes kan anvendes i forbindelse med foreliggende oppfinnelse. Den således fremstilte nukleinsyre innføres så i gjærcellene ved konvensjonelle teknikker (litium, protoplaster og lignende), noe som fører til innføring av den fremmede sekvens i gjærgeomet, inne i sekvensene til det angjeldende gen, eventuelt slik at den erstatter et område deri, ved dobbel homolog rekombinasjon.

Det bør forstås at enhver annen teknikk for genetisk modifisering kan anvendes i forbindelse med foreliggende oppfinnelse, for eksempel setestyrte mutagenese, anvendelse av transposoner og lignende.

Spesifikke eksempler på gjærtyper med et GCY1-genet og/eller YPR1-gen inaktivert ved genoppbrytning er:

- TGY170-cellene (gcy1: : LEU2) : i TGY170-cellene har en del av GCY1-genet blitt erstattet av en nukleinsyre som koder for LEU2-proteinet, noe som tillater seleksjon av rekombinantene.
- TGY197-cellene (gcy1: : LEU2, ydr368w: :URA3) : TGY197-cellene omfatter, sammenlignet med TGY170-cellene, ytterligere en genetisk modifisering som påvirker YPR1-genet (også betegnet YDR368W-genet), hvor en del er erstattet med seleksjonsgenet URA3.
- TGY195-cellene (ydr368w: : URA3) : TGY195-cellene omfatter en genetisk modifisering som påvirker YPR1-genet (også betegnet YDR368W)-genet, hvor en del er erstattet med seleksjonsgenet URA3.
- TGY194-cellene (gcy1: : URA3) : i TGY194-cellene har en del av GCY1-genet blitt erstattet med en nukleinsyre som koder for URA3-proteinet, noe som tillater seleksjon av rekombinantene.

Slike celler utgjør også en spesiell gjenstand for oppfinnelsen. Nærmere bestemt gjelder oppfinnelsen enhver gjærceile (eller gjærstamme, eller gjærkultur) som omfatter en genetisk modifikasjon av (eller i) YPR1-genet, nærmere bestemt en delesjon og/eller en insersjon av, eller i, YPR1-genet. Oppfinnelsen gjelder også enhver gjærceile (eller gjærstamme, eller gjærkultur) som omfatter en genetisk modifikasjon av (eller i) GCY1-genet og YPR1-genet, nærmere bestemt en delesjon og/eller en insersjon av, eller i, GCY1-genet og YPR1-genet. Oppfinnelsen gjelder også acellulære preparater avledet fra slike gjærceller.

Cellene ifølge oppfinnelsen, eller som anvendes i fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen, har en fordelaktig redusert aktivitet av 20 α HSD-type, det vil si redusert med minst 20 %, fortrinnsvis med minst 40 %, mer foretrukket med minst 60 %, relativt til den ikke-genetisk modifiserte stamme. Som vist i eksemplene, viser oppfinnelsen at inaktivering av GCY1-genet i gjær fører til 95 % reduksjon av aktiviteten av 20 α HSD-type i supernatanten fra et cellehomogenat. De erholdte resultater viser også at den dobbelte, genetiske modifisering av GCY1-genet og YPR1-genet fører til undertrykkelse av aktiviteten av 20 α HSD-type, som da ikke kan påvises i supernatanten fra et cellehomogenat. Disse resultatene demonstrerer disse genes rolle og illustrerer muligheten for å modifisere dem for å forbedre gjærcellenes egenskaper for anvendelse ved produksjon av steroidderivater.

Foreliggende oppfinnelse kan anvendes for fremstilling av steroide forbindelser for forskjellige farmasøytiske formål. I denne sammenheng beskriver oppfinnelsen fremgangsmåter for fremstilling av steroide forbindelser ved anvendelse av gjærcellene ifølge oppfinnelsen. Patent-

søknaden omfatter også forbedrede fremgangsmåter for fremstilling av steroide forbindelser ved anvendelse av gjærceller med redusert 20α HSD-aktivitet. Fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen utføres fordelaktig ved å sette en populasjon av gjærceller som beskrevet ovenfor i forbindelse med en steroid forbindelse *in vitro*, fulgt av ekstraksjon av syntetiserte forbindelser. Den steroide utgangsforbindelse kan være ethvert naturlig, modifisert eller syntetisk steroid, nærmere bestemt ethvert hydroksysteroid eller en forløperforbindelse, nærmere bestemt kolesterol, progesteron, pregnenolon eller $170H$ -progesteron. Fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen kan anvendes for fremstilling av steroidderivater som 11 -deoksykortisol, kortisol, hydrokortison og lignende, eller derivater av disse.

Andre sider ved, og fordeler forbundet med, foreliggende oppfinnelse vil fremgå ved lesing av de påfølgende eksempler.

Figurtekster

Fig. 1: SDS-PAGE-analyse av en rensset fraksjon av 20α HSD-aktiviteten fra et gjærhomogenat ved kromatografi på Red120-agarose. Den øvre pil angir båndet hvis N-terminale sekvens tilsvarer GCY1, den nedre pil angir båndet som tilsvarer den N-terminale sekvens til YPR1. Spor 1 tilsvarer molekylvektmarkøren, mens spor 2 tilsvarer den rensende fraksjon av 20α HSD-aktiviteten.

Figur 2: dannelselse av 4 -pregnen- 17α , 20α -diol- 3 -on ved gjærtypen *S. cerevisiae* dyrket i galaktose (YNB-gal)- eller glukose (YPD)-medium i nærvær av $0,1$ mg/ml 17α -hydroksyprogesteron.

Fig. 3: dannelselse av 4 -pregnen- 17α , 20α -diol- 3 -on ved gjærtypen *S. cerevisiae* av villtype (wt) eller mutert i sekvensen til GCY1-genet (gcy-), dyrket i galaktose (YNB-gal)- eller glukose (YPD)-medium i nærvær av $0,1$ mg/ml 17α -hydroksyprogesteron.

Fig. 4: strukturen til plasmid for oppbryting av GCY1-genet. Plasmidet lineariseres med enzymene BamHI og HindIII og transformeres så inn i *S. cerevisiae* ifølge fremgangsmåten som beskrives i seksjonen "materialer og fremgangsmåter". Delesjonen i sekvensen til GCY1-genet omfatter promoteren og 306 bp av kodende sekvens, innbefattet translasjonsstartkodonet.

Fig. 5: strukturen av plasmid for oppbryting av GCY1-genet (plasmid pTG12010 klon 40). Plasmidet lineariseres med enzymene EcoRI og SphI og transformeres så inn i *S. cerevisiae* ifølge fremgangsmåten som beskrives i seksjonen "materialer og fremgangsmåter". Delesjonen i proteinsekvensen til GCY1 omfatter aminosyrene fra og med posisjon 47 til og med 268 . pTG12010 klon 36 har samme struktur, uten ClaI-setet i den $5'$ -ende av URA3-genet, men et HindIII-sete i den $3'$ ende av URA3-genet.

Fig. 6: strukturen til plasmidet for oppbryting av YPR1-genet (YDR368w) (plasmid pTG12011). Plasmidet lineariseres med enzymet XhoI og transformeres så inn i *S. cerevisiae* ifølge fremgangsmåten som beskrives i seksjonen "materialer og fremgangsmåter". Delesjonen i proteinsekvensen til YPR1 omfatter aminosyrene fra og med posisjon 5 til og med posisjon 198 .

Materialer og fremgangsmåter

Kjemiske produkter: 17 α -hydroksyprogesteron ble erholdt fra Hoechst Marion Roussel (Romainville, Frankrike). Tergitol, Nonidet p40 og Tyloxapol ble erholdt fra Sigma.

Enzymatisk analyse: Omdannelse *in vivo* av 17 α -hydroksyprogesteron: gjærcellene ble dyrket ved 28 °C i YPD-medium (10 ml) etter inokulering ved $A_{600} = 0,1$ fra en 24-timers forkultur. 100 μ l av en 17 α -hydroksyprogesteronløsning (10 mg/ml) i en blanding av Tergitol og etanol (1/1, vol/ vol) ble så tilsatt til kulturen. Uttak av dyrkningsvæsken (250 μ l) ble oppsamlet etter forskjellige tidsrom, og steroidene ble ekstrahert med diklormetan. Steroidene ble så separert på Ultrasphere ODS i nærvær av 45 % acetonitril ved en gjennomstrømningshastighet på 1 ml/min ved 45 °C. Disse steroidene ble påvist ved 240 nm.

Celler: *E.coli* stamme BJ5183 (Hanahan, 1983) ble anvendt for rekombinasjon *in vivo*, og stamme C600, hsdR (Hubacek og Glover, 1970) for konvensjonelle legeringsreaksjoner.

Gjærstammen FY1679-28c (MATa ura3-52 trp1-63, leu2-1 fen1 his3-200GAL (Thierry et al. 1995) ble anvendt som utgangsstamme. Stammene TGY170, TGY197, TGY194, TGY212, TGY245 og FY1679-28c/pTG10497 ble fremstilt som beskrevet i eksemplene.

Konvensjonelle molekylærbiologiske fremgangsmåter og fremgangsmåter for rekombinasjon *in vivo* i *E.coli* og i gjær ble benyttet, som beskrevet i Sambrook et al. (1989) eller i Degryse et al. (1995, 1996).

Dyrking av gjær: Gjærstammene ble generelt dyrket i syntetisk minimalmedium (Sherman, 1991) tilsatt næringsstoffer i en konsentrasjon på 100 μ g/ml. For transformasjon av *S. cerevisiae* ble cellene gjort kompetente ifølge litiumacetatteknikken (Ito et al., 1983) etter dyrking på YPD-medium (Sherman, 1991).

