



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0206809-5 B1



(22) Data do Depósito: 29/01/2002

(45) Data de Concessão: 22/04/2020

(54) Título: CEPAS DE LEVEDURAS QUE PRODUZEM ESTERÓIDES DE MODO AUTÔNOMO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM ESTEROIDE

(51) Int.Cl.: C12P 33/00; C12P 33/08; C12P 33/18.

(52) CPC: C12Y 114/15004; C12P 33/005; C12P 33/08; C12P 33/18; C12Y 114/15006; (...).

(30) Prioridade Unionista: 31/01/2001 FR 01 01294.

(73) Titular(es): AVENTIS PHARMA S.A.

(72) Inventor(es): ROBERTO SPAGNOLI; TILMAN ACHSTETTER; GILLES CAUET; ERIC DEGRYSE; BRUNO DUMAS; DENIS POMPON; JACQUES WINTER.

(86) Pedido PCT: PCT FR2002000348 de 29/01/2002

(87) Publicação PCT: WO 2002/061109 de 08/08/2002

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/07/2003

(57) Resumo: "CEPAS DE LEVEDURAS QUE PRODUZEM ESTERÓIDES DE MODO AUTÔNOMO". A presente invenção refere-se a cepas de leveduras geneticamente modificadas e que produzem de maneira autônoma, a partir de uma fonte de carbono simples, esteróides. A invenção também refere-se a um processo de produção de esteróides a partir de tais cepas de levedura.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"CEPAS DE LEVEDURAS QUE PRODUZEM ESTERÓIDES DE MODO AUTÔNOMO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM ESTEROIDE"**.

[001] A presente invenção refere-se à produção de esteróides nos microorganismos, notadamente as cepas de leveduras.

[002] Os esteróides, notadamente os esteróides derivados do colesterol, estão implicados em numerosos processos fisiológicos dentre os quais podem ser citados a regulação das taxas de glicídios e colesterol na circulação sanguínea, a manutenção e o desenvolvimento da massa muscular, o desenvolvimento do sistema nervoso central.

[003] Dentre os inconvenientes observados em caso de desregulação das taxas de esteróides circulantes, podem ser citados o aparecimento de doenças auto-imunes, tais como o lúpus, de certos cânceres, por exemplo o câncer de mama, de doenças cardiovasculares, por exemplo a arteriosclerose. Problemas de regulação de esteróides também são suspeitos no caso do aparecimento de certas doenças neurológicas tais como as doenças de Parkinson ou de Alzheimer.

[004] Os esteróides, notadamente a hidrocortisona, podem ser utilizados como agentes terapêuticos como tal ou como complementos em outros tratamentos. Assim, os derivados de síntese dos glicocorticóides são utilizados por suas ações antiinflamatórias e, em grandes doses, imunossupressoras.

[005] A obtenção dos esteróides está atualmente ligada a processos de extração ou de síntese custosos. John Warcup Cornforth foi o primeiro a realizar a síntese total de um esteróide, o colesterol, por um método enzimático. No entanto, é importante dispor de um método que permite obter os esteróides de interesse, notadamente os derivados do colesterol, a um preço abordável.

[006] Um certo número de proteínas implicadas na biossíntese dos esteróides foram expressas na levedura. Assim, a patente EP 360 361 demonstra a atividade das proteínas P450 17 α e P450c21 na levedura *Kluyveromyces lactis*. Do mesmo modo, foi descrita a possibilidade de conversão *in vivo* de 11 deoxicortisol em hidrocortisona em uma levedura geneticamente modificada que expressa a P450c11 (Dumas *et al.*, 1996), assim como a produção de 17 α -hidroxiprogesterona a partir de pregnenolona na levedura (Degryse *et al.*, 1999). Além disso, Duport *et al.*, (Duport *et al.*, 1998) descreveram a síntese de pregnenolona e de progesterona em uma levedura geneticamente modificada. Também foi descrito no pedido de patente WO 99/40203 que a inativação do gene *ATF2* em uma cepa de levedura permite evitar a acetilação dos esteróides produzidos por essa cepa.

[007] A presente invenção permite realizar a síntese de esteróides, pela fermentação de cepas de leveduras geneticamente modificadas, em presença de uma fonte de carbono simples. O método proposto pela presente invenção permite portanto que se obtenha uma grande quantidade de esteróides de interesse a baixo custo, visto que o processo emprega a fermentação de leveduras e a adição de uma fonte de carbono simples, facilmente disponível no comércio.

Definições:

[008] Por fonte de carbono simples, de acordo com a presente invenção, entende-se fontes de carbono utilizáveis pelo profissional para o crescimento normal de uma levedura. Entende-se designar notadamente os diferentes açúcares assimiláveis, tais como a glicose, a galactose ou a sacarose, ou os melaços, ou os subprodutos desses açúcares. Uma fonte de carbono simples mais especialmente preferida são o etanol e o glicerol.

[009] Por derivado de um esteróide, entende-se designar, de acordo com a presente invenção, um composto que pode ser obtido, notadamente por uma ou duas reações enzimáticas ou químicas, a partir dos ditos esteróides. Entende-se especialmente designar os esteróides acetilados, hidroxilados, ou que portam um substituinte tal como um derivado halogenado (flúor, iodo), ou um grupo metila.

[0010] Os problemas a resolver para que se possa produzir esteróides em um microorganismo são de diferentes tipos:

- é conveniente eliminar as reações parasitas que podem ser observadas em razão da presença de enzimas endógenas no microorganismo escolhido,

- é conveniente introduzir os genes que permitem a modificação dos intermediários de síntese de tal modo para que os níveis de expressão obtidos sejam os mais próximos possíveis dos níveis observados nos mamíferos. Assim, recriar os equilíbrios corretos é uma condição importante do sucesso de um tal projeto,

- é conveniente obter um nível de expressão dos diferentes genes que permite orientar preferencialmente a biossíntese na direção do esteróide escolhido.

[0011] A síntese dos esteróides é uma sequência de reações extremamente complexas, que empregam várias enzimas para obter o cortisol a partir do colesterol.

[0012] É conveniente primeiro produzir o 20,22 diidroxicolesterol, que é então transformado em pregnenolona, ela própria hidroxilada em 17- α hidróxi-pregnenolona. Essa última é então transformada em 17- α hidróxi-progesterona, que dá o desoxicortisol, que leva ao cortisol (hidrocortisona).

[0013] Uma via alternativa consiste na produção de pregnenolona, e depois de progesterona, transformada em 17- α hidróxi-progesterona.

[0014] Foi mostrado que é possível produzir pregnenolona na

levedura, a partir de uma fonte de carbono simples, (Duport et al., 1998, cujo conteúdo é incorporado como referência no presente pedido). Para fazer isso, foi necessário suprimir uma via endógena (por ruptura do gene Δ 22-esterol-desaturase (*ERG5*) da via de biossíntese endógena dos ergosteróis), a fim de obter uma acumulação de produtos saturados em C-22. De fato, o ergosterol normalmente fabricado pela levedura difere do colesterol por uma insaturação em C-7(8) do núcleo B, uma insaturação em C-22, e um grupo metila adicional em C-24. Assim, os produtos saturados em C-22, e em C-7 no núcleo B podem ser utilizados como substratos pelas enzimas situadas na cadeia de produção do cortisol.

[0015] A presente invenção permite realizar a síntese de esteróides, e notadamente os esteróides situados mais a jusante que a pregnenolona, de modo simples, pela fermentação de cepas de leveduras geneticamente modificadas, na presença de uma fonte de carbono simples. Em um caso especial da invenção, os esteróides sintetizados são excretados no meio de cultura, o que significa a purificação dos mesmos. O método proposto pela presente invenção permite portanto que se obtenha uma grande quantidade de esteróides de interesse, a baixo custo, visto que o processo emprega a fermentação de leveduras e a adição de uma fonte de carbono simples, facilmente disponível no comércio.

[0016] De modo preferido, os esteróides que podem ser produzidos pela cepa de levedura de acordo com a invenção são esteróides compreendidos na via de síntese do cortisol, assim como enunciados acima. Também é possível produzir outros tipos de esteróides, a partir da 17- α hidróxi-pregnenolona, notadamente a diidroepiandrosterona (DHEA), pela ação da enzima 17- α -hidroxilase e liase, e os esteróides derivados (androstenedionas, testosterona...). Esses esteróides podem ser produzidos por introdução das enzimas

apropriadas na cepa de levedura, do mesmo modo que para a cepa exemplificada na presente invenção.

[0017] Para a execução do método de acordo com a invenção, a invenção refere-se também a uma cepa de levedura, geneticamente modificada que produz um esteróide ou um derivado de esteróide, caracterizada pelo fato de que ela permite a produção de maneira autônoma a partir de uma fonte de carbono simples.

[0018] O fato de que a produção seja efetuada de maneira autônoma significa que não há necessidade de acrescentar substratos para obter o esteróide de interesse, mas sim que a levedura pode produzi-lo unicamente a partir da fonte de carbono simples de partida. Também está claro que a cepa pode produzir um esteróide da via metabólica, por utilização de um substrato situado a montante na via metabólica, na medida em que a cepa de levedura de acordo com a presente invenção contém todos os genes necessários para a completação da via metabólica de produção dos esteróides.

[0019] De preferência, a cepa de levedura de acordo com a invenção produz um esteróide ou derivado de esteróide que é um derivado do metabolismo do colesterol, ou melhor que faz parte da cadeia de metabolismo do colesterol. O metabolismo do colesterol é bem conhecido pelo profissional, e está explicitado nas obras de bioquímica e de endocrinologia.

[0020] Assim, de preferência, o dito esteróide ou derivado de esteróide está compreendido notadamente no grupo constituído pela 17α -hidróxi pregnenolona, pelo cortisol, pela cortisona, pela cortexolona, pela 17α -hidróxi progesterona, e pelos derivados desses esteróides.

[0021] Também é possível produzir a pregnenolona e a progesterona com uma cepa de levedura de acordo com a presente invenção.

[0022] Assim, a presente invenção tem notadamente como objeto uma cepa de levedura geneticamente modificada que produz, de maneira autônoma a partir de uma fonte de carbono simples, um esteróide ou um derivado de esteróide, derivado do metabolismo do colesterol, caracterizada pelo fato de que o dito esteróide ou derivado de esteróide está compreendido no grupo constituído pela 17α -hidróxi pregnenolona, pela hidrocortisona, pela cortexolona, pela 17α -hidróxi progesterona, e pelos derivados desses esteróides.

[0023] Assim como será visto mais adiante a cepa de levedura de acordo com a presente invenção apresenta pelo menos uma modificação genética escolhida no grupo constituído pela ruptura ou inativação de um gene endógeno, pela modificação do promotor de um gene endógeno, pela duplicação de um gene endógeno, pela introdução de pelo menos um gene heterólogo, em uma ou várias cópias, de modo epissomal ou cromossomal.

[0024] Por outro lado é vantajoso que a cepa de levedura da invenção apresente uma combinação das ditas modificações gênicas.

[0025] Assim como explicitado mais adiante, a cepa de levedura apresenta pelo menos uma ruptura de um gene endógeno escolhido no grupo constituído por *ERG5*, *ATF2*, *GCY1*, *YPR1*, *ARE1*, *ARE2*, *ATF1*, *ADE2*, em um primeiro modo de realização.

[0026] Em um modo de realização preferido, a cepa de levedura de acordo com a invenção apresenta uma ruptura dos genes endógenos *ERG5*, *ATF2*, *GCY1*, *YPR1*. Assim como descrito mais adiante, esses genes codificam para as proteínas que induzem reações parasitas na levedura.

[0027] O gene *ADE2* no que lhe diz respeito pode também ser rompido de modo opcional, notadamente para integrar um gene heterólogo na cepa de levedura.

[0028] Em um modo de realização, a cepa de levedura de acordo

com a invenção apresenta pelo menos um gene heterólogo integrado no cromossomo, a pelo menos um locus escolhido entre *ADE2*, *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *GCY1*, *ATF2*, *YPR1*, a integração sendo efetuada de maneira intragênica na proximidade imediata com um dos loci.

[0029] Em um modo de realização da invenção, a dita cepa de levedura apresenta pelo menos um gene heterólogo situado em um plasmídeo de cópias múltiplas ou um plasmídeo de pequeno número de cópias, o dito plasmídeo de cópias múltiplas sendo escolhido entre os plasmídeos à base de um replicon 2 microns de levedura que se replicam em *Saccharomyces cerevisiae* e o dito plasmídeo de pequeno número de cópias sendo escolhido entre os plasmídeos baseados em uma origem de replicação ARS cromossômica com um centrômero de levedura.