Resultater

Påvisning av 20 α HSD-aktiviteten som er ansvarlig for uønskede reaksjoner omfattende 17 α -hydroksyprogesteron i gjær

Den NADPH-avhengige reduksjon av 17 α -hydroksyprogesteron på C20 til 4-pregnen-17 α , 20 α -diol-3-on av gjærsorten *S. cerevisiae* har blitt beskrevet tidligere (Dumas et al., 1994). Denne aktiviteten ligner 20 α HSD-aktiviteten som er rapportert i forskjellige vev. Enzymene som har blitt karakterisert fra disse vevene er monomere med en molekylvekt på tilnærmet 35 kDa. Med det mål å påvise det eller de enzymer som er ansvarlige for 20 α HSD-aktiviteten i gjær ble det utført homologisøk med enzymet 20 α HSD fra storfetester i *S. cerevisiae*-sekvensdatabaser. Disse søk muliggjorde påvisning av 6 produkter fra gjærgener som viser fra 44 til 32 % aminosyresekvensidentitet med pattedyrenzymet. Disse genene er oppstilt i tabell I.

Med det mål å bedre karakterisere enzymene som inngår, ble aktiviteten av 20 α HSD-type fra gjær rekonstituert *in vitro* ved anvendelse av 17 α -hydroksyprogesteron og NADPH som

substrater. Forskjellige preparater avledet fra kulturer av *S. cerevisiae* ble analysert i dette systemet, som tillot lokalisering av aktiviteten til supernatanten etter sentrifugering av et cellehomogenat ved 100 000 x g. Dette resultat tyder på at enzymaktiviteten er løselig. Delvis rensing av aktiviteten av 20 α HSD-type ved Red 120-kromatografi ble så utført, noe som tillot visualisering av en dublett i 35 kDa-området etter SDS-PAGE (FIG. 1). Sekvensering av disse båndene viste at de hovedsakelig besto av produkter fra genene GCY1 og YPR1. Disse to enzymene inngår blant homologene av 20 α HSD fra storfe som er opplistet i tabell I. Den fullstendige sekvens til genene GCY1 og YPR1 er for eksempel tilgjengelig i GenBank under referansen X96740, hhv. X80642.

Det kan med fordel bemerkes at GCY1 har blitt beskrevet som kodende for aldoketoreduktase (AKR), hvis ekspresjon forhøyes signifikant i nærvær av galaktose (Magdolen et al., Gene 90(1), 1990, 105). AKR-enzymene har bred substratspesifisitet. De metaboliserer forskjellige substrater, innbefattet alifatiske aldehyder, monosakkarider, prostaglandiner og steroider. GCY1 utgjør således en god, mulig kandidat, og oppfinnerne bestemte seg for å bekrefte hvorvidt dette enzym kunne delta i dannelsen av 4-pregnen-17 α , 20 α -diol-3-on fra 17 α -hydroksyprogesteron.

Den induserende karakter av 20 α HSD-aktiviteten og ekspresjon i et cellefritt system

Eksperimentene som ble utført gjorde det mulig å vise at 20 α HSD-aktiviteten kan induseres med galaktose i gjær. Omdanning *in vivo* av 17 α -hydroksyprogesteron ble således bestemt i gjærkulturer dyrket på forskjellige karbonkilder. Forsinkelsen som observeres dersom gjærcellene dyrkes på glukose, observeres ikke i nærvær av galaktose (fig. 2). Denne observasjon er i samsvar med en repressjon ved glukose av genet som koder for 20 α HSD. Omdanningen starter etter 16 timer dersom glukosen fjernes. Omdanningen av 17 α -hydroksyprogesteron til 4-pregnen-17 α , 20 α -diol-3-on er tilnærmet 4 ganger høyere etter 48 timer dersom gjærcellene dyrkes i nærvær av galaktose. Disse resultatene ble videre bekreftet *in vivo* ved å måle 20 α HSD-aktiviteten i et cellefritt ekstrakt erholdt fra gjærceller dyrket i galaktosemedium eller glukosemedium. Den spesifikke 20 α HSD-aktivitet var henholdsvis 0,05 og 0,75 μ m/min i homogenater fra celler dyrket i glukosemedium, henholdsvis galaktosemedium.

Disse resultatene viser derfor (i) at 20 α HSD-aktiviteten bæres av produktet fra genene GCY1 og YPR1 i gjær, (ii) at enzymene er løselige, og (iii) at deres aktivitet kan forhøyes i nærvær av galaktose og undertrykkes i nærvær av glukose.

Fremstilling av gjærceller inneholdende ikke-funksjonelt GCY1-gen og/eller YPR1-gen, og cellenes egenskaper

Med det mål å bekrefte at Gcy1p var ansvarlig for 20 α HSD-aktiviteten ble genet som tilsvarer den åpne leseramme YOR120w delert («knock out») fra gjærogenomet. De erholdte resultater viser at den erholdte stamme har en svært redusert 20 α HSD-aktivitet sammenlignet med villtypestammen. Det ble videre konstruert stammer hvor YPR1-genet alene, eller i kombinasjon med GCY1 er delert, og stammene ble testet for aktivitet som beskrevet nedenfor.

Konstruksjon av gjærceller med GCY1- og/eller YPR1-mangel:

Gjærceller med mangel på GCY1- og/eller YPR1-aktivitet ble fremstilt ved genoppbryting. Nærmere bestemt:

Stammen TGY170 (FY1679-28c, *gcy1*: : LEU2) ble konstruert ved å oppbryte GCY1-genet ved hjelp av plasmid P*gcy1*: : LEU2.

Stammen TGY197 (FY1679-28c, *gcy1*: : LEU2 *ydr36w*: : URA3) ble fremstilt ved ytterligere oppbryting av YDR368w-genet (YPR1), ifølge fremgangsmåten beskrevet for ATF2 (Cauet et al., 1999), ved hjelp av plasmid pTG12011.

Stammen TGY195 ble fremstilt ved oppbryting av genet YDR368w (YPR1) ifølge fremgangsmåten beskrevet for ATF2 (Cauet et al., 1999), ved hjelp av plasmid pTG12011.

Stammen TGY194 (FY1679-28c, *gcy1*: : URA3) ble konstruert ved å oppbryte GCY1-genet ved hjelp av plasmid pTG12010.

Stammene (FY1679-28c/pTG10497 og TGY245 ble konstruert ved hjelp av plasmidene pTG10497 og pTG12045.

Følgende plasmider ble anvendt for oppbryting av GCY1-genet og YPR1-genet: *pgcy1*: LEU2, pTG12010, pTG12011 (figurene 4 – 6), pTG12086 og pTG12045. Enkopiplasmidet pTG10497 anvendes for ekspresjon av P450c21.

Plasmid *pgcy1*: : LEU2, beskrevet av Magdolen et al., Gene 90 (1990) 105-114, inneholder GCY1-genet hvor den kodende sekvens og promoteren har blitt oppbrutt av sekvensen som koder for LEU2-genet. Nærmere bestemt ble promoteren og det kodende område som tilsvarer EcoRV/HincII-restriksjonsfragmentet erstattet med HpaI-fragmentet på 2,17 kilobaser fra LEU2-genet. Følgelig ble GCY1-genets promoter og 306 basepar av den kodende sekvens delert. Plasmidet *pgcy1*: : LEU2 ble linearisert med restriksjonsenzymene HindIII og BamHI, HindIII/BamHI på 3,1 kb som inneholdt det oppbrutte gen ble fremstilt for transformasjon av gjærstammen Fy 1679-28c ved anvendelse av fremgangsmåten som beskrives av Gietz RD et al. (Yeast 15 apr. 1995, 11(4): 355-60 Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure). Koloniene ble selektert på leusinfritt medium. De positive koloniene i denne analysen dyrkes så i rikt medium for å oppnå en bioomdannning av 17OH-progesteron som beskrevet i Dumas et al. (Eur J Biochem 1. juni 1996, 238 (2) : 495-504 11 beta-hydroxylase activity in recombinant yeast mitochondria. In vivo conversion of 11-deoxycortisol to hydrocortisone). Konsentrasjonen av substratet 17OH-progesteron er 100 mg/l, karbonkilden er galaktose og den opprinnelige, optiske tetthet er 0,1. Kulturvolumet er 10 ml, inkubasjonstiden er 48 timer ved 30 °C. Etter inkubering i 48 timer evalueres de positive klonene ved å ekstrahere 1 ml medium (med cellene) med 2 ml diklorometan og så analysere den organiske fase ved revers fase høytytelsesvæskekromatografi som beskrevet ovenfor (Dumas et al., 1996). Kromatogrammene analyseres for nærvær av 17, 20-dihydroprogesteron ved å sammenligne med det rensede produkt. Under inkuberingen forekommer en mengde i størrelsesområdet 4 mg/l av 17, 20-dihydroprogesteron, dvs. 4 % av substratet, i dyrkningsmediet for villtypestammen (ikke transformert med det oppbrytende fragment), mens forekomsten av 17, 20-dihydroprogesteron for noen av transformantene nå kun er 1 mg/l. Stamme

TGY170, som omdanner en liten mengde 17OH-progesteron til 17, 20OH-progesteron og som viser identiske vekstegenskaper som villtypestammen, selekteres.

De to nye plasmidene pTG12010 og pTG12011 ble konstruert for oppbryting av GCY1-genet og YPR1-genet ved bruk av seleksjonsmarkøren URA3.

Plasmid pTG12010 ble konstruert ut fra plasmid pUC19 (Gene 1985, 33 (1) : 103-19 Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J) mens plasmid pTG12011 ble konstruert ut fra plasmid pPOLYIII (Lathe, R., Vilotte, J.-L. og Clark, J. A. Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts JOURNAL Gene 57, 193-201 (1987)).