[0030] Para a execução de um modo de realização da invenção, e assim como desenvolvido mais abaixo, a cepa de levedura de acordo com a invenção apresenta pelo menos um gene ou um cDNA heterólogo escolhido no grupo constituído pelo gene da esterol $\Delta 7$ -redutase e pelos cDNA do citocromo P450 SCC, da adrenodoxina, da adrenodoxina redutase, do citocromo b5, da 3β -hidroesteróide desidrogenase isomerase, da citocromo P450 redutase, do citocromo P450 C17, do citocromo P450 C21, do citocromo P450 C11, e das sequências que codificam para essas proteínas.

[0031] Esses genes ou cDNA heterólogos estão sob o controle de uma sequência promotora escolhida no grupo constituído pelas sequências promotoras endógenas de levedura *TDH3*, *TEF1*, *PGK1*, *CYC1*, *GAL10*, *ATF2*, *TIR1*, *ARH1*, *ADE2*, e pelo promotor híbrido *GAL10-CYC1*.

[0032] É necessário utilizar uma sequência terminadora para qualquer gene ou cDNA heterólogo introduzido, de preferência, escolhida entre as sequências terminadoras dos genes endógenos

PGK1, CYC1, ATF2, ADE2, NCP1.

[0033] Obtém-se nesse caso blocos ou cassetes de expressão, que consistem em um promotor, o gene heterólogo (ou cDNA, eventualmente que codifica para a proteína madura precedida pelo códon ATG que codifica para a metionina (Met-mat) ou uma proteína de fusão que possui eventualmente sinais de endereçamento para compartimentos celulares), e uma sequência terminadora.

[0034] Em um modo de realização, a cepa de levedura de acordo com a invenção apresenta o bloco de expressão heterólogo esterol $\Delta 7$ -redutase integrado no cromossomo ao locus ADE2.

[0035] Em um modo de realização especial da invenção, a cepa de levedura compreende pelo menos um cassete de expressão dos genes que codificam para o P450_{SCC}, adrenodoxina co-fator do P450_{SCC} localizado em um plasmídeo de grande número de cópias, e ela compreende um cassete de expressão da adrenodoxina redutase co-fator do P450_{SCC} localizado em um plasmídeo de uma cópia ou de pequeno número de cópias ou integrado no cromossomo. De modo preferido, esses cassetes de expressão contêm a proteína madura precedida de uma metionina, e a proteína está localizada no citosol.

[0036] Em um modo de realização, a cepa de levedura compreende pelo menos um cassete de expressão escolhido entre os cassetes de expressão da 3β -hidroesteróide desidrogenase isomerase, do citocromo P450c17, do citocromo P450c21 localizado em um plasmídeo de grande número de cópias, ou pequeno número de cópias ou integrado no cromossomo.

[0037] Em um modo de realização especial, a cepa de levedura de acordo com a invenção compreende pelo menos um cassete de expressão para a P45011 β situado em um plasmídeo de cópias múltiplas, a proteína produzida apresentando um sinal de endereçamento para as mitocôndrias e/ou pelo menos um cassete de

expressão para a adrenodoxina co-fator da P450 11β situado em um plasmídeo de cópias múltiplas, com um promotor fraco (ou melhor do qual a força se aparenta à força do promotor *CYC1*), a proteína produzida apresentando um sinal de endereçamento para as mitocôndrias. De modo preferido, as proteínas são produzidas sob a forma de um precursor, com um sinal homólogo ou heterólogo de endereçamento para as mitocôndrias, as proteínas tomando sua forma madura nesse compartimento celular.

[0038] É portanto interessante notar que em um caso especialmente preferido da execução da invenção, são introduzidas na cepa de levedura duas cópias do gene que codifica para a adrenodoxina, uma entre elas sendo destinada a expressar a proteína no citosol da célula, a outra sendo fabricada de tal modo para que a proteína madura se encontre nas mitocôndrias.

[0039] Em um modo de realização especial, a cepa de levedura compreende também pelo menos um cassete de expressão (promotor de expressão tal como citado acima com a parte codificante do gene *NCP1*, *ATR1*, e/ou *ATR2*, com seu próprio terminador ou um terminador tal como definido acima) situado em um plasmídeo de cópias múltiplas, de pequeno número de cópias ou integrado no cromossomo. Os cassetes de expressão para *NCP1*, *ATR1* e *ATR2* poderão notadamente ser integrados ao locus *NCP1* de *S. cerevisiae*.

[0040] Em um modo de realização especial, a cepa de levedura de acordo com a invenção expressa também a proteína ARH1p, proteína homóloga da adrenodoxina redutase dos mamíferos na levedura, a um nível superior ao nível de expressão fisiológico. A superexpressão dessa proteína pode ser obtida por técnicas bem conhecidas pelo profissional, por exemplo pela incorporação de um novo cassete de expressão (promotor de expressão, parte codificante do gene *ARH1* com seu próprio terminador ou um terminador tal como definido acima)

além do gene endógeno na levedura. De maneira surpreendente, foi de fato mostrado que uma expressão do gene *ARH1* a um nível superior ao nível de expressão fisiológico aumenta de modo significativo a quantidade de esteróides produzidos. No entanto essa expressão não deve ser muito grande para obter o efeito desejado. Assim, se uma expressão da proteína ARH1 a um nível superior em relação a um nível fisiológico é desejável, é preciso ter cuidado para não superexpressar demais essa proteína sob pena de perder esse aumento de produção em esteróides.

[0041] A cepa de levedura de acordo com a presente invenção pode possuir um caráter poliplóide, diplóide, haplóide ou aneuplóide, sem que isso prejudique a execução da invenção.

[0042] Trata-se de preferência de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, notadamente derivada de uma das cepas FY 1679-28c, FY 1679-18b que são esporos da cepa FY 1679 depositada na American Type Culture Collection sob o número 96604.

[0043] A invenção também tem como objeto uma cepa de levedura, caracterizada pelo fato de que trata-se da cepa CDR07 Mat- α ou TGY260, depositadas na CNCM em 24 de janeiro de 2001 sob os números de ordem respectivos I-2616 e I-2615. A invenção refere-se também a uma cepa obtida depois de cruzamento de CDR07 Mat- α e TGY260, e eventualmente esporulação e transformação com um plasmídeo de levedura, notadamente as cepas UCY2 e UCY4 e as cepas UCY3 e UCY26 descritas na presente invenção. A invenção também tem como objeto cepas de leveduras obtidas depois de cruzamento de UCY2 e TGY245, e eventualmente esporulação e transformação com pelo menos um plasmídeo de levedura, notadamente as cepas UCY5, UCY6, UCY16, UCY19, UCY20, UCY24, UCY25 e UCY26 também descritas na presente invenção.

[0044] É útil que a cepa de levedura de acordo com a invenção

possua os elementos necessários para a excreção do esteróide produzido no meio de cultura, a fim de simplificar a purificação do produto final.

[0045] A invenção também refere-se a um processo de produção de um esteróide, caracterizado pelo fato de que ele compreende as etapas de fermentação de uma cepa de levedura de acordo com a invenção na presença de uma fonte de carbono simples, e de recuperação do esteróide produzido.

[0046] Finalmente, a invenção também tem como objeto uma preparação farmacêutica que compreende uma cepa de levedura de acordo com a invenção, com eventualmente um excipiente farmacêuticamente aceitável, um tal excipiente sendo bem conhecido pelo profissional.

[0047] Ainda que a cepa de levedura de acordo com a invenção produza um esteróide de modo autônomo a partir de uma fonte de carbono simples, também é possível fornecer a ele colesterol ou uma estrutura aparentada, ou um substrato já presente como derivado do colesterol a fim de obter os produtos situados a jusante. A possibilidade de poder entrar em qualquer etapa, notadamente ao nível pregnenolona ou posterior da via de metabolismo do esteróide procurado permite portanto notadamente que se possa fornecer à levedura substratos não naturais, que levam à síntese de esteróides não naturais e substituídos, notadamente fluorados.

[0048] Em um primeiro modo de realização, a cepa de levedura de acordo com a presente invenção permite notadamente produzir o esteróide procurado (notadamente o cortisol), em quantidade superior a 10 mg/l, de preferência superior a 50 mg/l, de modo mais preferido 80 mg/l, de modo mais preferido 100 mg/l, de modo o mais preferido 200 mg/l.

[0049] Em um outro modo de realização, o esteróide de interesse

(de modo preferido a hidrocortisona) está presente em uma proporção superior a 20%, de preferência 25%, de modo mais preferido 30%, de modo mais preferido 35%, de modo mais preferido 40%, de modo mais preferido 50%, do modo o mais preferido 65% do total dos esteróides produzidos pela cepa de acordo com a invenção (notadamente os intermediários de síntese).

[0050] A fim de que a cepa de levedura de acordo com a presente invenção possa produzir os esteróides de interesse, é necessário que ela apresente modificações genéticas. Assim, a cepa de levedura de acordo com a invenção apresenta pelo menos uma modificação genética escolhida no grupo constituído pela ruptura ou inativação de um gene endógeno, pela introdução de pelo menos um gene heterólogo (notadamente um bloco de expressão com promotor e/ou terminador homólogo e uma parte codificante heteróloga), em uma ou várias cópias, de modo epissomal ou cromossomal.

[0051] De modo preferido, a cepa de levedura de acordo com a invenção apresenta várias (pelo menos quatro) modificações genéticas tais como enunciadas acima.

[0052] Assim, certos genes endógenos da levedura são favoravelmente inativados ou rompidos. É possível inativar ou romper os genes pela introdução, na sequência codificante, de um gene exógeno (notadamente um bloco de expressão com promotor e/ou terminador homólogo e uma parte codificante heteróloga) tal como descrito mais embaixo, e/ou de um marcador de seleção. Também é possível modificar os promotores desses genes a fim de reduzir o nível de expressão.

[0053] O gene de levedura *ATF2* (Cauet *et al.*, 1999) codifica para uma acetil transferase que utiliza a pregnenolona como substrato e sua ruptura permite suprimir essa reação parasita de acetilação, cujo produto não pode nesse caso ser utilizado, e aumentar assim o

rendimento em esteróide de interesse. Assim, os rendimentos podem ser multiplicados por valores compreendidos entre 3 e 7 depois de inativação do gene *ATF2*.

[0054] Os genes *GCY1* e *YPR1* codificam para as aldo-ceto-redutases. Esses genes são vantajosamente inativados ou rompidos. Esses dois genes fazem parte de uma família de 6 genes mais ou menos homólogos e que se supõe codificar todos os seis para as aldo-ceto-redutases. No entanto, os produtos desses dois genes são os mais ativos nos substratos aqui considerados, notadamente *GCY1*, e a inativação dos mesmos é portanto extremamente interessante para a obtenção da hidrocortisona.

[0055] Assim como precisado acima, é interessante inativar o gene *ERG5*, a fim de acumular um substrato que apresenta uma estrutura que é mais a próxima possível da estrutura do colesterol. No entanto, foi mostrado que a levedura de acordo com a invenção pode apesar de tudo produzir os esteróides de interesse apesar da atividade desse gene. No entanto, a fim de otimizar os rendimentos, pode ser útil inativar o mesmo por mutação, deleção e/ou inserção.

[0056] É possível também, sem que isso seja realmente crítico para o sucesso global da produção de esteróides com a levedura de acordo com a invenção, inativar outros genes, tais como *ARE1*, *ARE2*, *ADE2* ou *ATF1*. Esses genes codificam todos eles para as proteínas, cuja ausência pode melhorar o rendimento global de síntese do esteróide de interesse.

[0057] Assim como descrito no artigo de Duport et al., precedentemente citado (Duport et al., 1998), é indicado que a presença de um bloco de expressão com promotor e/ou terminador homólogo e uma sequência que codifica para a $\Delta 7$ -redutase é útil pelo fato de que ela permite efetuar a dessaturação da dupla ligação 7-8 do ergosterol e de seus derivados, e obter assim um ou vários

precursores com estrutura mais próxima da estrutura do colesterol, substrato de partida para a produção de pregnenolona. Assim, é vantajoso que a cepa de levedura de acordo com a presente invenção contenha esse bloco de expressão. Em um caso especial, o dito bloco de expressão da $\Delta 7$ -redutase é integrado no genoma da levedura, de modo preferido ao locus do gene *ADE2*, levando através disso à ruptura do gene *ADE2*. O promotor utilizado para a transcrição é um promotor induzível tal como o *GAL10-CYC1*, ou um promotor constitutivo, tal como o promotor *GAL10-GAL10-CYC1* que é desregulado na cepa CA10 descrita em Duport *et al.*, 1998. A proteína utilizada é preferencialmente proveniente de *Arabidopsis thaliana* (mas pode também ser proveniente de uma espécie de mamífero), o cDNA sendo clonado sob a forma nativa (DNA complementar justo após uma metionina de iniciação da tradução), e sob o controle de um terminador de transcrição clássico na levedura tal como *PGK1*.