Konstruksjon av plasmidene pTG12010 og pTG12011

Konstruksjonen for oppbryting av GCY1-genet med URA3-genet i plasmid pUC19 for erholdelse av pTG12010 ble oppnådd ved fire på hverandre følgende PCR-amplifiseringer. På den ene side ble tre uavhengige PCR-reaksjoner utført for erholdelse av den 5' del av GCY1-genet (PCR1), det funksjonelle URA3-gen flankert av GCY1-sekvenser (PCR2) og den 3' del av GCY1-genet (PCR3), 5'- og 3'-delen av GCY1-genet ved hjelp av primerparene OTG11285, OTG11286 og OTG11287, OTG11289 på et genomisk DNA-templat fra stamme Fy1679-28c. Sekvensen til oligonukleotidene er som følger:

OTG11285: GATTTCGGTAATCTCCGAACAggtaccAATTATATCAGTTATTACCCGGGA (SEQ ID NO: 1);

OTG11286: AGCCATCTTTCAAAGCGGTT (SEQ ID NO: 2);

OTG11287: CCGATCGAATCAAAACGAACAG (SEQ ID NO: 3);

OTG11289: TCTAATCAGCTAGTAAGAAC (SEQ ID NO: 4).

URA-genet, flankert av GCY1-sekvensene (slik at det oppnås en delesjon av del av den kodende sekvens i GCY1-genet) amplifiseres ved hjelp av oligonukleotidene OTG11305 (aacgctttgaaagatggctATCGATTTTCAATTCAATTCATCATTTTTTTTTTTATTCTTTTTTTTTTG, (SEQ ID NO: 5) og OTG11306

(ctgttcgttttgattcgatcgggAAGCTTGGGTAATAACTGATATAATTAATTGAACTC (SEQ ID NO: 6) fra et linearisert plasmid pTG10054 templat (Degryse et al., In vivo cloning by homologous recombination in yeast using a two-plasmid-based system. Yeast. 15. juni 1995, 11(7): 629-40). Når det gjelder buffer og konsentrasjon av templat og primere for amplifiseringen, er som beskrevet av produsenten av ett eller flere TAQ DNA polymerase, nærmere bestemt enzymet elongase, utviklet av Life Technologies. Temperatursyklusene er som følger: en første syklus på 6 minutter og 30 sekunder for denaturering av primer og templat, og så 30 sykluser bestående av 30 sekunder ved 93 °C, 2 minutter ved 54 °C og 3 minutter ved 68 °C, den siste syklus består av 5 minutter ved 72 °C. Produktene PCR1, PCR2 og PCR3 ble sammenblandet i ekvimolare mengder og igjen amplifisert ved hjelp av oligonukleotidene OTG11285 og OTG11289 (se ovenfor). Sluttproduktet PCR4 på 1,9 kilobaser, subklones så mellom restriksjonssetene for KpnI og BamHI i plasmid pUC19 for erholdelse av plasmid pTG12010. Strukturen av plasmidet ble kontrollert ved restriksjonskartlegging

og nukleotidsekvensering av endene. Kloningen av pTG12010 gjorde det faktisk mulig å erholde to versjoner av dette plasmid, versjonen pTG12010#40 (pTG12010 klon 40) og pTG12010#36 (pTG12010 klon 36). Det opprinnelige ønsket var å erholde GCY1-genet avbrutt av URA3-genet, flankert av et ClaI-sete og et HindIII-sete i 5', henholdsvis 3', ende av genet. Faktisk ble det erholdt to forskjellige plasmider, pTG12010#36 og pTG12010#40. Disse to plasmidene avviker fra hverandre kun når det gjelder nærvær eller fravær av ClaI- og HindIII-setet i endene av URA3-genet. Plasmid pTG12010#40 har et HindIII-restriksjonssete i den 3' ende av URA3-genet, men intet ClaI-sete i den 5' ende. Plasmid pTG12010#36 har intet HindIII-sete i den 3' ende, men et ClaI-sete i genets 5' ende.

Denne egenskap anvendes for erholdelse av plasmidet som besitter URA3-genet flankert av et HindIII-sete og et ClaI-sete og som bryter opp den kodende sekvens i GCY1.

Konstruksjon av plasmid pTG12036

Plasmid pTG12036 ble konstruert i 4 trinn fra pTG10802. Plasmid pTG10801 (som er utgangspunktet for plasmid pTG10802) er et plasmid av pUC-type i hvilket en rekke restriksjonsseter har blitt innsatt mellom XhoI og XhoI-setene. Denne serien av seter omfatter seter for HindIII, SnaBI, ClaI og SpeI. Mellom HindIII-setet og ClaI-setet ble HindIII-ClaI-kassetten fra pTG10470 (som beskrevet nedenfor), som omfatter promoteren TEF1, det humane cDNA p450c21 og PGK-terminatoren, innsatt mellom HindIII-setet og ClaI-setet i pTG10801 for erholdelse av pTG10802. Dette plasmid ble så kuttet med XhoI, og følgelig deleres den innsatte kassett for innføring av et PCR-fragment flankert av XhoI-seter. Dette fragment på 2,5 kb erholdes ved amplifisering med oligonukleotidparet (OTG11844 (tttgctcgaggttacagaagggc, SEQ ID NO: 13) og OTG11845 (gattctcgagcaattggctgacta, SEQ ID NO: 14) og plasmid pTG12010 (#40) som templat for erholdelse av et fragment flankert av XhoI-seter som inneholder GCY1-genet oppbrutt av URA3-genet, flankert i 5' ende av et ClaI-restriksjonssete. Dette fragment ble klonet mellom XhoI-setene i plasmid pTG10802 for erholdelse av plasmid pTG12035. Med det mål å innføre det manglende HindIII-setet ble plasmid pTG2010 (#36) anvendt. Dette plasmid er i det vesentlige identisk med pTG12010 (#40), men besitter et HindIII-sete 3' for URA3-genet på grensen til GCY1-genet og mangler et ClaI-sete 5' for URA3-genet på grensen til GCY1-genet. Rekombinasjon utføres *in vivo* i *E.coli* mellom NcoI-BamHI-fragmentet på 2,2 kb fra pTG12010 (#36) (som bærer fra 5' til 3' ende et fragment av URA3-genet, og i den 3' ende, et fragment av GCY1-genet) og en del av plasmid pTG12035, dvs. det store StuI-AflIII-fragmentet på 4,45 kb. Det erholdte plasmid, pTG12036, omfatter GCY1-genet avbrutt av URA3-genet, flankert av ClaI-setet og et HindIII-setet i den 5', henholdsvis 3', ende.

Konstruksjon av plasmid pTG12086

Dette fragment erstattes så med ekspresjonskassetten for P450c21 som ligger på ClaI-HindIII-fragmentet på 2,33 kb fra plasmid pTG10469 (se nedenfor) for erholdelse av plasmid pTG12036.

Konstruksjon av ekspresjonsplasmidene for cytokrom P450c21

For overekspressjon av dette protein i gjær ble det benyttet to promotertyper, TEF1 ("transkripsjonsforlengelsesfaktor 1") og TDH3 (glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase 3"). I alle tilfeller er transkripsjonsterminatoren PGK-terminatoren.

I disse plasmidene bærer Sall-MluI-fragmentet cDNA for humant P450c21.

Konstruksjon av plasmidene pTG10470 og pTG10469

Plasmid pTG10298 ble erholdt ved å modifisere pMAc21 (Expression and functional study of wild-type and mutant human cytochrome P450c21 in *Saccharomyces cerevisiae*. Wu DA, Hu MC, Chung BC DNA Cell Biol apr. 1991, 10 (3) : 201-9)) med kutting med KpnI og MluI og innføring av oligonukleotidet OTG5868. cDNA i dette plasmid erholdes fra American Type Culture Collection under navnet pc21/3c. Dette er EcoRI-BamHI-fragmentet på 1,6 kb som fungerte som utgangspunkt for konstruksjon av de forskjellige plasmidene. De innførte modifikasjoner beskrives i artikkelen ovenfor og i artikkelen (Expression of human 21-hydroksylase (P450c21) in bacterial and mammalian cells: A system to characterize normal and mutant enzyme Meng-Chun Hu og Bon-chu Chung DNA and Cell Biology apr. 1991, 10 (3) 201-209).

I denne fremgangsmåte ble den ikke-kodende del av P450c21 i plasmid pMAc21, som inneholder ekspresjonskassetten for P450c21, fjernet, så vel som KpnI-setet som foreligger deri. Plasmid pTG10292 ble erholdt ved å overføre det humane c21-cDNA (Sall, MluI-fragment) fra plasmid pTG10298 til plasmid pTG10031 ved hjelp av Sall-setet og MluI-setet. Plasmid pTG10475 ble erholdt ved PCR og rekombinasjon. Med utgangspunkt i plasmid pTG10292 ble et fragment av det humane P450c21-cDNA som omfatter tilnærmet 250 nukleotider amplifisert ved hjelp av oligonukleotidene OTG7410 (GGAATTCCGTCGACAAAAATGCTGCTGGGCCTGCTGC, SEQ ID NO: 15) og OTG5927 (CCTCAATGGTCCTCTTGGAGTTCAGCACC, SEQ ID NO:16). Dette fragment representerer den kodende sekvens for humant P450c21, flankert av et Sall-sete og sekvensen AAAA, som beskrevet i oligonukleotid OTG7410. Dette fragment ble kuttet med Sall og så ligert inn i det lineære fragment av pTG10292 kuttet med Sall, hvoretter et rekombinasjons-eksperiment ble utført i stamme BJ5183. Det erholdte plasmid pTG10475 bærer et cDNA for P450c21 med en kodende sekvens som er identisk med den kodende sekvens i det naturlige cDNA, i motsetning til plasmid pMAc21 på et fragment som er kompatibelt med vektorene oppfinnerne anvender i laboratoriet, dvs. et fragment som er flankert av restriksjonsseter for Sall og MluI. Dette fragment har følgende sekvensmiljø rundt ATG-kodonet for translasjonsinitiering GTCGACAAAAATGCTGCTCCTGGGCCTGCTGC (SEQ ID NO: 17). Fra dette plasmid ble Sall-MluI-fragmentet som omfatter det humane P450c21-cDNA overført til plasmid pTG10158 (Degryse et al., 1996) ved konvensjonell kloning for erholdelse av plasmid pTG10472. Dette samme Sall-MluI-fragment fra plasmid pTG10472 ble så overført ved rekombinasjon til plasmid pTG10085 (Degryse et al. 1996) for erholdelse av plasmid pTG10469. Dette samme fragment, som omfatter P450c21-cDNA på et Sall-MluI-restriksjonsfragment, ble overført til plasmid pTG10092 for

erholdelse av plasmid pTG10470 (Degryse et al., 1996). Dette plasmid bærer følgende cDNA for humant P450c21 under kontroll av TEF1-promoteren og en PGK-terminator, med en URA3-d-seleksjonsmarkør med et ATG-initeringskodonmiljø som beskrevet ovenfor.