[0058] Deve-se notar que a atividade do gene $\Delta 7$ -redutase na levedura foi descrita por Lecain *et al.*, 1996, cujo conteúdo técnico (notadamente as sequências do gene $\Delta 7$ -redutase e as construções são métodos operatórios) é incorporado como referência no presente pedido.

[0059] A primeira etapa é a produção de pregnenolona, obtida depois de introdução, na levedura, das enzimas que permitem transformar normalmente o colesterol em pregnenolona. No presente caso, trata-se da enzima que permite a clivagem da cadeia lateral (P450_{SCC} para a clivagem de parte da cadeia com duas co-enzimas (adrenodoxina, *ADX*, e adrenodoxina redutase, *ADR*). A transformação da levedura com esses blocos de expressão respectivos está descrita em Duport *et al.*, 1998, precedentemente citado.

[0060] É utilizado de preferência um DNA complementar que codifica para as proteínas maduras, com uma metionina acrescentada

na extremidade N-terminal para permitir a tradução. São utilizados promotores tais como o promotor híbrido *GAL10-CYC1*, ou o promotor *TEF1*, para assegurar a transcrição dos cDNA. São utilizados os terminadores clássicos, notadamente o terminador *PGK1*.

[0061] Os diferentes cDNA que codificam para as proteínas P450_{scc}, ADR ou ADX podem ser de origem de um vertebrado, por exemplo humana ou bovina, mas também rato ou peixe. Os genes que codificam para essas proteínas são de preferência colocados em plasmídeos, é preferido para P450_{scc} e ADX um plasmídeo de cópias múltiplas com pequeno ou grande número de cópias, notadamente derivado de um plasmídeo 2 micron de levedura, enquanto que é utilizado de preferência um plasmídeo de uma cópia ou de pequeno número de cópias para a expressão de ADR. O bloco de expressão para *ADR* pode também ser integrado no cromossomo da levedura. Isso permite controlar a expressão do ADR, pois parece que expressão demais prejudique a atividade scc procurada.

[0062] As proteínas são de preferência expressas para poder exercer sua atividade no citosol.

[0063] A etapa seguinte é a conversão da pregnenolona em 17 α -hidróxi progesterona, pela ação conjugada da 17 α -hidroxilase (P450c17) e da 3 β -OH-esteróide desidrogenase (3 β -HSD).

[0064] Para a expressão dessas duas proteínas, são utilizados de preferência promotores fortes, tais como *TEF1*, *TDH3*, *GAL10-CYC1*. No entanto, um promotor mais fraco tal como *CYC1*, também pode convir. Os terminadores utilizados são clássicos, notadamente provindo dos genes *PGK1* ou *NCP1*. São expressos os DNA complementares que codificam para as proteínas completas. A espécie de origem dessas proteínas não parece modificar os resultados obtidos, assim é possível utilizar proteínas de origem humana (notadamente um ou outro dos dois isótipos da 3 β -HSD),

bovina, ou de outros organismos (notadamente de peixes). Trata-se, para essas duas proteínas, de obter a melhor expressão possível, e é possível portanto expressar as mesmas em plasmídeos de uma ou de cópias múltiplas com pequeno ou grande número de cópias, ou tendo-se integrado os blocos de expressão em pelo menos um cromossomo da levedura.

[0065] Busca-se em seguida a conversão da 17α -hidróxi progesterona em desoxicortisol, por intermédio da P450c21, que permite uma hidroxilação em 21. Trata-se de expressar a proteína, a partir de ser cDNA, do melhor modo possível. Para fazer isso, é utilizado um promotor forte (*TEF1*, *TDH3*, *GAL10-CYC1...*), e mesmo o promotor *CYC1*, e um terminador clássico (notadamente *PGK1*) para conceber a unidade transcricional. Essa última é colocada em um plasmídeo de uma ou de cópias múltiplas, com pequeno ou grande número de cópias, ou então integrada no genoma da levedura. Deve ser notado que a espécie de origem parece importante aqui, e que é preferível utilizar a P450c21 de origem humana.

[0066] O desoxicortisol é em seguida convertido em cortisol, sob a ação do sistema P450c11, que contém a P450c11, que permite a hidroxilação em 11- β , uma adrenodoxina e uma adrenodoxina redutase, como co-fatores.

[0067] Os inventores do presente pedido mostraram que os resultados obtidos eram melhores quando esse último sistema é expresso na membrana interna das mitocôndrias das leveduras. Assim, é interessante produzir proteínas de fusão, que portam como precursor a sequência de endereçamento mitocondrial do precursor da proteína Cox6p da levedura.

[0068] É utilizado de preferência também o cDNA que codifica para as proteínas maduras. A proteína P450c11 é assim a proteína de origem humana, bovina ou uma proteína híbrida humana-bovina. Essa

última construção é a forma preferida para a execução da invenção. O gene utilizado na unidade transcricional está de preferência sob o controle do promotor *CYC1*. É interessante posicionar um íntron de β -globina de coelho e um terminador do gene do hormônio de crescimento humano em 3' da sequência codificante. A unidade transcricional é colocada de preferência em um plasmídeo de cópias múltiplas.

[0069] A adrenodoxina é utilizada sob sua forma madura, colocada com uma sequência de endereçamento para as mitocôndrias, por exemplo escolhida entre aquelas dos precursores das proteínas Cox6p, Cox4p, fumarase, ARH1p, F9 ATPase, e sob o controle de um promotor escolhido notadamente entre *TDH3*, *TEF1*, *CYC1*. Prefere-se uma proteína de origem bovina ou humana. É conveniente colocar um terminador em uma unidade transcricional, que pode ser *PGK1*. Expressa-se o bloco de expressão de preferência a partir de um plasmídeo de cópias múltiplas.

[0070] A proteína que desempenha o papel de adrenodoxina redutase é a proteína ARH1p, endógena da levedura, que é normalmente expressa nas mitocôndrias do hospedeiro. De modo preferido, transforma-se no entanto a levedura de tal modo para que a cepa hospedeira contenha uma cópia natural do gene *ARH1* e uma segunda cópia do gene *ARH1* sob o controle do promotor *CYC1*. A atividade dessa proteína é indispensável para obter o efeito procurado, e foi mesmo observado que a inativação do gene é letal para a levedura (Lacour *et al.*, 1998). É conveniente notar que a superexpressão desse gene parece tóxica para o organismo, e que o promotor escolhido deve permitir um nível de expressão que leve à atividade 11- β hidroxilase procurada sem ser deletério para a levedura. De maneira surpreendente, foi de fato mostrado que uma expressão do gene ARH1 em um nível superior ao nível de expressão fisiológico

aumenta de modo significativo a quantidade de esteróides produzidos. No entanto como foi dito acima, essa expressão não deve ser muito grande para obter o efeito desejado. Assim, se uma expressão da proteína ARH1 em um nível superior em relação a um nível fisiológico é desejável, é preciso tomar cuidado para não superexpressar demais essa proteína sob pena de perder esse aumento de produção em esteróides. A título de exemplo, uma integração do cassete de expressão para *ARH1*, que compreende como promotor o promotor *CYC1*, ao nível do locus *LEU2* de *S. cerevisiae* dá níveis de expressão e resultados satisfatórios. Ao contrário a integração ao mesmo locus de um cassete que compreende o promotor *TEF1*, reconhecido como muito mais forte do que o promotor *CYC1*, dá resultados menos interessantes.

[0071] Assim, são introduzidas de preferência duas cópias de uma unidade transcricional que codifica para a proteína co-enzima ADX, uma dentre elas tendo uma atividade no exterior das mitocôndrias e notadamente no citosol, a outra tendo uma atividade nas mitocôndrias da célula hospedeira.

[0072] Também é possível introduzir outros genes, notadamente os genes que codificam para as proteínas que têm uma atividade NADPH P450 redutase, tais como *NCP1* (redutase de levedura também chamada *CPR1*), *ATR1* ou *ATR2* (redutases de plantas), redutase humana. Essas proteínas melhoram as atividades P450c17 e P450c21. É utilizado ou o promotor endógeno (*NCP1*), ou coloca-se os DNA que codificam para as proteínas sob o controle de promotores tais como *GAL10-CYC1*, *CYC1*, *TEF1*...

[0073] Também é possível introduzir o gene *TGL1*, que codifica para uma proteína que tem uma atividade de desesterificação, sob o controle de um promotor forte tal como *GAL10-CYC1*, em um plasmídeo de cópias múltiplas ou de uma cópia. Isso permite reduzir o

efeito das reações de esterificação parasitas dos esteróis que podem subexistir mesmo depois da inativação de *ATF2*, e notadamente aquelas produzidas pelo produto dos genes *ARE1* e *ARE2*.

[0074] Também é possível acrescentar um plasmídeo que expressa o citocromo b5 de levedura ou uma outra espécie, que é um co-fator em várias reações definidas acima.

[0075] Também é possível, quando se deseja produzir DHEA, introduzir um plasmídeo que codifica para a desmolase (P450 17 α), com pequeno ou grande número de cópias, sob o controle de um promotor tal como *GAL10-CYC1*, *CYC1*, *TEF1*, com um terminador *PGK1*.

[0076] Também é possível introduzir um cDNA que codifica para o citocromo P450c17 que tem uma atividade liase, por exemplo aquele de origem humana, na presença de um excesso de NADPH P-450 redutase, como as redutases de mamíferos, *NCP1*, *ATR1*, ou *ATR2*. Essas unidades transcricionais utilizam de preferência um promotor forte.

[0077] Finalmente, é possível restaurar a atividade dos genes endógenos *ERG6* e *ERG2*, inibidos pela pregnenolona, colocando-se os mesmos sob o controle de um promotor constitutivo forte.

[0078] Também é possível introduzir outros genes heterólogos, que codificam notadamente para uma proteína de atividade 24,25 esterol redutase, ou o gene *HMG1*, presente na via de síntese do colesterol no ser humano. Também é interessante introduzir o gene *MDR1* humano, que codifica para uma bomba não inibida pela acumulação dos esteróis anormais que aparecem em razão da inibição do *ERG6* pela pregnenolona. Isso permite expulsar esses produtos dos quais uma acumulação muito grande poderia se revelar tóxica para a célula hospedeira.

[0079] Também é possível superexpressar o gene *PDR12* da

levedura que terá um efeito de desintoxicação para os esteróides que podem inibir o crescimento da levedura.

[0080] Está entendido que quando se fala de gene acima, entende-se não somente o fragmento de DNA que codifica para a proteína que apresenta a atividade procurada (e notadamente o fragmento de cDNA que representa em especial as formas maduras), mas também os promotores (notadamente *TEF1*, *GAL10-CYC1*, *CYC1*, *TDH3*) e os terminadores (em especial *PGK1*). Essas unidades transcricionais são introduzidas preferencialmente em plasmídeos de pequeno ou grande número de cópias, ou integrados no cromossomo da levedura.

[0081] Também está entendido que, de acordo com o objetivo procurado, e notadamente o esteróide que se deseja produzir, é possível só introduzir alguns dos genes que codificam para as diferentes proteínas a cada etapa, e fornecer um intermediário à levedura a fim de obter um esteróide a jusante na cadeia de metabolismo.

[0082] Também é fácil não introduzir os genes que permitem obter os produtos situados muito a jusante, e poder portanto parar relativamente alto na cadeia do metabolismo.

[0083] As leveduras utilizadas para a execução da presente invenção são de preferência:

- a cepa FY1679-28c, descrita em Duport *et al.*, 1998, que possui o genótipo (*MAT α* , *rho*⁻, *ura3-52*, *trp1 Δ 63*, *leu2 Δ 1*, *his3 Δ 200*, *GAL2*, *fen1*). Essa cepa também foi descrita por Thierry *et al.*, 1990.