Konstruksjon av plasmid pTG12086

Dette plasmid benyttes for integrasjon av en ekspresjonskasset for P450c21 og for samtidig oppbryting av GCY1-genet.

Dette plasmid ble konstruert fra plasmid pTG12036 og plasmid pTG10614.

Dette siste plasmid ble konstruert fra pTG10212 (Degryse et al., Yeast 11: 629-640 (1995)) som er et gjærekspresjonsplasmid basert på en TDH-promoter, en PGK-terminator og en URA3-d-seleksjonsmarkør.

Ved homolog rekombinasjon i *E.coli* erstattes seleksjonsmarkøren med seleksjonsmarkøren fra plasmid pTG10054 (Degryse et al., 1995), for å oppnå dette rekombineres MluI-FspI-fragmentet på 2,1 kb fra pTG10054, som inneholder URA3-markøren flankert av rekombinasjonssekvenser, med det store HindIII-fragment fra pTG10212 for erholdelse av plasmid pTG10610, som har de samme egenskaper som pTG10212 (Degryse et al., 1995), med en URA3-markør i samme orientering som pTG10054. SalI-MluI-fragmentet som omfatter cDNA for humant cytokrom P450c21 fra plasmid pTG10472 (se ovenfor) overføres til plasmid pTG10610 for erholdelse av plasmid pTG10614. ClaI-HindIII-fragmentet fra denne plasmid, som fra 5' til 3' ende inneholder TDH3-promoteren, cDNA for humant P450c21 flankert et SalI-sete og MluI-sete og så PGK-terminatoren, overføres til plasmid pTG12036 for erholdelse av plasmid pTG12086, som følger inneholder sekvensen av GCY1-genet oppbrutt av TDH3-ekspresjonskassetten for humant cytokrom P45c21.

Konstruksjon av plasmid pTG12045

Det unike SphI-setet i plasmid pPolyIII ødelegges ved å innsette det komplementære oligonukleotidpar OTG11975 (AAATCGATAACATG, SEQ ID NO: 18) og OTG11976 (TTATCGATTTCATG, SEQ ID NO: 19). SphI-setet i pPolyIII ødelegges og erstattes med en ClaI-sete for erholdelse av plasmid pTG12040. I plasmid pTG12040, mellom det unike ClaI-setet og det unike EcoRI-setet, innføres et genomisk ClaI-EcoRI-DNA-fragment som tilsvarer den 3' del på 0,7 kb fra YPR1-genet, erholdt ved amplifisering med oligonukleotidene OTG11981 (ATTGATATCGATAAAAAGCACGGCGTTGAG, SEQ ID NO: 20) og OTG11982 (TCTCGGAATTCAGGTACTGCAGCCAG, SEQ ID NO: 21), for erholdelse av plasmid pTG12041. I dette plasmid pTG12041 på 2,84 kb kloner den 5' del av YPR1-genet (0,66 kb), amplifisert med oligonukleotidene OTG11314 (tagcctcgagACGTTGGTGTTCATTGATATTCA, SEQ ID NO: 22) og OTG11980 (CAACTAAGCTTCATTCAAATAGATAGCCGC SEQ ID NO: 23) fra genomisk DNA fra villtype-gjær, i form av et XhoI-HindIII-fragment mellom SalI-setet og HindIII-setet i plasmid pTG12041. Plasmid pTG12042 på 3,5 kb erholdes. Dette plasmid bærer YPR1-genet avbrutt av ClaI-setet og HindIII-setet. Mellom disse setene kloner cytokrom P450c21-

kassetten i form av et ClaI-HindIII-fragment på 2,33 kb, erholdt fra plasmid pTG10469. Således erholdes plasmid pTG12045.

Konstruksjon av plasmid pTG10497

Dette plasmid er et ekspresjonsplasmid med lavt kopitall (av ARS-CEN-type) som inneholder en ekspresjonskasset for humant cytokrom P450c21, som foreligger under kontroll av TDH3-promoter og PGK-terminatoren. Dette plasmid ble konstruert fra plasmid pTG10434, som inneholder URA3-seleksjonsmarkøren og TEF1-promoter, PGK-terminatoren og et gjær-replikasjonsorigo av ARSH4/CEN6-type ((Degryse et al., 1995).

Dette plasmid ble modifisert til å inneholde en LEU2-markør og promoteren TDH3 i stedet for markøren URA3 og promoteren TEF1. For å oppnå dette ble SpeI-MluI-fragmentet som inneholder LEU2-markøren flankert av rekombinasjonsfragmenter, som er PGK-terminatoren og et fragment av replikasjonsorigo, klonet ved rekombinasjon i stedet for URA3-området i plasmid pTG10434, kuttet med HindIII, for erholdelse av plasmid pTG10466. I dette plasmid pTG10466 er TEF1-promoter erstattet med TDH3-promoter ved å rekombinere i *E.coli* HindIII-EcoRI-fragmentet fra pTG10212 ((Degryse et al., 1995) (som inneholder *E.coli*-replikasjonsorigo, promoteren TDH3 og terminatoren PGK) med MluI-FspI-fragmenter fra pTG10466, som inneholder LEU2-markøren og ARSCEN-replikasjonsorigo flankert av rekombinasjonssekvensene, således erholdes pTG10612. Mellom Sall-setet og MluI-setet i dette plasmid, plasseres ekspresjonskassetten TDH3: : humant P450c21-cytokrom og terminatoren for erholdelse av plasmid pTG10497.

Konstruksjon av de defisiente stammer

For erholdelse av stammen som mangler GCY1-aktivitet, transformeres stamme FY 167928c med plasmid pTG121010 linearisert med enzymene SphI og EcoRI ved litiumacetat-metoden beskrevet ovenfor. De transformerte kloner selekteres på urasilfritt medium og analyseres så ved koloniamplifisering ved hjelp av oligonukleotidparet OTG11285, OTG11289 og OTG11285, OTG11306 og ved å anvende som templat et ekstrakt eller preparat av genomisk gjær-DNA ifølge betingelsene beskrevet ovenfor. Koloniens som viser PCR-produkter av forventet størrelse, 1,9 kb og 1,4 kb, dyrkes så i rikt medium for å utføre en bioomdanning av 17OH-progesteron som beskrevet i Dumas et al. (Eur J Biochem 1. Juni, 1996 238 (2) : 495-504 11 beta-hydroxylase activity in recombinant yeast mitochondria. In vivo conversion of 11-deoxycortisol to hydrocortisone). Substratkonsentrasjonen er 100 mg/l, karbonkilden er galaktose og den innledende, optiske tetthet er 0,1. Dyrkningsvolumet er 10 ml, og inkubasjonstiden er 24 timer ved 30 °C. Etter 24 timers inkubering evalueres de positive klonene ved å ekstrahere 1 ml medium (med cellene) med 2 ml diklormetan og så analysere den organiske fase ved revers fase høytytelsesvæskerkromatografi som beskrevet ovenfor (Dumas et al. 1996). Stammene TGY194 #10 og TGY194 #11 mangler 20-keto reduktaseaktivitet på 17OH-progesteron og gir et positivt PCR-signal.

Innføring av en oppbryting av YPR1 (YDR368w)-genet med URA3-genet i plasmid pPOLYIII for erholdelse av pTG12011 ble oppnådd ved 4 på hverandre følgende PCR-reaksjoner.

På den ene side ble tre uavhengige PCR-reaksjoner utført for erholdelse av den 5' del av YPR1-genet (PCR 5), det funksjonelle URA3-gen flankert av YPR1-sekvenser (PCR 6) og den 3' del av YPR1-genet (PCR 7). PCR 5-DNA ble erholdt ved amplifisering fra et genomisk DNA-templat med oligonukleotidene OTG11314 (tagctcgagACGTTGGTGTCATTGATATTCA, (SEQ ID NO: 7) og OTG11315 (CTTCATTCAAATAGATAGCCG, (SEQ ID NO: 8), likeså erholdes PCR 7-DNA ved amplifisering ved hjelp av oligonukleotidene OTG11316 (TATGGCTAAAAAGCACGGCTT, (SEQ ID NO: 9) og OTG11317 (cgatctcgagTTTCTCGTTGTTTCAGGTAAGT, (SEQ ID NO: 10) på samme templat. URA3-genet flankert av det 5' og 3' YPR1-område amplifiseres ved hjelp av oligonukleotidene OTG11463 (CGGCTATCTATTTGAATGAAGatcgatttcaattcaattcatcattttttttattctttttttg, (SEQ ID NO: 11) og OTG11464 (AACGCCGTGCTTTTTAGCCATAAGCTTgggtaataactgatataattaaattgaactc, (SEQ ID NO: 12) fra et linearisert pTG10054-templat som beskrevet ovenfor. PCR 5-, PCR 6- og PCR 7-produktet ble blandet i ekvimolare mengder og så amplifisert ved PCR ved hjelp av oligonukleotidene OTG11314 og OTG11317 for erholdelse av et 1, X kb PCR 8-produkt som beskrevet ovenfor. Dette PCR 8-produkt ble kuttet med enzymet XhoI og så subklonet i plasmid pPOLYIII kuttet med XhoI. Orienteringen av innskuddet i plasmid pPOLYIII ble bestemt ved kutting med enzymene NcoI og EcoRI.

Merkelig nok ble det oppdaget fravær av et ClaI-sete og et HindIII-sete i plasmid pTG12010 henholdsvis pTG12011. Kloningsovergangene ble kontrollert ved nukleotid-sekvensering.

Konstruksjon av stamme TGY195.

Plasmid pTG12011 kuttet med enzymet XhoI, og spaltningsproduktet anvendes så for transformasjon av stamme Fy 1679-28c ved anvendelse av litiumkloridfrem-gangsmåten sitert ovenfor. Transformantene selekteres på uracilfritt medium. Transformantene analyseres ved PCR-amplifisering og anvendelse av oligonukleotidene som ble anvendt for konstruksjon av plasmid pTG12011. De positive kloner i denne analysen analyseres så ved 17OH-progesteronbioomdanningsfremgangsmåten beskrevet ovenfor i nærvær av glukose som karbonkilde. En klon TGY195#4, utvelges for ytterligere karakterisering.

Konstruksjon av stamme TGY197

En klon TGY195#4, som viser redusert 20-keto reduktaseaktivitet under disse betingelser, utvelges for ny transformasjon med plasmidet pgcy1::LEU2 som beskrevet ovenfor for stamme Fy1679-28c. Klonene som kan vokse i fravær av leucin utvelges så for en ny bioomdanning av 17OH-progesteron som beskrevet ovenfor i nærvær av glukose eller galaktose. En klon, TGY197#a som viser redusert aktivitet under de to bioomdanningsbetingelsene utvelges. 20-keto reduktaseaktiviteten, som opprinnelig var 12 % (ved en substratkonsentrasjon på 100 mg/l) er således redusert til tilnærmet 0,2 %, dvs. mer enn 60 gangers reduksjon.

Konstruksjon av stamme TGY245

Stamme TGY245 konstrueres fra stamme TGY195#4. Fra stamme TGY195#4 erholdes først stamme TGY212#1, fulgt av stamme TGY243#1 og endelig stamme TGY245.

Stamme TGY195#4 transformeres ved anvendelse av både plasmid YRP7 (1 µg) og 5 µg av plasmid pTG12045 kuttet med NotI. De transformerte stammer selekteres på tryptofanfritt medium. Koloniene (678 kolonier) videredyrkes på tryptofanhaltig medium (for fjerning av plasmid YRP7) og på medium inneholdende tryptofan og 5-fluororotat (5FO) for seleksjon av kolonier som har mistet URA3-genet som oppbryter GCY1-genet. Én koloni utvelges i denne analyse, TGY212#1. Denne koloni undersøkes i et bioomdanningseksperiment som beskrevet ovenfor med 100 µg/ml 17OH-progesteronsubstrat, stammen dyrkes i et minimalmedium tilsatt nødvendige aminosyrer og uracil. Denne stamme kan omdanne 17-progesteron til 11-deoksykortisol med en effektivitet på rundt 47 % over 24 timer, med en lav dannelse av 4-pregnen-17 α , 20 α -diol-3-on under disse betingelsene (< 0,5 %). Under visse betegnelser (definert rikt medium av Kappeli-typen med galaktose som karbonkilde og ved å starte kulturen ved høy tetthet: OD 600 nm = 5) økes evnen til å redusere ketonet slik at den når 11 % av utgangssubstratet, med en bioomdanningssevne redusert til 1,5% av utgangssubstratet. Under disse betingelser har det sannsynlige nærvær av GCY1-genet negativ virkning på bioomdanningen av 17OH-progesteron. Det ble derfor bestemt å oppbryte GCY1-genet for å fjerne dets aktivitet.

For å oppnå dette ble stamme TGY212#1 transformert med 3 µg plasmid pTG12010#36 linearisert med restriksjonsenzymene SphI og EcoRI. Tjuesju transformanter ble selektert på et minimalmedium supplementert for auxotrofiene forbundet med TGY212#1, men uten uracil. Disse koloniene ble undersøkt ved biomedanningsanalyser i et minimalmedium tilsatt galaktose som karbonkilde, siden dette sukker er en kjent GCY1-induser. Alle GY243-kloner viste evne til å omdanne 17OH-progesteron til 11-deoksykortisol uten samtidig dannelse av påvisbare mengder av 4-pregnen-17 α , 20 α -diol-3-on. En TGY243#1-klon ble utvalgt for innføring av en ekspresjonskassett for humant P450c21 istedenfor URA3-genet.

Denne stamme TGY243#1 transformeres med plasmid i YRP7 (2µg) og med plasmid pTG12086 linearisert med enzymet XhoI (5 µg). Det transformerende pTG12086-fragment inneholder den kodende sekvens i GCY1 oppbrutt av en ekspresjonskassett for humant P450c21 (TDH3::humant cDNAP450c21::PKG^oterminator). Koloniene som vokser i fravær av tryptofan utvelges. Disse 381 koloniene overføres så til et medium som inneholder tryptofan og 5-fluororotat. Tilnærmet ti kolonier analyseres så i et rikt medium av YPG-type tilsatt tryptofan, histidin, leucin og uracil i en konsentrasjon på 50 : mg/ml. Stammene får så omdanne 17OH-progesteron i en konsentrasjon på 100 µg/ml og ved start på en OD600 nm på 0,1 i 16 timer.

Blant disse 10 klonene utvelges en klon TGY245#1D basert på to kriterier, først og fremst evnen til å omdanne 17OH-progesteron til 11-deoksykortisol og dernest fravær av dannelse av 4-pregnen-17 α , 20 α -diol-3-on, noe som viser oppbryting av GCY1.

Egenskaper ved stammene som mangler GCY1:

De beholdte resultater viser at "Knock Out" av GCY1 fjerner 20 α HSD-aktiviteten som kan indueres med galaktose. Dannelse *in vivo* av 4-pregnen-17 α ,20-diol-3-on fra 17 α -hydroksyprogesteron (100 μ g/ml) ble således analysert i en kultur av villtypestammer og av stammer TGY170 (*gcy1*- Δ ::LEU2), dyrket enten i glukosemedium eller i galaktosemedium (Fig. 3). For kulturen i galaktosemedium observeres en reduksjon på tilnærmet 95 % i dannelsen av 4-pregnen-17 α , 20 α -diol-3-on for den mutante stamme, sammenlignet med villtypestammen. I glukosemedium er reduksjonen lavere, noe som antyder at GCY1-genproduktet omfatter en 20 α HSD-aktivitet som kan indueres med galaktose. Uavhengig av karbonkilden foreligger en restaktivitet i mutanten *gcy1*- Δ , som i det vesentlige er identisk.

Egenskaper ved dobbeltmutanten som mangler GCY1 og YRP1:

Ut fra det faktum at *Gcy1p* og *Ypr1p* ble funnet assosiert med 20 α HSD-aktiviteten (se ovenfor) og at *Ypr1p* er den nærmeste homolog av *Gcy1p* (65 % aminosyreidentitet) ble en dobbel oppbryting av GCY1 og YPR1 utført og analysert for aktivitet av 20 α HSD-type. De beholdte resultater viser at stammen som mangler de to genene (TGY197) i det vesentlige er fri for 20 α HSD-aktivitet.

Nærmere bestemt ble gjærstammen TGY197 (*gcy1*::LEU, *ypr1*::URA3) frembrakt og analysert *in vivo* for 20 α HSD-aktivitet. Cellene ble dyrket med enten glukose eller galaktose som karbonkilde i nærvær av 100 μ g/ml 17 α -hydroksyprogesteron. Etter 72 timer kan 4-pregnen-17 α ,20 α -diol-3-on ikke påvises i fermenteringsvæsken, noe som viser at inaktivering av de to genene fører til suppresjon av den påvisbare 20 α HSD-aktivitet.

Villtypestammens og den mutante stammes substratspesifisitet

En serie forbindelser som allerede er beskrevet som substrater for forskjellige klasser av reduktaser (aldosereduktase, aldehydreduktase og karbonylreduktase) ble analysert i villtype-homogenater og homogenater fra mutante stammer under forskjellige dyrkningsbetingelser (Tabell II). Det observeres at *Gcy1p* og *Ypr1p* er de eneste aldo-ketoreduktaser fra gjær som aksepterer 17 α -hydroksyprogesteron som substrat.

Gcy1p ser ut til å benytte alle de analyserte substrater, siden induksjon med galaktose i alle tilfeller forhøyer aktiviteten. I glukosemedium ble en basalaktivitet observert for alle forbindelser, bortsett fra 17 α -hydroksyprogesteron, uavhengig av hvorvidt *Gcy1p* og *Ypr1p* forelå eller ikke. I galaktosemedium ble en høyere aktivitet observert i den mutante stamme for de to analyserte aldehyder, om enn mindre utvalgt enn for villtypestammen. Dette tyder på at et enzym forskjellig fra *Gcy1p*, spesifikt for aldehyder, kan indueres med galaktose.

I en nyere rapport vedrørende gjærs fysiologi under osmotisk stress ble GCY1 vist å være reaktiv. Sekvensering av et peptid isolert fra en glyserol med hydrogenase fra *Aspergillus niger* har vist homologi med to gjærproteiner: *Gcy1p* og *Ypr1p*. Induksjon av GCY1 under osmotisk stress (i tillegg til induksjon med galaktose) kan tyde på at GCY1 omfatter en

glyseroldehydrogenaseaktivitet, som foreslått av Norbeck og Blomberg. En slik aktivitet har imidlertid til nå ikke blitt påvist.

Reduksjonen av 17α -hydroksyprogesteron til 4-pregnen- $17\alpha,20\alpha$ -diol-3-on i *S. cerevisiae* skyldes hovedsakelig GCY-genproduktet og i mindre grad YPR1-genproduktet. Ifølge nomenklaturen foreslått av Jez et al. (1997), bør disse enzymene klassifiseres i underfamilien AKR1C. I pattedyr har HSD, som tilhører AKR-familien, blitt foreslått å regulere tilgjengeligheten av steroidhormoner. Disse enzymers fysiologiske rolle i gjær forblir ukjent, siden gjær ikke antas å kunne eksponeres overfor steroider i et naturlig miljø. Uavhengig av den biologiske betydning av en slik aktivitet i gjær bidrar fjerning av aktiviteten til forbedret dannelse av kortikosteroider fra gjær, nærmere bestemt fra genetisk modifisert gjær ifølge oppfinnelsen.