- a cepa FY1679-18b, que possui o genótipo (*MAT α* , *rho*⁻, *ura3-52*, *trp1 Δ 63*, *leu2 Δ 1*, *his3 Δ 200*, *GAL2*, *fen1*).

[0084] Essas duas cepas possuem, portanto, um genótipo idêntico, e um sinal oposto.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0085] Figura 1: Representação esquemática de uma via de biossíntese da hidrocortisona tal como ela pode ser obtida de acordo com a invenção.

[0086] Figura 2: Representação esquemática de construção de cepas de leveduras exemplificadas de acordo com a invenção.

[0087] Figura 3: Mapa do plasmídeo pCV29. PGK term: terminador *PGK*. *GAL10/CYC1* prom: promotor *GAL10/CYC1*. HGH term: terminador do gene do hormônio de crescimento humano. Íntron β -globin: íntron do gene da β -globina de coelho. *CYC1* prom: promotor *CYC1*. *PGK* term: terminador *PGK*. *S. cerevisiae* 2 micron: origem de replicação 2 micron de *S. cerevisiae*. *Cox6*pré: pré-sequência da citocromo oxidase sob unidade 6. Bovino/humano P450 11 β ; cDNA fundido bovino/humano da P45011 β . mat-ADX: forma madura do ADX com uma metionina em NH2 terminal. *E.coli* replicon: Replicon *E.coli*.

[0088] Figura 4: Mapa do plasmídeo pCC12. *CYC1* prom: promotor *CYC1*. *PGK* term: terminador *PGK*. ARS CEN: origem de replicação cromossômica de *S. cerevisiae*. *E.coli* replicon: Replicon *E.coli*. *TDH3* prom: promotor *TDH3*. 3 β -HSDH: cDNA da 3 β hidróxi esteróide desidrogenase. matADR: forma madura da ADR precedida por uma metionina.

[0089] Figura 5: Mapa do plasmídeo pFM10. *CYC1p*: promotor *CYC1*. P45011 β ; cDNA fundido bovino/humano da P45011 β . *ADE2*: gene *ADE2* da levedura. *TDH3p*: promotor *TDH3*. 3 β -HSD: cDNA da 3 β hidróxi esteróide desidrogenase. R1: base de recombinação cuja sequência é dada em SEQ ID N° 39. *GAL10/CYC1p*: promotor *GAL10/CYC1*. matADX: cDNA que codifica para a forma madura do ADX. *URA3*: gene *URA3* da levedura. P450_{SCC}: cDNA que codifica para a forma madura do P450_{SCC} (CYP11A1). Origem 2 micron: origem de replicação 2 micron de *S. cerevisiae*. R2: base de recombinação cuja sequência é dada em SEQ ID N° 40.

EXEMPLOS

[0090] Os exemplos abaixo descrevem um modo de execução da presente invenção e não devem ser considerados como limitando a invenção.

[0091] Parte-se, para as construções das cepas de levedura FY1679-28c e FY1679-18b descritas acima.

Exemplo 1: Ruptura do gene *YPR1*

[0092] A construção da interrupção do gene *YPR1* (YDR368w) pelo gene *URA3* no plasmídeo pPOLYIII foi obtida por 4 PCR sucessivas. Por um lado três PCR independentes foram realizadas para obter a parte 5' do gene *YPR1* (PCR 5), o gene *URA3* funcional bordejado por sequências *YPR1* (PCR 6), a parte 3' do gene *YPR1* (PCR 7).

[0093] O DNA da PCR5 foi obtido por amplificação em uma matriz de DNA genômica com os oligonucleotídeos OTG11314 (SEQ ID N° 1) e OTG11315 (SEQ ID N° 2) assim como o DNA da PCR7 é obtido por amplificação com o auxílio dos oligonucleotídeos OTG11316 (SEQ ID N° 3) e OTG11317 (SEQ ID N° 4) na mesma matriz.

[0094] O gene *URA3* flanqueado de região *YPR1* 5' e 3' é amplificado com o auxílio dos oligonucleotídeos OTG11463 (SEQ ID N° 5) e OTG11464 (SEQ ID N° 6) em uma matriz pTG10054 descrito em Degryse *et al.*, 1995 incorporado aqui como referência no que diz respeito à descrição desse plasmídeo.

[0095] Os produtos das PCR5, PCR6 e PCR7 foram misturados de modo equimolecular e depois amplificados por PCR com o auxílio dos oligonucleotídeos OTG11314 (SEQ ID N° 1) e OTG11317 (SEQ ID N° 4) para obter um produto de PCR8.

[0096] Esse produto de PCR8 foi digerido por meio da enzima *XhoI* e depois sub-clonado no plasmídeo pPOLYIII (descrito por Lathe *et al.*, 1987 e incorporado aqui como referência no que diz respeito à

descrição desse plasmídeo) digerido por meio de *XhoI* para dar o plasmídeo pTG12011. A orientação da inserção no plasmídeo pPOLYIII foi determinada por digestão pelas enzimas *NcoI* e *EcoRI*.

[0097] O plasmídeo pTG12011 que permite a ruptura do gene parasita *YPR1* pelo gene *URA3* é digerido por meio da enzima *XhoI*. O produto da digestão é utilizado para transformar a cepa FY1679-18b utilizando-se para isso o método com cloreto de lítio bem conhecido pelo profissional. Os transformantes são selecionados em um meio desprovido de uracila. Os transformantes são analisados por amplificação por PCR utilizando-se para isso os oligonucleotídeos que serviram para a construção do plasmídeo pTG12011.

[0098] Os clones positivos nesse teste são em seguida triados pelo método de bioconversão do 170H progesterona descrito mais abaixo em presença de glicose como fonte de carbono. A capacidade de bioconversão é analisada em HPLC como descrito por Dumas *et al.*, 1996 e Degryse *et al.*, 1999 cujos conteúdos são incorporados como referência ao presente pedido, notadamente as explicações dos estudos de bioconversão ou como descrito em Kuronen *et al.*, 1999. Um clone TGY195#4 é selecionado para novas caracterizações. A cepa TGY195#4 é transformada utilizando-se para isso ao mesmo tempo o plasmídeo YRp7 (Parent *et al.*, 1985, que é incorporado como referência no que diz respeito à descrição desse plasmídeo) (1 µg) e 5 µg de plasmídeo pTG12045 (descrito mais abaixo) digerido por meio de *NotI*. As cepas transformadas são selecionadas em um meio desprovido de triptofano. Colônias (678 colônias) são transplantadas em um meio que contém triptofano (para se desembaraçar do plasmídeo YRp7) e em um meio que contém triptofano e o 5 flúor-otato (5F0) para selecionar as colônias que perderam o gene *URA3* que interrompe o gene *YPR1*.

Exemplo 2: Construção de diferentes plasmídeos

[0099] Para a superexpressão da proteína P450c21 na levedura dois tipos de promotores foram utilizados, *TEF1* ("Transcription elongation factores") e *TDH3* ("glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3"). Em todos os casos, o terminador de transcrição é o terminador PGK. Nesses plasmídeos, o fragmento *Sall*, *Mlul* porta o cDNA da P450c21 humana.

a) Construção dos plasmídeos pTG10470 e pTG10469

[00100] O plasmídeo pTG10289 foi obtido por modificação do pMAc21 (Wu *et al.*, 1991) por digestão com *KpnI*, *Mlul* e introdução do oligonucleotídeo OTG5868 (SEQ ID N° 27).

[00101] O cDNA desse plasmídeo provém da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA) sob o nome de pc21/3c. É o fragmento *EcoRI-BamHI* de 1,6 Kb que serviu de base para a construção dos diferentes plasmídeos. As modificações trazidas estão descritas no artigo acima e no artigo de Hu *et al.*, 1990.

[00102] Nessa manobra, a parte não codificante da P450c21 do plasmídeo pMAc21 que contém o cassete de expressão da P450c21 foi eliminada assim como o sítio *KpnI* que se encontrava lá.

[00103] O plasmídeo pTG10292 foi obtido por transferência do cDNA c21 humano (fragmento *Sall*, *Mlul*) do plasmídeo pTG10289 para o plasmídeo pTG10031 (descrito em Degryse *et al.*, 1995, que é incorporado como referência ao pedido) com o auxílio dos sítios *Sall* e *Mlul*.

[00104] O plasmídeo pTG10475 foi obtido por PCR e recombinação. De fato a partir do plasmídeo pTG10292, um fragmento do cDNA P450c21 humano representando aproximadamente 250 nucleotídeos foi amplificado com o auxílio dos oligonucleotídeos OTG7410 (SEQ ID N° 7) e OTG5927 (SEQ ID N° 8). Esse fragmento representa sequência codificante, da P450c21 humana de um sítio *Sall* e da sequência AAAA.

[00105] Esse fragmento foi digerido por meio de *Sall* e depois ligado no fragmento linear de pTG10292 digerido por meio de *Sall* e em seguida uma experiência de recombinação foi realizada na cepa BJ5183 descrita por Degryse *et al.*, 1995.

[00106] O plasmídeo obtido pTG10475 porta um cDNA da P450c21 com uma sequência codificante idêntica àquela do cDNA natural, contrariamente ao plasmídeo pMAc21, em um fragmento compatível com os vetores utilizados geralmente pelos inventores, ou melhor um fragmento bordejado pelos sítios de restrição *Sall* e *MluI*. Esse fragmento possui o ambiente seguinte em torno do códon ATG de iniciação da tradução GTCGACAAAAATGCTGCTCCTGGGCCTGCTGC (SEQ ID N° 9).

[00107] A partir desse plasmídeo o fragmento *Sall*, *MluI* que porta o cDNA da P450c21 humana foi transferido para o plasmídeo pTG10158 (Degryse *et al.*, 1995) por clonagem clássica para dar o plasmídeo pTG10472.

[00108] Esse mesmo fragmento *Sall*, *MluI* do plasmídeo pTG10472 foi em seguida transferido por clonagem clássica para o plasmídeo pTG10085 (Degryse *et al.*, 1995) para dar o plasmídeo pTG10469. Esse plasmídeo possui, portanto, o cDNA da P450c21 humana sob o controle do promotor *TEF1*, com o terminador *PGK1*.

[00109] Esse mesmo fragmento que porta o cDNA P450c21 em um fragmento de restrição *Sall* e *MluI* é transferido para o plasmídeo pTG10092 por recombinação na cepa BJ5183 para dar o plasmídeo pTG10470 (Degryse *et al.*, 1996).

[00110] O plasmídeo pTG10470 porta, portanto, o cDNA da P450c21 humana sob o controle do promotor *TEF1* e de um terminador *PGK1* com um marcador de seleção *URA3-d* com o ambiente do códon iniciador ATG descrito precedentemente.

b) Construção do plasmídeo pTG12036

[00111] O plasmídeo pTG12036 foi construído em 4 etapas a partir do pTG10802. O plasmídeo pTG10801 (que está na origem do plasmídeo pTG10802) é um plasmídeo de tipo pUC no qual uma série de sítios de restrição foi inserida entre os sítios *XhoI* e *XhoI*. Essa série de sítios compreende os sítios *HindIII*, *SnaBI*, *Clal* e *SpeI*.

[00112] Entre os sítios *HindIII* e *Clal*, o cassete *HindIII Clal* do pTG10470 que compreende o promotor *TEF1*, o cDNA P450c21 humano e o terminador *PGK1* foi inserido entre os sítios *HindIII* e *Clal* de pTG10801 para dar pTG10802.

[00113] Esse plasmídeo foi em seguida digerido por meio de *XhoI* e o cassete introduzido é, portanto, deletado para introduzir um fragmento de PCR bordejado por sítios *XhoI*. Esse fragmento de 2,5 Kb provém da amplificação pelo par de oligonucleotídeos OTG11844 (SEQ ID N° 10) e OTG11845 (SEQ ID N° 11) no plasmídeo pTG12010#40 (conforme abaixo) para obter um fragmento bordejado por *XhoI* que contém o gene *GCY1* interrompido pelo gene *URA3* bordejado em 5' por um sítio de restrição *Clal*.

[00114] Esse fragmento foi clonado entre os sítios *XhoI* do plasmídeo pTG10802 para obter o plasmídeo pTG12035. Com o objetivo de introduzir o sítio *HindIII* que falta, o plasmídeo pTG12010#36 foi utilizado. Esse plasmídeo é essencialmente idêntico ao pTG12010#40, mas possui um sítio *HindIII* em 3' do gene *URA3* no limite com o gene *GCY1*, mas não possui sítio *Clal* em 5' do gene *URA3* na junção com o gene *GCY1* (conforme abaixo). Por recombinação *in vivo* em *E. coli*, entre o fragmento *NcoI BamHI* de 2,2 Kb que porta de 5' para 3' um fragmento do gene *URA3*, o fragmento 3' do gene *GCY1* e finalmente uma parte do plasmídeo pTG12035 ou melhor o grande fragmento *StuI, AflII* de 4,45 Kb. Obtém-se o plasmídeo pTG12036.

[00115] O plasmídeo obtido pTG12036 possui o gene *GCY1*

interrompido pelo gene *URA3* bordejado pelos sítios *Clal* e *HindIII* respectivamente em 5' e 3'. Esse fragmento é em seguida substituído pelo cassete de expressão da P450c21 portado pelo fragmento 2,33 Kb *Clal*, *HindIII* do plasmídeo pTG10469 (ver mais acima) para obter o plasmídeo pTG12086.

c) Construção do plasmídeo pTG12045

[00116] O sítio único *SphI* do plasmídeo pPOLYIII é destruído por inserção do par de oligonucleotídeos complementares OTG11975 (SEQ ID N° 12) e OTG11976 (SEQ ID N° 13).

[00117] O sítio *SphI* do pPOLYIII é destruído e substituído por um sítio *Clal* para dar o plasmídeo pTG12040. No plasmídeo pTG12040 entre os sítios únicos *Clal* e *EcoRI*, é introduzido um fragmento de DNA genômico *Clal* *EcoRI* que corresponde à parte 3' de 0,7 Kb do gene *YPR1* obtido por amplificação com os oligonucleotídeos OTG11981 (SEQ ID N° 14) e OTG11982 (SEQ ID N° 15) para dar o plasmídeo pTG12041.

[00118] Nesse plasmídeo pTG12041 de 2,84 Kb, a parte 5' do gene *YPR1* (0.66 Kb) amplificada pelos oligonucleotídeos OTG11314 (SEQ ID N° 1) e OTG11980 (SEQ ID N° 16) a partir de DNA genômico de levedura selvagem é clonada sob a forma de um fragmento *XhoI* *HindIII* entre os sítios *Sall* e *HindIII* do plasmídeo pTG12041.

[00119] Obtém-se o plasmídeo pTG12042 de 3,5 kb. Esse plasmídeo porta o gene *YPR1* interrompido pelos sítios *Clal* e *HindIII*. Entre esses sítios o cassete do citocromo P450c21 é clonado sob a forma de um fragmento *Clal* *HindIII* de 2,33 Kb que provém do plasmídeo pTG10469. Obtém-se assim o plasmídeo pTG12045.

d) Construção dos plasmídeos pTG12010#36 e #49

[00120] O plasmídeo pTG12010 foi construído sobre uma base do plasmídeo pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) enquanto que o plasmídeo pTG12011 foi construído sobre uma base do plasmídeo

pPOLYIII (Lathe *et al.*, 1987).

[00121] A construção da ruptura do gene *GCY1* pelo gene *URA3* no plasmídeo pUC19 foi obtida por quatro ampliações por PCR sucessivas. Por um lado três PCR independentes foram realizadas para obter a parte 5' do gene *GCY1* (PCR1), o gene *URA3* funcional bordejado por sequências *GCY1* (PCR2), a parte 3' do gene *GCY1* (PCR3).

[00122] As partes 3' e 5' do gene *GCY1* com o auxílio dos pares OTG11285, OTG11286 e OTG11287, OTG11289 (respectivamente SEQ ID N° 17 a SEQ ID N° 20) em uma matriz de DNA genômico da cepa FY1679-28c.

[00123] O gene *URA3* flanqueado de sequências *GCY1* (de modo a obter uma deleção de uma parte da sequência codificante do gene *GCY1*) é amplificado com o auxílio dos oligonucleotídeos OTG11305 (SEQ ID N° 21) e OTG11306 (SEQ ID N° 22) a partir de uma matriz plasmídeo pTG10054 linearizado (Degryse *et al.*, 1995).

[00124] As condições de tampão e de concentração em matriz e sementes para a amplificação são descritas pelo produtor ou fabricante da enzima *Taq* DNA polimerase, e em especial para a enzima elongase desenvolvida por Life Technologies. Os ciclos de temperaturas são os seguintes: um primeiro ciclo de 6'30 para desnaturar semente e matriz e depois 30 ciclos de 30 s a 93°C, 2 minutos a 54°C e 3 minutos a 68°C, o último ciclo é de 5 min a 72°C. Os produtos PCR1, PCR2 e PCR3 são misturados de modo equimolecular e amplificados de novo com o auxílio dos oligonucleotídeos OTG11285 (SEQ ID N° 17) e OTG11289 (SEQ ID N° 20). O produto final PCR4 com um tamanho de 2,9 Kb é em seguida sub-clonado entre os sítios de restrição *KpnI* e *BamHI* do plasmídeo pUC19 para obter o plasmídeo pTG12010.

[00125] A estrutura do plasmídeo foi verificada por perfil de

restrição e sequenciamento nucleotídico das extremidades.

[00126] A clonagem do pTG12010 permitiu de fato obter duas versões desse plasmídeo, a versão pTG12010#40 (pTG12040 clone 40) e pTG12010#36. A vontade inicial era obter o gene *GCY1* interrompido pelo gene *URA3* bordejado pelos sítios de *Clal* e *HindIII* respectivamente em 5' e em 3' do gene. De fato dois plasmídeos diferentes foram obtidos, que diferem unicamente pela presença ou pela ausência de sítios *Clal* e *HindIII* nas extremidades do gene *URA3*. O plasmídeo pTG12010#40 possui um sítio de restrição *HindIII* na extremidade 3' do gene *URA3* mas nenhum sítio *Clal* em 5'. O plasmídeo pTG12010#36 não possui sítio *HindIII* na extremidade 3' mas possui um sítio *Clal* na extremidade 5' do gene. Essa propriedade é utilizada para obter o plasmídeo que possui o gene *URA3* bordejado pelos sítios *HindIII* e *Clal* que interrompe a sequência codificante de *GCY1*.

e) Construção do plasmídeo pTG12086

[00127] Esse plasmídeo serve para a integração de um cassete de expressão para a P450c21 assim como para a ruptura do gene *GCY1* ao mesmo tempo. Esse plasmídeo foi construído a partir do plasmídeo pTG12036 e do plasmídeo pTG10614.

[00128] A construção do plasmídeo pTG10614 foi realizada como se segue. Esse plasmídeo foi construído a partir do pTG10212 (Degryse *et al.*, 1995) que é um plasmídeo de expressão de levedura baseado em um promotor *TDH3*, um terminador *PGK1* e um marcador de seleção *URA3-d*.

[00129] Por recombinação homóloga em *E. coli*, o marcador de seleção é substituído pelo marcador de seleção do plasmídeo pTG10054 (Degryse *et al.*, 1995), para fazer isso o fragmento *MluI* do pTG10054 de 2,1 Kb que contém o marcador *URA3* flanqueado por sequências de recombinação é recombinado com o grande fragmento

*Hind*III de pTG10212 para dar o plasmídeo pTG10610 que possui as mesmas características que pTG10212 (Degryse *et al.*, 1995), com um marcador *URA3* na mesma orientação que pTG10054.

[00130] O fragmento *Sall MluI* que porta o cDNA do citocromo P450c21 humano do plasmídeo pTG10472 (conforme acima) é transferido para o plasmídeo pTG10610 para dar o plasmídeo pTG10614.

[00131] O fragmento *ClaI Hind*III desse plasmídeo contendo de 5' para 3', o promotor *TDH3*, o cDNA da P450c21 humana bordejado por sítios *Sall* e *MluI* e depois o terminador *PGK1* é transferido para o plasmídeo pTG12036 para dar o plasmídeo pTG12086 que contém portanto a sequência do gene *GCY1* interrompido pelo cassete de expressão *TDH3* do citocromo P450c21 humano.

f) Construção do plasmídeo pTG12048

[00132] O plasmídeo pTG12048 foi construído a partir dos plasmídeos pFL26CD, pTG10925 e pTG10953.

[00133] O pTG10953 é idêntico ao plasmídeo descrito em Lacour *et al.*, 1998, mas o promotor *TEF1* que é portado por um fragmento *ClaI Sall* é substituído por um promotor *CYC1* (Degryse *et al.*, 1995). O cassete de expressão é portado por um fragmento de DNA *NotI-NotI*.

[00134] O plasmídeo pTG10925 foi construído a partir de pFL26CD descrito por Duport *et al.*, 1998. O plasmídeo contém um fragmento genômico da levedura que compreende os genes *LEU2* e *NFS1* orientado de 5' para 3' e 3' e 5' respectivamente. Um cassete de expressão da ADR bordejado por sítios *NotI* foi introduzido na região intergênica para dar o plasmídeo pTG10925. Esse cassete (*TEF1* – ADR bovina madura – terminador *PGK1*) foi substituído por um novo cassete que compreende o gene *ARH1* sob controle do promotor *CYC1* e do terminador *PGK1* para dar o plasmídeo pTG12048. Nesse plasmídeo, o gene *LEU2* e o cassete de expressão estão na mesma

orientação transcricional.

Exemplo 3: Construção da cepa TGY212#1

[00135] Uma colônia é selecionada na triagem descrita no exemplo 1. Ela é chamada de TGY212#1. Essa colônia é submetida a uma experiência de bioconversão como descrito precedentemente com 100 µg/ml de substrato 170H progesterona, a cepa é colocada para crescer em um meio mínimo complementado com aminoácidos necessários e uracila.

[00136] Essa cepa é capaz de converter a 170H progesterona em 11-deoxicortisol com uma eficácia da ordem de 47% em 24 horas com uma pequena produção de 4 pregneno 17 α ,20 α diol 3 ona nessas condições (< 0.5%). Em certas condições (meio rico definido de tipo Kappeli com galactose como fonte de carbono e início da cultura em alta densidade: D0 600 nm = 5), a capacidade de redução da cetona é aumentada para atingir 11% do substrato de partida com uma capacidade de bioconversão reduzida a 1,5% do substrato de partida.

[00137] Nessas condições, a presença provável do gene *GCY1* constitui um incômodo para a bioconversão da 170H progesterona. Foi portanto decidido executar uma ruptura no gene *GCY1* para impedir sua atividade.

Exemplo 4: Construção da cepa TGY243

[00138] Para fazer isso, a cepa TGY212#1 foi transformada por 3 µg do plasmídeo pTG12010#36 linearizado pelas enzimas de restrição *SphI* e *EcoRI*. Vinte e sete transformantes foram selecionados em um meio mínimo complementado para as auxotrofias de TGY212#1 mas que não contém uracila.

[00139] Essas colônias foram submetidas a testes de bioconversão em um meio mínimo complementado com galactose como fonte de carbono pois ela é um indutor conhecido de *GCY1*. Todos os clones TGY243 apresentavam uma capacidade de converter a 170H

progesterona em 11-deoxicortisol sem por causa disso produzir quantidades detectáveis de 4 pregneno $17\alpha,20\alpha$ diol 3 ona.

[00140] Um clone TGY243#1 foi selecionado para introduzir no lugar do gene *URA3* um cassete de expressão para a P450c21 humana.

Exemplo 5: Construção da cepa TGY245

[00141] Essa cepa TGY243#1 é transformada pelo plasmídeo YRp7 (1 μ g) descrito por Parent *et al.*, 1985 e pelo plasmídeo pTG12086 linearizado pela enzima *Xho*I (5 μ g).

[00142] O fragmento transformador de pTG12086 contém a sequência codificante de *GCY1* interrompida por um cassete de expressão para a P450c21 humana (*TDH3::cDNAP450c21* humana: terminador *PGK1*).

[00143] As colônias que crescem na ausência de triptofano são selecionadas. Essas 381 colônias são em seguida transferidas para um meio que contém triptofano e o 5 flúor-orotato. Uma dezena de colônias são em seguida testadas em um meio rico de tipo YPG complementado com triptofano, histidina, leucina e uracila a uma concentração de 50 μ g/ml.

[00144] As cepas são colocadas para converter a 170H progesterona a uma concentração de 100 μ g/ml a partir de uma DO 600 nm de 0.1 durante 16 horas.

[00145] Entre esses 10 clones, um clone TGY245#2D é escolhido de acordo com dois critérios, sua capacidade de converter a 170H progesterona em 11-deoxicortisol e em segundo lugar a ausência da formação de 4 pregneno $17\alpha,20\alpha$ diol 3 ona que indica a ruptura de *GCY1*.