Eksempel på bioomdanning med humant P450c21 i gjær i nærvær og i fravær av GCY1 og YPR1.

Med det mål å vise at oppbryting av GCY1 og YPR1 er nødvendig for å oppnå en spesifikk bioomdanning i gjærarten *S. cerevisiae* sammenlignet med evnen til stammene Fy1679-28c/pTG10497 (Fy/pTG10497), TGY212 #1 og TGY245#2D å bioomdanne 17OH-progesteron.

Stamme Fy/pTG10497 bærer de to villtypegenene GCY1 og YPR1 og énkopi-plasmid av ARSCEN-type ("Autonomously Replicating Sequence Centromer") for ekspresjon av humant P450c21. cDNA for humant P450c21 er under kontroll av TEF1-promoteren i dette plasmid.

Stamme TG212#1 bærer en kopi av ekspresjonskassetten for det humane P450c21-gen (TEF1::humant P450c21::PGK-terminator) integrert i YPR1-locus og har en villtypekopi av GCY1-genet.

TGY245#2D har ingen kopier av YPR1-genet og GCY1-genet, isteden er en kopi av kassetten TEF1::humant P450c21 henholdsvis en kopi av TDH3:P440c21 integrert i disse loci.

Disse stammene ble dyrket i minimalmedium tilsatt casaminosyrer i 48 timer. Stammene resuspenderes i friskt Kappeli-medium tilsatt uracil, histidin og tryptofan i nærvær av 200 mg/l 17OH-progesteron. Etter inkubering i 72 timer ekstraheres mediet i nærvær av gjærcellene og analyseres som ovenfor ved revers fase- høytytelsesvæskrokromatografi. Nærvær av 17OH progesteron, 11-deoksykortisol og 4-pregnen- $17\alpha, 20\alpha$ -diol-3-on måles.

Resultatene gis i Tabell III. Hvert produkt er angitt som prosentandelen av summen av alle produkter.

Ifølge dette eksperiment fremgår det klart at oppbryting av GCY1 og YPR1 i vesentlig grad reduserer mengden 4-pregnen- $17\alpha, 20\alpha$ -diol-3-on fra 7-11 % til et nivå som ikke kan påvises ved våre teknikker (følsomhet 0,5 til 1 mg/l).

REFERANSER

- Amberg et al. (1995), *Yeast* 11, 1275-1280.
- Cauet et al. (1999), *Eur.J. Biochem.* 261, 317-324.
- Degryse. et al. (1995), *J.Biotech.* 39, 181-187.
- Degryse, E. (1996), *Gene* 170, 45-50.
- Degryse. et al. (1995), *Yeast* 11, 629-640.
- Dumas et al (1994), *Cytochrome P450*, 8th International Conference, Ed. M. C. Lechner, John Libbey Eurotext, Paris, pp. 527-530.
- Dumas et al (1996), *Eur.J.Biochem.* 238, 495-504.
- Duport et al (1998), *Nat.Biotech.* 16, 1-6.
- Hanahan, D. (1983) *J.Mol.Biol.* 166, 557-580.
- Hubacek et al (1970), *J.Mol.Biol.* 50, 111-127.
- Ito et al (1983), *J.Bact.* 153, 163-168.
- Miller et al (1988), *Endocrine Revs* 9, 295-318.
- Sakaki et al (1989), *DNA* 8, 409-418.
- Sakaki et al (1991), *Pharmacogen.* 1, 86-93.
- Sambrook et al (1989), *Cold Spring Harbor University Press*, 2nd utgave, Cold Spring Harbor.
- Sherman, F. (1991), *Methods Enzymol.* 194, 3-21.
- Thierry et al (1995), *Yeast* 11, 121-135.
- WU et al (1991), *Saccharomyces cerevisiae DNA Cell Biol.* 10, 201-209.
- JP 2031680A
- Oechsner Ulrich et al., *FEBS Letters*, vol. 238, no. 1, 1988, s. 123-128
- WO 9925865 A

Tabell I

ORF	Gennavn	% aminosyreidentitet med 20 α HSD
YOR120W	GCY1	44
YDR368W	YPR1	43
YHR104W	-	41
YBR149W	-	40
YJR096W	-	39
YDL124W	-	32

Tabell II

	Fy1679,28c		TGY170		TGY197	
	glukose	galaktose	glukose	galaktose	glukose	galaktose
xylose	8	50	5	8	3	5
metylglyoksal	75	376	92	88	56	104
glyseraldehyd	32	1119	40	357	42	384
nitrobenzaldehyd	59	1117	69	334	50	395
17 α -hydroksyprogesteron	0,04	1,44	0,006	0,01	nd	nd

Tabell III

Produkt	Fy/10497	TGY212#1	TGY245#2
17OH progesteron	74	87	28
11-deoksykortisol	19	20	82
4-pregen-17 α , 20 α -diol-3-on	7	11	0

P a t e n t k r a v

1. Gjærstamme med redusert 20 α -hydroksysteroid-dehydrogenase (20 α HSD)-aktivitet, k a r a k t e r i s e r t v e d at den besitter en inaktiverende genetisk modifisering av YRP1-genet eller en inaktiverende genetisk modifisering av GCY1-genet og YRP1-genet.
2. Gjærstamme ifølge krav 1, hvor den genetiske modifisering omfatter minst én mutasjon, substitusjon, delesjon og/eller insersjon av ett eller flere basepar i det regulatoriske område eller det kodende område i den angjeldende gen.
3. Gjærstamme ifølge krav 2, hvor den genetiske modifisering er en delesjon av hele, eller en del av, det angjeldende gen.
4. Gjærstamme ifølge krav 3, hvor delesjonen av hele, eller en del av, det angjeldende gen er erstattet av fremmede sekvenser, ifølge genoppbrytningsteknikken.
5. Gjærstamme ifølge krav 4, hvor den fremmede sekvensen er et auxotrofisk seleksjons-gen som komplementerer et næringsmessig behov i vertsgjærstammen, et dominant seleksjons-gen, slik som et gen for resistens overfor et antibiotikum eller et rapportørgen.
6. Gjærstamme ifølge krav 5, hvor det auxotrofisk seleksjonsgenet er URA3-genet, LEU2-genet, TRP1-genet, HIS3-genet eller ADE2-genet.
7. Gjærstamme ifølge ethvert av kravene 1 til 6, hvor gjærstammen er av slekten *Saccharomyces*.
8. Gjærstamme ifølge krav 7, hvor den er en stamme av arten *Saccharomyces cerevisiae*.
9. Gjærstamme ifølge ethvert av kravene 1 til 8, hvor den omfatter et oppbrutt GCY1-gen og et oppbrutt YRP1-gen.
10. Fremgangsmåte for fremstilling av steroidderivater fra hydroksysteroid-forbindelser, k a r a k t e r i s e r t v e d at det benyttes en gjær med redusert 20 α HSD aktivitet og hvor gjæren har ett eller flere ikke-funksjonelle GCY1- og/eller YRP1-gener, eller et preparat avledet fra en slik gjær.
11. Fremgangsmåte ifølge krav 10, hvor gjærstammen besitter en inaktiverende genetisk modifisering av YRP1-genet og/eller GCY1-genet.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 10 eller 11, hvor hydroksysteroidet er hydroksoy-progesteron eller en forløper derav.
13. Fremgangsmåte ifølge krav 12, hvor hydroksysteroidet er 17 α -hydroksoy-progesteron og steroidderivatet er 11-deoksykortisol.
14. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 10 til 13, hvor gjæren har et oppbrutt GCY1-gen og et oppbrutt YPR1-gen.
15. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 10 til 14, hvor gjæren er en gjær fra slekten *Saccharomyces*.
16. Anvendelse av en gjær med redusert 20 α HSD-aktivitet og med et ikke-funksjonelt YRP1-gen og/eller GCY1-gen eller et preparat avledet fra en slik gjær for fremstilling, produksjon, syntese, modifisering og/eller modifisering av steroide forbindelser *in vitro* eller *ex vivo*.
17. Anvendelse ifølge krav 16 hvor gjærstammen besitter en inaktiverende genetisk modifisering av YRP1-genet og/eller GCY1-genet.
18. Anvendelse ifølge krav 17, hvor gjæren har et oppbrutt GCY1-gen og et oppbrutt YPR1-gen.
19. Anvendelse ifølge krav 18, hvor gjæren er en gjær fra slekten *Saccharomyces*.

SEQUENCE LISTING

<110> AVENTIS PHARMA SA

5 <120> Modified yeasts and uses, in particular for the
production of steroidal derivatives

<130>

10 <140>
<141>

<160> 23

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 50
<212> DNA

20 <213> Artificial sequence

<220>
<223> Artificial sequence description:
oligonucleotide

25 <400> 1
gattcggtaa tctccgaaca ggtaccaatt atatcagtta ttaccggga 50

<210> 2
<211> 20
30 <212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Artificial sequence description:
35 oligonucleotide

<400> 2
 agccatcttt caaagcggtt 20

<210> 3
 <211> 22
 5 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Artificial sequence description:
 10 oligonucleotide

<400> 3
 ccgatcgaat caaaacgaac ag 22

<210> 4
 15 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 20 <223> Artificial sequence description:
 oligonucleotide

<400> 4
 tctaatacagc tagtaagaac 20

25 <210> 5
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

30 <220>
 <223> Artificial sequence description:
 oligonucleotide

<400> 5
 aaccgctttg aaagatggc atcgattttc aattcaattc atcattttt ttttattct 60
 ttttttg 67

<210> 6
 <211> 60
 <212> DNA
 5 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Artificial sequence description:
 oligonucleotide
 10
 <400> 6
 ctgttcgctt tgattcgatc gggaagcttg ggtaataact gatataatta aattgaactc 60

 <210> 7
 <211> 32
 15 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Artificial sequence description:
 oligonucleotide
 20
 <400> 7
 tacgctcgag acgttggtgl cattgatatt ca 32

 <210> 8
 25 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 30 <223> Artificial sequence description:
 oligonucleotide

 <400> 8
 cttcattcaa atagatagcc g 21

 35 <210> 9
 <211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 5 <223> Artificial sequence description:
 oligonucleotide

 <400> 9
 tatggctaaa aagcacggcg tt 22

 10 <210> 10
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 15 <220>
 <223> Artificial sequence description:
 oligonucleotide

 <400> 10
 cgatctcgag tttctcgttg ttcaggtact g 31

 20
 <210> 11
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 25
 <220>
 <223> Artificial sequence description:
 oligonucleotide

 <400> 11
 cggctatcta tttgaatgaa gatcgatttt caattcaatt catcattttt tttttatttc 60
 tttttttg 68
 30

 <210> 12
 <211> 58
 <212> DNA
 35 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence description:
oligonucleotide

5

<400> 12
aacgcctgctc ttttagcca taagcttggg taat~~aa~~ctga~~ta~~tataattaa ttgaactc 58

<210> 13

<211> 23

10 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence description:
oligonucleotide

15

<400> 13
tttgctcgag gttacagaag ggc 23

<210> 14

20 <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

25 <223> Artificial sequence description:
oligonucleotide

<400> 14
gattctcgag caattggctg acta 24

30 <210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

35 <220>

<223> Artificial sequence description:
oligonucleotide

<400> 15
ggaattccgt cgacaaaaat gctgctcctg ggctgctgc 40

5

<210> 16
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence

10

<220>
<223> Artificial sequence description:
oligonucleotide

<400> 16
cctcaatggt cctcttggag ttcagcacc 29

15

<210> 17
<211> 32
<212> DNA
20 <213> Artificial sequence

<220>
<223> Artificial sequence description:
oligonucleotide

25

<400> 17
gtcgacaaaa atgctgctcctgggctgct gc 32

30

<210> 18
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Artificial sequence description:
oligonucleotide

35

<400> 18
 aaatcgataa catg 14

<210> 19
 <211> 14
 5 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 10 <223> Artificial sequence description:
 oligonucleotide

<400> 19
 ttatcgattt catg 14

<210> 20
 15 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 20 <223> Artificial sequence description:
 oligonucleotide