Exemplo 6: Construção da cepa TGY260

[00146] A cepa foi construída por transformação da TGY245 pelo plasmídeo pTG12048 que permite a superexpressão do gene *ARH1*

no locus *LEU2*.

[00147] A cepa TGY260 foi construída a partir da cepa TGY245 que foi transformada pelo plasmídeo pTG12048 linearizado.

[00148] Esse plasmídeo pTG12048 é um plasmídeo de integração intergênica que porta o marcador de seleção *LEU2*. Nesse plasmídeo, na região entre o gene *LEU2* e o gene *NFS1* é integrado um cassete de expressão para o gene *ARH1* (Lacour *et al.*, *op. cit.*).

[00149] Esse cassete compreende o promotor *CYC1* seguido pelo gene *ARH1* e pelo terminador *PGK1* bordejado pelos sítios de restrição *NotI*. Esse plasmídeo pTG12048 foi linearizado pelas enzimas de restrição *XhoI* e *Sall*.

[00150] Esse fragmento é utilizado para transformar a cepa TGY245 utilizando-se para isso um método clássico de transformação com cloreto de lítio. As colônias transformantes são em seguida transferidas para um meio que não contém leucina. Uma cepa TGY260 foi selecionada.

[00151] A cepa TGY260 foi depositada na CNCM em 24 de janeiro de 2001 sob o número I-2615.

Exemplo 7: Construção da cepa CDR07mat α

[00152] A cepa FY1679-28c foi transformada pelo plasmídeo pCD62.1, descrito em Duport *et al.*, 1998 (cujo conteúdo técnico de construção dos plasmídeos e a obtenção das cepas são incorporados como referência ao presente pedido), para dar a cepa CDR01. Essa última é transformada pelo plasmídeo pCD78, também descrito em Duport *et al.*, e obtém-se a cepa CA03.

[00153] O gene *ERG5* da dita cepa CA03 é submetido a uma ruptura com um cassete que confere a resistência à higromicina, e obtém-se a cepa CA10.

[00154] Essa cepa é cruzada com uma cepa parente FY1679-18b, e depois colocada para esporular. Os esporos são isolados de acordo

com as técnicas clássicas em um meio mínimo complementado para as auxotrofias ou melhor uracila, triptofano, leucina e histidina.

[00155] Os esporos são triados de acordo com dois critérios que são a resistência à nistatina (12 $\mu\text{g/ml}$ em meio mínimo) e a resistência à higromicina (100-150 $\mu\text{g/ml}$ em meio rico). Os esporos que são resistentes a esses dois produtos são em seguida analisados em cromatografia em fase gasosa para a presença de campesterol como esterol principal das membranas. A presença de campesterol nas membranas das cepas acoplada com a ausência de ergosta 5-22 dienol indica o bom funcionamento da $\Delta 7$ redutase. Um esporo CDR07 MAT α é selecionado de acordo com os critérios acima.

[00156] A cepa CDR07 MAT α foi depositada na CNCM em 24 de janeiro de 2001 sob o número I-2616.

Exemplo 8: Construção das cepas UCY2 e UCY4

[00157] Cruza-se as cepas TGY260 e CDR07 MAT α para obter a cepa SB14. Essa cepa é então colocada para esporular e obtém-se as cepas segregantes YCC4 e YCC5 (ver também abaixo).

[00158] Essas cepas são transformadas pelo plasmídeo pLIP5 (ver abaixo) e dão respectivamente as cepas YCC8 e YCC9.

[00159] Essas cepas são transformadas pelo plasmídeo pTG12093 para obter respectivamente as cepas UCY2 e UCY3.

[00160] O gene *ATF2* é inativado na cepa UCY2, por utilização de um plasmídeo e de uma seleção com G418, e obtém-se então a cepa UCY4.

Exemplo 9: Construção dos plasmídeos de transformação das cepas UCY2, UCY3 e UCY4

a) Construção do plasmídeo pCV29

[00161] Para a construção do pCV29 (conforme Figura 3), os plasmídeos pTG10767, pTG10022 e pCD63 foram utilizados.

1. Construção do plasmídeo pTG10767

[00162] O plasmídeo pTG10767 é um plasmídeo de expressão para a P450c11 de origem humana. Ele contém de fato dois cassetes de expressão um para a P450c11 de origem humana e o outro para a adrenodoxina. Essas duas proteínas são marcadas para serem ativas nas mitocôndrias da levedura *S. cerevisiae*, pela presença de sequências de endereçamento do precursor do citocromo Cox6p.

[00163] Esse cassete de expressão para a P450c11 de origem humana é bordejado por dois sítios de restrição *NotI* que permitem transportar o mesmo para os diferentes vetores descritos por Degryse *et al.*, 1995. De 5' para 3', ele compreende, o promotor *CYC1* como descrito na publicação acima e depois o cDNA da P450c11 humana modificado como descrito abaixo e finalmente uma parte não codificante de eucarioto superior.

[00164] O cDNA P450c11 humano é aquele descrito por Chua *et al.*, com as seguintes modificações.

[00165] A parte que codifica para o peptídeo sinal no cDNA original foi retirada até o sítio de restrição *BglII* e substituída. Isso retira pela mesma ocasião 31 aminoácidos da sequência codificante da forma madura do cDNA para dar a sequência protéica seguinte em NH2 terminal (SEQ ID N° 23):

[00166] *MLSRAIFRNPVINRTLLRARGAYHATRLTKNTFIQSRKYG*
TRGAAAPKAVLPFEAMP**RC****PGNKW****MRMLQIWREQGYEDLHLEVH**
QTFQELGPIFRYDLGGAGMVCVMLPEDVEKLQQVDSLHHRMSLEP
WVAYRQH

[00167] Na linha precedente, a parte em itálico corresponde à sequência em aminoácidos da sequência de endereçamento do precursor da citocromo oxidase sob unidade VI de levedura (COX6), a parte em negrito corresponde à parte NH2 terminal da P450c11 bovina (Dumas *et al.*, 1996). A parte sublinhada corresponde ao início da sequência idêntica àquela publicada do cDNA da P45011 β 1 humana

(Kawamoto *et al.*, 1990).

[00168] O cassete *NotI* que porta o promotor *CYC1* e o cDNA quimérico da P450_{11β}1 contém também uma parte não codificante situada em 3' do cDNA. Essa parte não codificante é composta por 3 elementos, uma parte não codificante que provém do cDNA natural e uma parte não codificante que provém do plasmídeo pCMV4 cuja sequência está depositada no Genbank sob o número AF239248 (Anderson *et al.*, 1989). Por outro lado, as únicas partes não codificantes que provêm do pCMV4 terminador do gene do hormônio de crescimento humano e do íntron do gene da β globina de coelho são conservadas no vetor final pCV29.

[00169] No final um fragmento de DNA que porta sítios de restrição *NotI* contém de 5' para 3' o promotor *CYC1*, um cDNA quimérico enquadrado por sítios *SalI* e *MluI* contendo uma parte que codifica para a pré-sequência da citocromo oxidase fundida a um fragmento da P450_{11β} bovina até a parte que corresponde ao sítio de restrição e depois o final do cDNA corresponde ao cDNA da P450_{11β} humana. A parte não codificante é composta por três de origem de mamífero.

[00170] Esse cassete *NotI* é transferido para o plasmídeo pTG10359 que é proveniente do plasmídeo pTG10350 (Dumas *et al.*, 1996) digerido pelas enzimas de restrição *ClaI* e *PvuII* e religado sobre si próprio.

[00171] Esse plasmídeo pTG10359 possui por outro lado um sítio de restrição único *NotI*. O plasmídeo pCV29 é um plasmídeo de 3 cassetes que contém os cassetes de expressão para a forma madura da ADX e a forma madura da P450_{SCC} e uma forma da CYP11B1 humana marcada com a mitocôndria.

[00172] O plasmídeo pTG10022 é descrito na publicação de Degryse *et al.*, 1995, incorporada como referência no presente pedido, e contém uma origem de replicação 2 micron para a levedura *S.*

cerevisiae assim como os elementos para a clonagem em *E. coli*.

[00173] Os sítios de restrição desse plasmídeo foram modificados com os oligonucleotídeos OLIP 174 e OLIP 175 (respectivamente SEQ ID N° 28 e 29) a fim de integrar neles os sítios de restrição *Ascl* e *PmeI*.

[00174] No sítio de restrição *NotI* desse plasmídeo, foi introduzido um cassete duplo de expressão do plasmídeo pCD63 descrito por Duport *et al.*, 1998. Esse cassete duplo de expressão contido em um fragmento *NotI* contém um cassete de expressão para a forma madura da ADX bovina e um cassete de expressão para a forma madura da P450_{SCC} bovina que enquadram um marcador de seleção *URA3*. No sítio único *PmeI* de extremidades livres desse plasmídeo, o cassete de expressão do citocromo p45011 β que contém o cDNA da P45011 β humana sob controle dos promotores *CYC1* e terminador *PGK1* foi introduzido depois de enchimento das extremidades *NotI* com o DNA polimerase fragmento de Klenow.

[00175] Um dos plasmídeos obtidos pCV29 contém três cassetes de expressão para a ADX, a P450_{SCC} (ambas sob a forma madura), assim como uma forma da P45011 β humana dirigida para a mitocôndria. Por outro lado esse plasmídeo porta como marcador o gene *URA3* enquadrado por dois cassetes de expressão.

b) Construção do plasmídeo pCC12

[00176] O plasmídeo pCC12 (Figura 4) é um plasmídeo replicativo de levedura na base da origem de replicação cromossômica como o *ARS1* e de um centrômero *CEN* (há 16 deles na levedura) ambos de *S. cerevisiae*. Esse plasmídeo se replica sob a forma com uma ou duas cópias na levedura.

[00177] Ele foi construído a partir do pFL38C2 que é derivado de pFL38 (Bonneaud *et al.*, 1991, cujo conteúdo é incorporado como referência ao presente pedido, notadamente as descrições dos

plasmídeos). Nesse plasmídeo, foi introduzido no sítio *HindIII* um oligonucleotídeo que contém a sequência de reconhecimento dos sítios *NotI*, *PacI* e *AscI* (OLIP FL SEQ ID N° 24). A orientação do poliligante foi verificada por sequenciamento. Esse plasmídeo porta um marcador de seleção *URA3* bordejado por sítios *BglII*.

[00178] O gene *URA3* foi substituído por um gene *ADE2* de 2,7 Kb obtido por amplificação por PCR no genoma de FY1679-28c utilizando-se para isso os oligonucleotídeos 5'*ADE2090* (SEQ ID N° 37, CGATTCGGATCCACTAGTAACGCCGTATCGTGATTAACG) e 3'*ADE2089* (SEQ ID N° 38, CCTCAAGGATCCTCCTGACGTAGCGCTATCCTCGGTTCTG).

[00179] Para fazer isso o plasmídeo pFL 3862 foi digerido pela enzima *BglII*, o fragmento *BglII URA3* foi substituído pelo fragmento de 2,7 Kb que contém o gene *ADE2*. O plasmídeo obtido pAM1 serve de base para a construção do plasmídeo pCC12.

[00180] Construção do plasmídeo a partir do plasmídeo pAM1:

[00181] O plasmídeo pCC12 contém dois cassetes de expressão, um para o 3 β -HSDH de origem bovina, o outro para a adrenodoxina redutase também de origem bovina.

[00182] O cDNA da 3 β -HSDH bovina foi reclonado por PCR a partir de um banco de cDNA de supra-renais de boi. A sequência codificante do cDNA publicada por Zhao *et al.*, 1989, não foi modificada.

[00183] Os dois oligonucleotídeos acrescentam um sítio *Sall* e 4 adeninas diante do ATG para dar a sequência GTCGACAAAATG (SEQ ID N° 25). O sítio *MluI* está situado ao rés do códon de terminação do cDNA da 3 β -HSDH bovina para dar a sequência: fim do cDNA TGACCTGGAGTGACAATGACGCGT (SEQ ID N° 26). A sequência reconhecida pela enzima *MluI* é ACGCGT.

[00184] O cDNA é transferido sob a forma de um fragmento *Sall*, *MluI* para o plasmídeo pTG10212 para dar o plasmídeo pCC4. Esse

plasmídeo possui portanto um fragmento *NotI* que contém o cDNA da 3β -HSDH em torno e um promotor *TDH3* e um terminador *PGK1*, respectivamente em 5' e em 3'. Esse cassete de expressão é transferido em seguida para o plasmídeo pTG12018, assim o cassete está agora bordejado em 5' por um sítio *NotI* e em 3' por um sítio *Ascl*. Esse fragmento é em seguida clonado no plasmídeo de expressão da levedura pAM1 nos sítios *NotI* e *Ascl* para dar o plasmídeo pCC11.

[00185] No sítio *NotI* desse plasmídeo, é inserido o fragmento *NotI* que porta o promotor *TEF1*, o cDNA da forma madura da adrenodoxina redutase de origem bovina, e o terminador de levedura *PGK1*, respectivamente nessa ordem que provém do plasmídeo pTG10361.

[00186] Esse plasmídeo porta o mesmo cDNA que está descrito em Dumas et al., 1996, (cujo conteúdo é incorporado como referência ao presente pedido, notadamente as descrições dos plasmídeos) exceto que a sequência de endereçamento do precursor da citocromo oxidase foi substituída por um códon metionina. O cDNA codifica portanto para uma forma madura do cDNA da adrenodoxina redutase.

Exemplo 10: Construção da cepa CDR07

[00187] A cepa CDR07 foi obtida por cruzamento entre as cepas FY1679-18b MAT a e a cepa CA10 MAT α descrita por Duport et al., 1998.

[00188] Essas das cepas foram primeiro isoladas em um meio rico que contém glicerol e depois em um meio que contém acetato de potássio como descrito em "Yeast Protocols Methods in Cell and Molecular Biology Edited by Ivor H Evans in 1996. Humana Press Totowa Ney Jersey".

[00189] Depois de esporulação, as tétrades foram digeridas pela zimoliase 100T durante 30 minutos a 37°C. Vários ciclos de seleção foram aplicados para obter um clone que produza campesterol como

esterol majoritário tendo para isso perdido os outros caracteres de CA10.

[00190] Os esporos são primeiramente selecionados em um meio mínimo que contém nistatina com suplementos (adenina, leucina, triptofano, uracila, histidina). Os clones que resistem à nistatina e que são auxotróficos para a adenina e a leucina são em seguida transplantados em meio rico que contém adenina e higromicina (200 µg/ml) para detectar a deleção do gene *ERG5* pelo gene de resistência à higromicina.

[00191] Clones auxotróficos para a adenina, a leucina (e a uracila e o triptofano) e também resistentes à higromicina e à nistatina são analisados por seu perfil esteróico. Dois clones de sinais sexuais opostos que produzem campesterol como estero majoritariamente são selecionados.

[00192] Eles são chamados de CDR07 MAT a e CDR07 MAT α .

Exemplo 11: Construção dos plasmídeos de integração pTG12093 e pLIP5 respectivamente para os lócus *HIS3* e *TRP1*

a) Construção do pLIP5

[00193] o pLIP5 é um plasmídeo que pode ser utilizado para as integrações genômicas ao lócus *TRP1* ou como plasmídeo de cópias múltiplas na levedura *S. cerevisiae*. O plasmídeo de base que serviu para a construção desse plasmídeo é o plasmídeo pFL45S descrito em *Bonneaud et al.*, 1991, cujo conteúdo é incorporado como referência ao presente pedido, notadamente as descrições dos plasmídeos.

[00194] Um fragmento de DNA genômico que corresponde à parte 5' a montante do promotor *TRP1* foi primeiramente clonado utilizando-se para isso os oligonucleotídeos OLIP21 e OLIP22 (respectivamente SEQ ID N° 30 E 31) para fazer uma amplificação por PCR.

[00195] O produto de PCR foi primeiramente subclonado em pCR-

Script AmpSK(+) (Stratagène, La Jolea Califórnia EUA). As extremidades OLIP21 e OLIP22 possuem de fato em 5' um sítio *NarI* assim como um sítio *HindIII* em 3'. Esse fragmento *NarI*, *HindIII* substituiu os sítios de clonagem múltiplos do plasmídeo pFL45S descrito mais acima.

[00196] O plasmídeo obtido pLIP3 é de novo modificado utilizando-se para isso o oligonucleotídeo OLIP20 (SEQ ID N° 32) que serve para substituir o sítio único *HindIII* pelo sítio único *NotI*. No sítio *NotI*, é introduzido um fragmento que contém de 5' para 3' o promotor *TEF1*, o cDNA do citocromo P-450c17alfa e depois o terminador *PGK1* como descrito em Degryse *et al.*, 1999 (cujo conteúdo é incorporado como referência ao presente pedido, notadamente as descrições dos plasmídeos).

[00197] O plasmídeo final pLIP5 pode servir ao mesmo tempo como plasmídeo de cópias múltiplas à base do marcador *TRP1*, quando a parte 2 micron é retirada, é possível utilizá-lo como plasmídeo de integração ao nível do locus *TRP1*. O cassete é assim integrado em 5' do gene *TRP1*.

b) Construção do plasmídeo pTG12093

[00198] Esse plasmídeo é um plasmídeo de integração intergênica ao nível do locus *HIS3*. Esse plasmídeo é construído a partir do plasmídeo pUC-*HIS3* descrito por Duport *et al.*, 1998. O sítio único de restrição *XhoI* desse plasmídeo foi transformado em um sítio de restrição único *NotI* utilizando-se para isso um adaptador apropriado ao mesmo tempo em que se destrói o sítio *XhoI* para dar o plasmídeo pUC19-*HIS3*. No sítio *NotI* único desse plasmídeo, um fragmento *NotI* que provém do pTG10792. Esse fragmento contém o promotor *TDH3* cDNA que codifica para a ADX bovina madura fundida na sequência de endereçamento do precursor do citocromo de COX₆ (da subunidade 6 da citocromo oxidase de levedura como descrito em Dumas *et al.*,

1996). O fragmento de restrição *Sall MluI* do plasmídeo pTG10350 que contém o cDNA precedentemente descrito foi transferido para o plasmídeo pTG10211 para formar o plasmídeo pTG10792.

[00199] Esse plasmídeo possui portanto um fragmento de 1,6 quilobases que contém o promotor *TDH3*, o cDNA fundido entre a ADX bovina madura e a pré-sequência *COX₆* de levedura, e o terminador *PGK1* de 5' para 3'. Esse fragmento *NotI-NotI* é inserido no plasmídeo pTG12093. A transcrição de *HIS3* e do cassete de expressão está na mesma orientação.

Exemplo 12: Cruzamento de CDR07 MAT α com TGY260 MAT α

[00200] A cepa SB14 (CDR07 MAT α X TGY260 MAT α) é colocada para esporular em um meio muito pobre que contém acetato de potássio. As diferentes ascis são em seguida colocadas para crescer em um meio mínimo que contém os produtos seguintes uracila, histidina, triptofano e adenina.

[00201] Os esporos são em seguida selecionados em um meio mínimo corretamente complementado que contém de 8 a 12 μ g/ml de nistatina. Os esporos positivos são em seguida selecionados baseados na presença do cDNA da P450-c21 humana. Para fazer isso, realiza-se uma triagem dos clones em meio Kappeli (Arreguin de Lorencez M., Kappeli O. J., 1987) com como fonte de carbono 2% de etanol (e 0,1% de glicose) em presença de 300 mg/ml de 17-OH progesterona.

[00202] A bioconversão é incubada até 72 horas. A capacidade de bioconversão é analisada em HPLC como descrito por Dumas *et al.*, 1996 e Degryse *et al.*, 1999 (cujos conteúdos são incorporados como referência ao presente pedido, notadamente as explicações dos estudos de bioconversão).

[00203] Esses clones também são analisados por seu perfil esteróico em cromatografia em fase gasosa como descrito por Duport

et al., 1998 (cujo conteúdo é incorporado como referência ao presente pedido, notadamente as explicações dos estudos de bioconversão) tendo em vista detectar o campesterol e o ergosta 5,22 dienol.

[00204] Três esporos YCC3, YCC4 e YCC5 são selecionados como produzindo ergosta 5,22 dienol e campesterol e convertendo o 17-OH progesterona em 11-deoxicortisol com uma eficácia de produção de 25, 120 e 42 µg/ml em 72 horas, respectivamente.

[00205] YCC4 e YCC5 são em seguida selecionados para duas novas transformações sucessivas com os plasmídeos pLIP5 e pTG12093 linearizados respectivamente pelas enzimas *ApaI* e *EcoR1*. Os plasmídeos pLIP5 e pTG12093 são plasmídeos de expressão intergênica respectivamente para a P450c17 bovina e a ADX bovina mitocondrial.

[00206] O pTG12093 é um plasmídeo de integração na região intergênica em 3' do locus *HIS3* enquanto que o pLIP5 é um plasmídeo de integração na região intergênica em 5' do locus *TRP1*. Por outro lado esses dois plasmídeos portam um sítio único *NotI* que permite a integração de um cassete de expressão que contém nessa ordem: promotor *TEF1*, cDNA P450c17 bovina, terminador *PGK1* para o pLIP5, e nessa ordem: promotor *TDH3*, cDNA COXVIpre: :mat ADX bovina, terminador *PGK1* para o pTG12093.

[00207] A cepa YCC4 é transformada sucessivamente pelos plasmídeos pLIP5 e pTG12093 linearizados (pelas enzimas de restrição *ApaI* e *EcoRI*).

[00208] Por ocasião da primeira transformação, os clones transformantes são primeiramente selecionados em um meio que não contém triptofano. Os clones que crescem na ausência de triptofano são em seguida selecionados por PCR com os oligonucleotídeos C17-3 e C17-5 (respectivamente SEQ ID N° 33 e SEQ ID N° 34).

[00209] Um clone YCC8 é selecionado para uma nova

transformação pelo plasmídeo pTG12093 linearizado. Da mesma maneira, os clones que crescem na ausência de histidina são selecionados e depois a presença do cDNA ADX é verificada por PCR com o auxílio dos oligonucleotídeos ADX-3 e ADX-5 (respectivamente SEQ ID N° 35 e SEQ ID N° 36).

[00210] Um clone UCY2 é selecionado, seu sinal sexual é MAT α .

Exemplo 13: Construção da cepa UCY4

[00211] A cepa UCY2 possui um gene *ATF2* funcional, isto é quer dizer que a maior parte da pregnenolona produzida é transformada em acetato de pregnenolona pela proteína ATF2p que é uma pregnenolona acetil transferase cuja função natural na levedura é desconhecida (Cauet et al., 1999). Além disso essa reação é irreversível e portanto, uma vez produzida a acetil pregnenolona não é mais transformável em hidrocortisona. Se revela portanto importante destruir essa atividade para permitir uma melhor produção de hidrocortisona.

[00212] O gene *ATF2* foi portanto submetido a uma ruptura utilizando-se para isso um gene de resistência ao G418. Para fazer isso um plasmídeo pAM3kanaC de ruptura foi construído permitindo a introdução de um marcador de resistência ao G418 no gene *ATF2*.

[00213] Esse plasmídeo foi construído a partir do plasmídeo pAM1 (cuja construção foi descrita mais acima), do plasmídeo pTG12002 que é um plasmídeo de expressão para o gene *ATF2*.

[00214] O pTG12002 é um plasmídeo de expressão para *ATF2* baseado no plasmídeo pTG10260 (Degryse et al., 1995) no qual o sítio de restrição *Xba*I da origem de replicação 2 micron foi inativado. Esse plasmídeo compreende portanto um cassete de expressão para o gene *ATF2* (Cauet et al., 1999) que compreende o promotor *CYC1*, o gene *ATF2* (enquadrado pelos sítios de restrição *Sal*I e *Mlu*I) e o terminador *PGK1*. Esse cassete foi modificado por PCR para conter o

gene *ATF2* completo que compreende o promotor do gene *ATF2*, a sequência codificante do gene *ATF2*, o terminador do gene *ATF2* em um fragmento de restrição *KpnI*, *NotI*. Esse fragmento *KpnI-NotI* é introduzido nos sítios *KpnI-NotI* do plasmídeo pAM1 para dar o plasmídeo pAM3.

[00215] No plasmídeo pAM3, o cassete de expressão da resistência ao G418 é introduzido no gene *ATF2* acarretando sua inativação.