<400> 20
 attgatatcg ataaaaagca cggcgttgag 30

25 <210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

30 <220>
 <223> Artificial sequence description:
 oligonucleotide

<400> 21
 tctcggaatt caggtactgc agccag 26

35

<210> 22
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

5

<220>
<223> Artificial sequence description:
oligonucleotide

<400> 22
tacgctcgag acgttggtgt cattgatatt ca 32

10

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

15

<220>
<223> Artificial sequence description:
oligonucleotide

20

<400> 23
caactaagct tcattcaaat agatagccgc 30

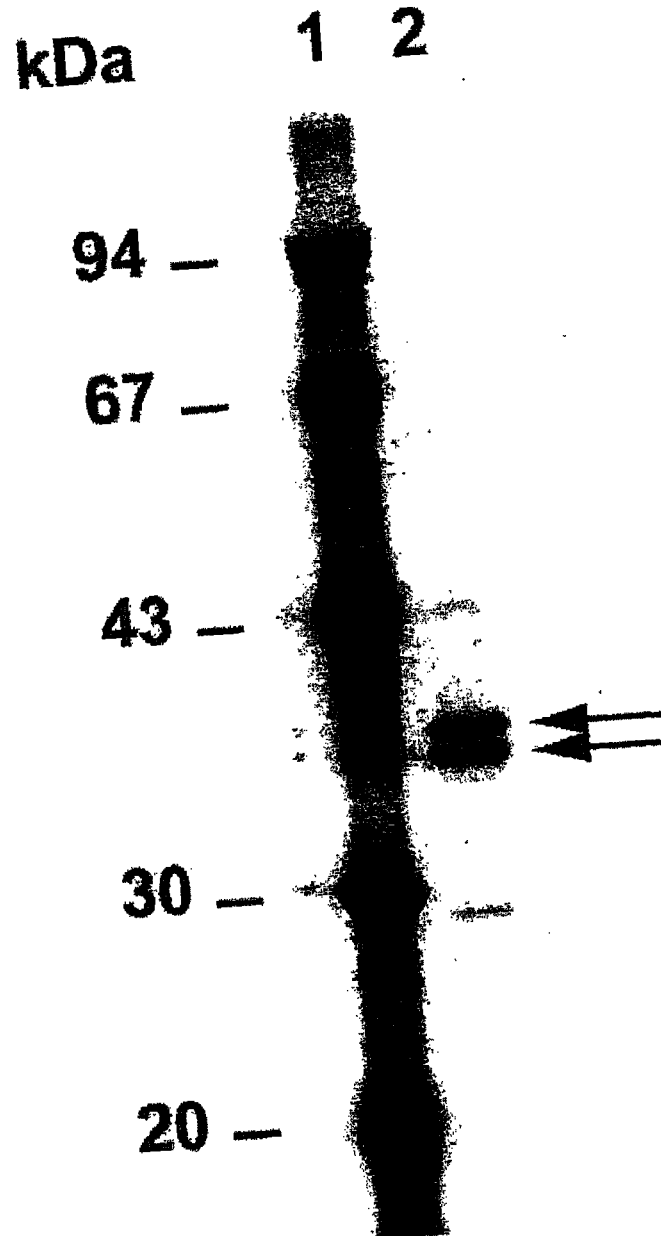


Figure 1

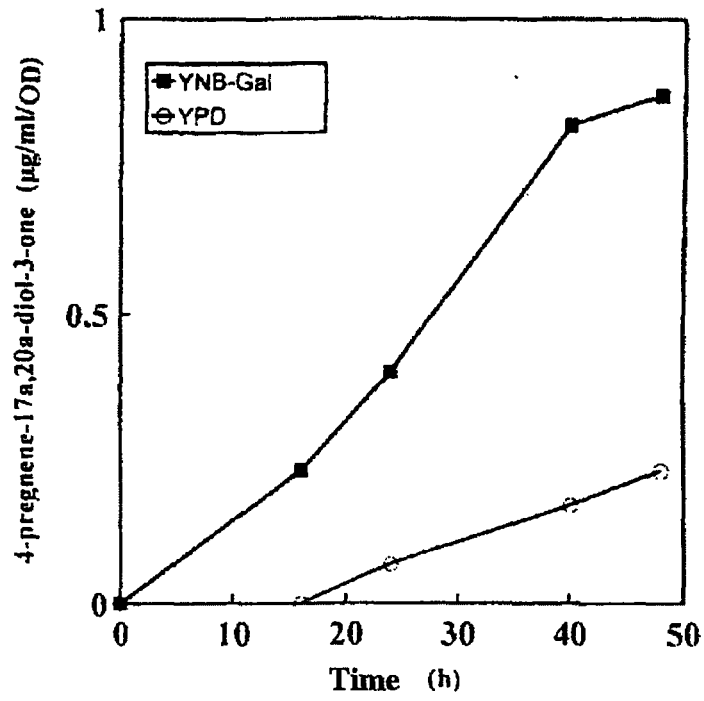


Figure 2

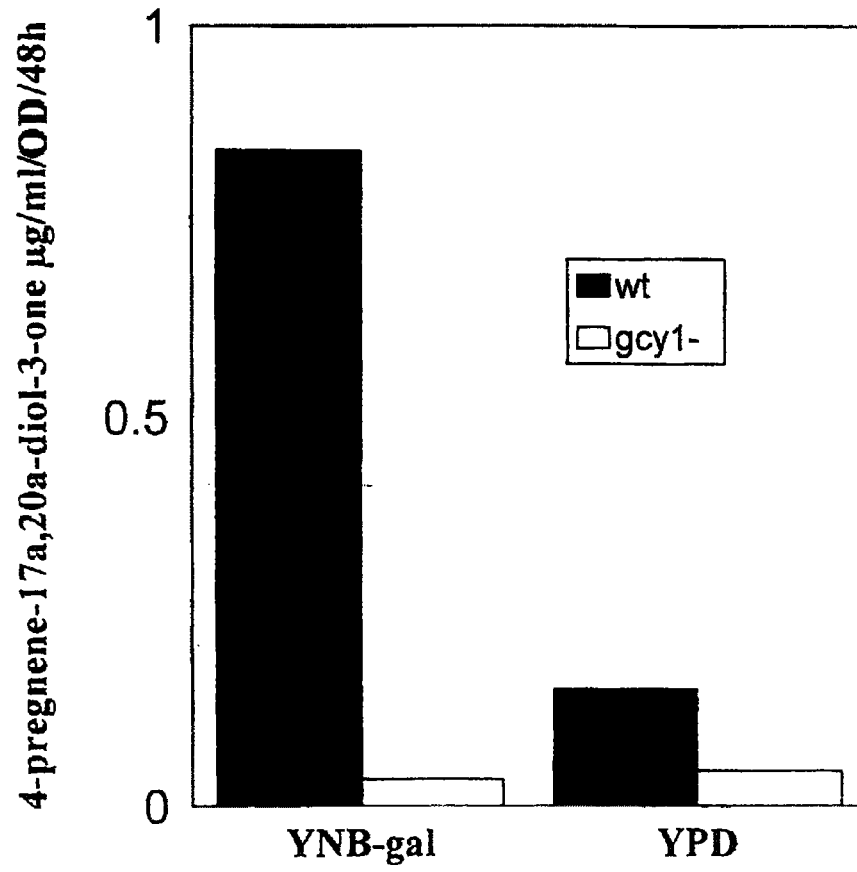


Figure 3

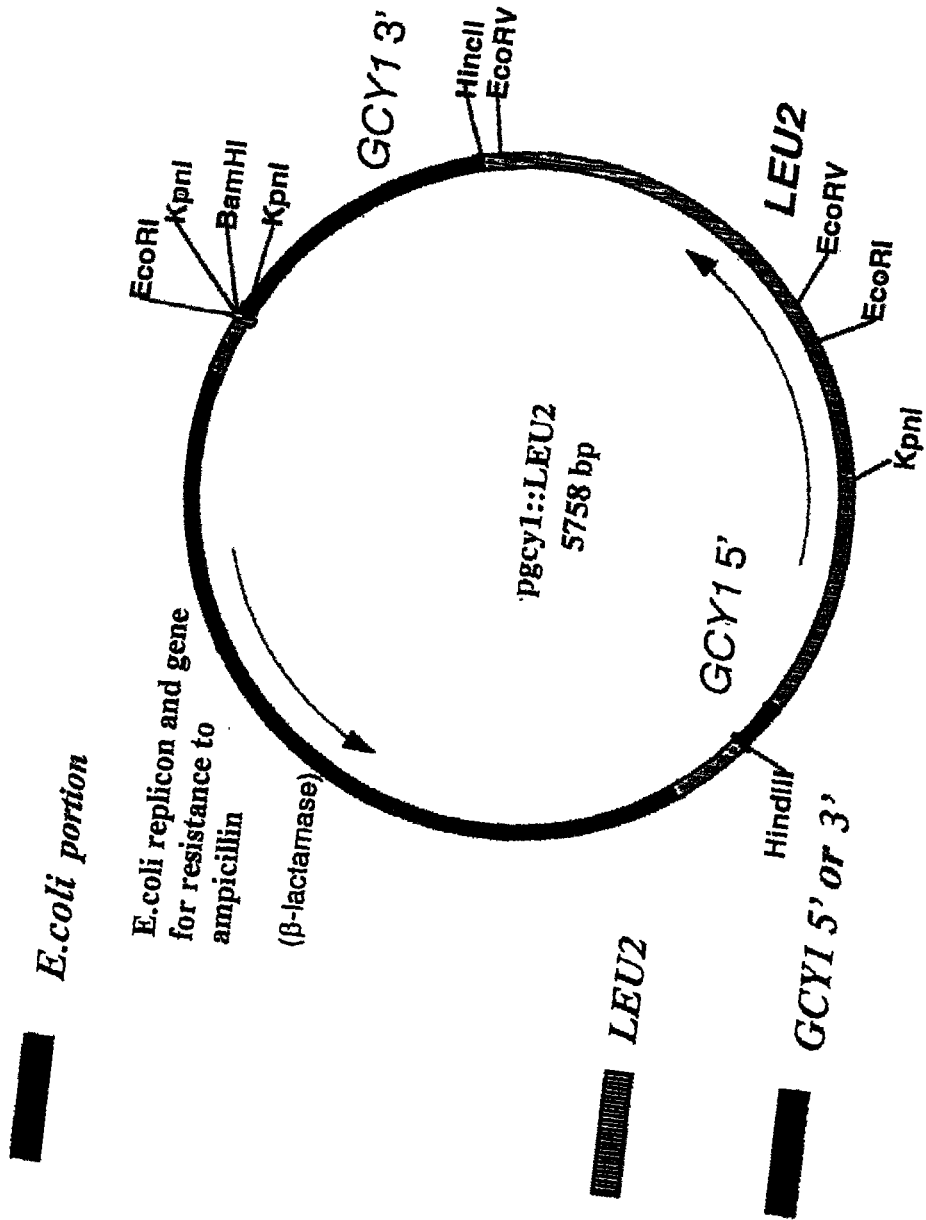


Figure 4

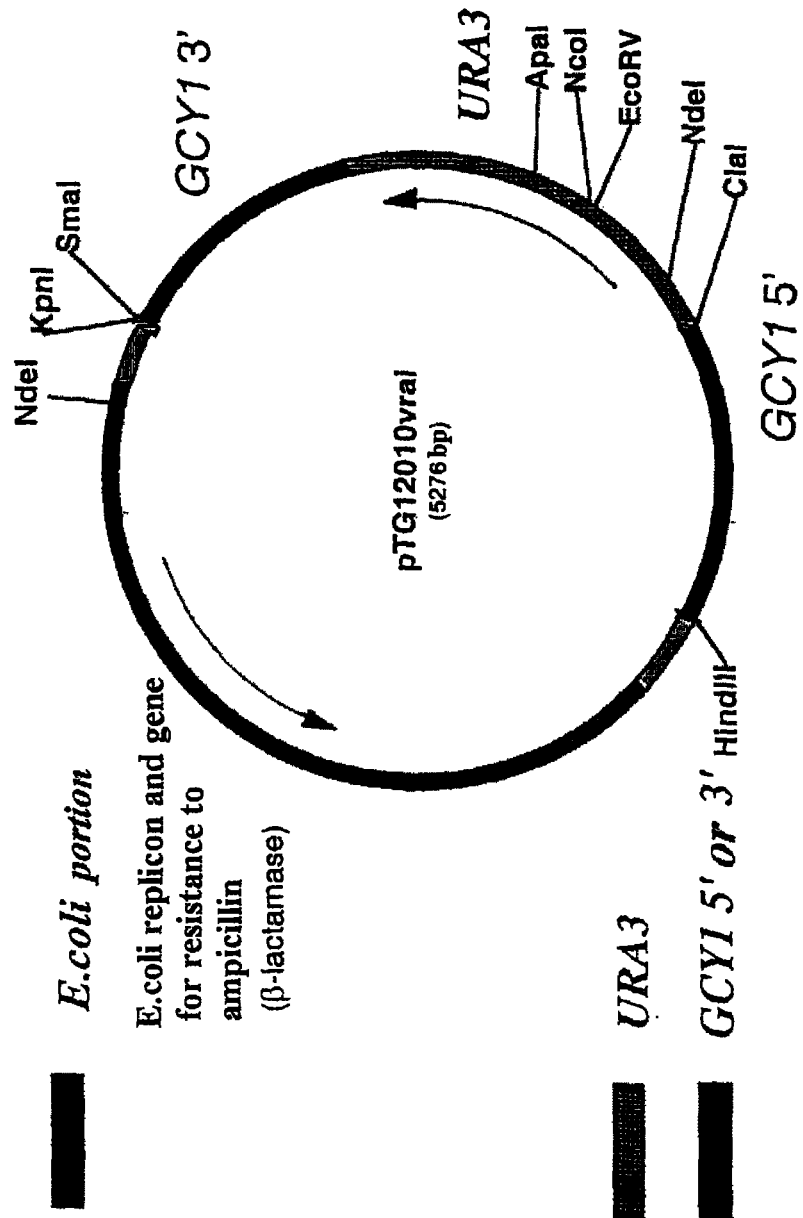


Figure 5

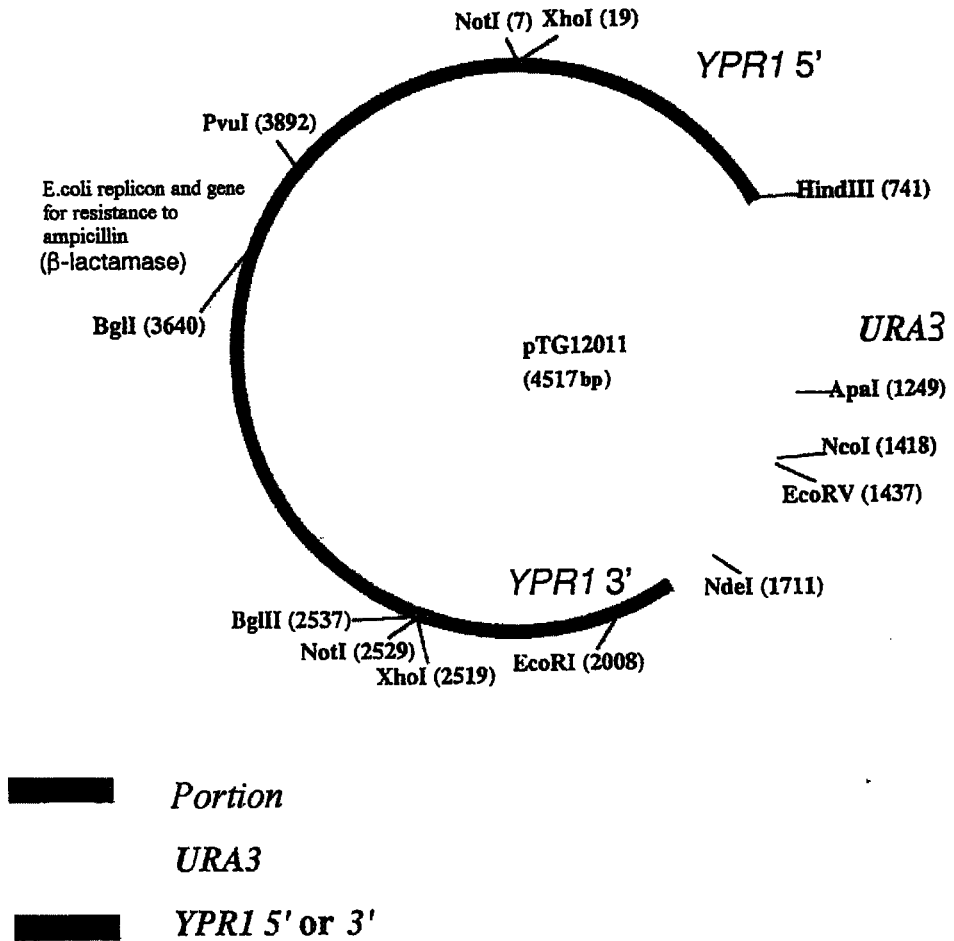


Figure 6