[00216] Para fazer isso o plasmídeo pAM3 é digerido pela enzima de restrição *Accl*, e depois parcialmente pela enzima de restrição *SacI*. Uma banda de cerca de 7500 pb é purificada em gel. O plasmídeo pFA6a kanMX4 (Wach *et al.*, Methods in Microbiology Volume 26 Yeast Gene Analysis Chapitre 5 PCR-based Gene Targeting in *Saccharomyces cerevisiae*) é digerido por *SacI* e *Accl*, a banda de 1500 pb é purificada em gel. Os dois fragmentos são ligados e depois transformados. Um plasmídeo é obtido pAM3kanaC. O pAM3kanaC é digerido por *PvuII* e *NotI*, a banda de 2215 pb é purificada em gel, e depois transformada em UCY2 que é espalhada em placas de meio rico que contém 130 µg/ml de G418. Cerca de 600 clones são transplantados nesse meio que contém o G418, dois clones são resistentes ao G418. Um clone que não contém o plasmídeo pAM3 é conservado.

[00217] Esse método de inativação de gene é bem conhecido pelo profissional.

[00218] O clone único assim obtido é colocado para bioconverter com 100 µg/ml de pregnenolona em meio Kappeli.

[00219] No final de 24 horas, a ausência de acetato de pregnenolona é verificada por extração e cromatografia em fase gasosa como descrito em Cauet *et al.*, 1999. Esse fenômeno indica que o gene *ATF2* responsável pela acetilação da pregnenolona sofreu mesmo ruptura e não é mais funcional. A cepa é chamada de UCY4.

Exemplo 14: Construção das cepas UCY3 e UCY26

[00220] A triagem dos esporos obtidos por cruzamento das cepas CDR07 e TGY260 resultou em várias cepas entre as quais as cepas YCC4 e YCC5. Como descrito acima, a cepa YCC4 foi transformada por uma série de 2 plasmídeos: pLIP5 e pTG12093. Um esporo UCY2 foi então selecionado (conforme exemplo 12). Da mesma maneira, a cepa YCC5 também foi transformada pelos plasmídeos pLIP5 e pTG12093 e um novo esporo chamado de UCY3 foi obtido. Como UCY2, UCY3 é caracterizado pela presença e pela expressão da $\Delta 7$ redutase de *A. thaliana* medida pela resistência à nistatina e pela presença de brassicasterol e de campesterol como esterol majoritário dessas leveduras recombinantes. A presença de cDNA ADX é verificada por PCR com o auxílio dos nucleotídeos ADX-3 e ADX-5 (respectivamente SEQ ID N° 35 e SEQ ID N° 36), e depois por Western Blot como descrito em Dumas *et al.*, 1996, incorporado como referência aqui no que refere-se à descrição dessa técnica.

[00221] A atividade de hidroxilação em 17 e 21 da progesterona é verificada por bioconversão da progesterona em 17OH-progesterona e 11-deoxicortisol. Para fazer isso, a cepa é incubada em presença de 200 mg/l de progesterona como descrito em Dumas *et al.*, 1996 e Degryse *et al.*, 1999, UCY3 é capaz de produzir o 11-deoxicortisol a partir da progesterona indicando a presença das atividades P450c17 e P450c21. Detecta-se também a presença de 4 pregneno $17\alpha,20\alpha$ diol 3 ona indicando que pelo menos uma das duas atividades codificadas por GCY1 ou YPR1 está presente na cepa. Para evitar o acúmulo de acetato de pregnenolona, a atividade de acetilação da pregnenolona codificada pelo gene ATF2 foi eliminada. Com esse objetivo, o plasmídeo pAM3kanaC (conforme exemplo 13) foi usado para transformar a cepa UCY3. o pAM3KanaC é primeiramente digerido por *PvuII* e *NotI*, a banda de 2215 pb é purificada em gel, e depois

transformada em UCY3 que é espalhada em placas de meio rico que contém 130 µg/ml de G418. Colônias resistentes ao antibiótico G418 e que não são mais capazes de transformar a pregnenolona em acetato de pregnenolona são isoladas; uma colônia UCY26 é mais especialmente selecionada para novas transformações e para testar sua produção de hidrocortisona.

Exemplo 15: Construção da cepa UCY5

[00222] Com o objetivo de dispor de uma melhor variabilidade genética, a cepa UCY2 (conforme exemplo 12) foi cruzada com a cepa TGY245 (conforme exemplo 5), uma cepa diplóide YSA2-2n foi assim selecionada. Essa cepa foi colocada em condição de produção de ascos e 85 ascos foram dissecados (como descrito em "Yeast Protocols in Molecular Biology Volume 53 p 59-67, 1996"). Os esporos isolados são triados baseado em sua propriedade auxotrófica. Assim, os clones capazes de crescer na ausência de triptofano e de histidina e que necessitam da adenina são mais especialmente selecionados. A expressão da $\Delta 7$ redutase é verificada tendo-se para isso a certeza da resistência da cepa à nistatina assim como da presença de campesterol e brassicasterol na membrana dessas cepas. Essa última análise é realizada por cromatografia em fase gasosa dos esteróis totais dessas cepas como descrito em Duport *et al.*, 1998. Além da presença dos csDNA que codificam para a P450c17 e a ADX é verificada por PCR com o auxílio dos nucleotídeos C17-3 e C17-5 (respectivamente, SEQ ID N° 33 e SEQ ID N° 34) oligonucleotídeos ADX-3 e ADX-5 (respectivamente SEQ ID N° 35 e SEQ ID N° 36) respectivamente. Finalmente, a funcionalidade dos genes GCY1 e YPR1 nesses esporos positivos é verificada de duas maneiras: ou por PCR, ou por ausência da atividade 20 alfa redutase sobre a 17 OH progesterona.

[00223] Por PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos X1TEF1

e X2C21 (respectivamente SEQ ID N° 47 e SEQ ID N° 48), detecta-se a ruptura do gene YPR1 pelo cassete de expressão para a P450c21 humana em *S. cerevisiae* que contém o promotor TEF1, o cDNA da P450c21 humana assim como o terminador PGK. Detecta-se também por PCR, utilizando-se para isso os pares de oligonucleotídeos X3TDH3 e X2C21 (respectivamente SEQ ID N° 49 e SEQ ID N° 48), a ruptura do gene CGY1 pelo cassete de expressão para a P450c21 humana em *S. cerevisiae* que contém o promotor TDH3, o cDNA da P450c21 humana assim como o terminador PGK.

[00224] O desaparecimento das duas atividades CGY1 e YPR1 e a presença da atividade que corresponde à atividade P450c17 e P450c21 são finalmente verificadas por bioconversão da progesterona em 11-deoxicortisol nas condições descritas por Dumas *et al.*, 1996, modificadas por Degryse *et al.*, 1999. As leveduras recombinantes são incubadas a 30°C em presença de 200 mg/l de progesterona com uma densidade celular de 5 em um meio de cultura de tipo Kappeli que contém 2% de galactose ou 2% de glicose como fonte de carbono, em um volume de 10 ml. Depois de uma incubação de 48 horas, extrai-se o meio de cultura dessas leveduras como descrito precedentemente e mede-se em especial a quantidade de 17OH progesterona e 11-deoxicortisol produzida por HPLC. O esporo selecionado não produz mais quantidade detectável de 4 pregneno 17 α ,20 α diol 3 ona mas produz a 17OH progesterona e o 11-deoxicortisol utilizando para isso as duas fontes de carbono. O clone escolhido produz a maior quantidade de 11-deoxicortisol.

[00225] Uma cepa que responde positivamente a todos esses critérios é mais especialmente selecionada para novas transformações, essa cepa é chamada de UCY5.

Exemplo 16: Construção dos plasmídeos pFM10 e pTG10897

a) Construção do plasmídeo pFM10

[00226] O plasmídeo pFM10 é um vetor que permite a expressão simultânea de 4 proteínas na levedura. Ele não contém origem de replicação para *E. coli* nem gene de resistência à ampicilina, esse plasmídeo não pode portanto se replicar em *E. Coli*. Sua obtenção é realizada por recombinação na levedura de dois plasmídeos: pFM7 e pCB12. Contrariamente ao plasmídeo pFM10, esses últimos se replicam ambos em *E. coli* visto que eles possuem o replicon *E. coli*. O plasmídeo pFM7 também se replica na *S. cerevisiae*, visto que ele compreende também a origem de replicação 2 micron da levedura *S. cerevisiae*. Esses dois plasmídeos possuem por outro lado as sequências R1 e R2 (respectivamente SEQ ID N° 39 e SEQ ID N° 40) que bordejam os cassetes de expressão assim como os marcadores de seleção. As sequências R1 e R2 são provenientes do gene da fotoclorofilida oxidoreductase de *A. thaliana* e seu tamanho é de cerca de 300 pares de bases cada uma.

[00227] As duas sequências R1 e R2 são clonadas em orientação inversa nos plasmídeos pFM7 e pCB12. Assim, entre as sequências R1 e R2, o plasmídeo pFM7 contém na ordem: a origem de replicação 2 micron contida no fragmento 2 micron (fragmento bordejado pelos sítios de restrição *EcoRI*, tal como descrito por Urban *et al.*, 1994), um fragmento bordejado por sítios *NotI* que provém do plasmídeo pCD63 descrito em Duport *et al.*, 1998, que contém dois cassetes de expressão para a forma madura da P450_{SCC} e a forma madura da ADX separada pelo gene *URA3* da levedura funcional, vem em seguida a sequência R2. Do mesmo modo o plasmídeo pCB12 contém as sequências R1 e R2 mais clonadas no sentido inverso das sequências do plasmídeo pFM7. Assim, entre as sequências R1 e R2, são encontrados o cassete de expressão para a P450_{11β}, o marcador de seleção ADE2, o cassete de expressão para a 3β-HSD de origem bovina. O cassete de expressão para a P450_{11β} provém do plasmídeo

pCV29 e contém o promotor CYC1, um cDNA híbrido que codifica para a P450_{11β} e um terminador PGK. O gene ADE2 que provém do plasmídeo pAM1, trata-se do fragmento *Bgl*III-*Bgl*III. Do mesmo modo, o cassete de expressão para a 3β-HSD bovina, quer dizer o promotor TDH3, o cDNA da 3β-HSD bovina e o terminador PGK, provém do plasmídeo pCC12, trata-se do fragmento *Cl*al-*As*cl.

b) Construção do plasmídeo pTG10897

[00228] Com o auxílio de dois oligonucleotídeos de 20 meros que correspondem respectivamente à parte 5' e 3' da sequência codificante do gene *ATF2* (e que compreendem também os sítios de clonagem) e utilizando-se para isso como matriz DNA genômico da cepa FY 1679-28c, amplifica-se por PCR a sequência codificante do gene *ATF2*. Esse produto de PCR é em seguida digerido pelas enzimas *Cl*al e *Hind*III e é clonado entre os sítios *Cl*al e *Hind*III do plasmídeo pTG10031 [Degryse, 1995 #102] para dar o plasmídeo pTG10885. Esse plasmídeo serve de base para a construção de um plasmídeo de ruptura do gene *ATF2*. A sequência do gene *URA3* foi amplificada a partir de DNA genômico da cepa TGY156 (descrita em Cauet *et al.*, 1999 e incorporada aqui como referência), essa cepa possui de fato um gene *ATF2* interrompido pelo gene *URA3*. Os oligonucleotídeos OTG10842 (SEQ ID N° 41) e OTG10841 (SEQ ID N° 42) serviram portanto para a amplificação em matriz de DNA genômico da cepa TGY156 e o produto da amplificação serviu como semente de recombinação com o plasmídeo pTG10885 digerido pelas enzimas de restrição *Bst*XI e *Stu*I.

[00229] Obtém-se assim o plasmídeo pTG10897 que contém a sequência codificante do gene *ATF2* interrompida pelo gene *URA3*. De fato, o gene *URA3* funcional se encontra entre 509 nucleotídeos da parte 5' da sequência codificante de *ATF2* e 444 nucleotídeos da parte 3' dessa sequência codificante.

Exemplo 17: Construção das cepas UCY6, UCY16, UCY16-pFM10, UCY19, UCY20, UCY24, UCY25, UCY27

[00230] A partir da cepa UCY5, uma série de novas cepas foi construída com o objetivo de melhorar a produção de esteróide de interesse. De fato, a cepa UCY5 não expressa adrenodoxina redutase que é um componente essencial da reação de corte da cadeia lateral pela P450_{SCC}. Por outro lado, como foi descrito antes, o gene ATF2 codifica para uma acetil transferase que utiliza a pregnenolona como substrato e sua ruptura permite suprimir essa reação parasita de acetilação e aumentar assim o rendimento em esteróide de interesse. Finalmente, a via de biossíntese exógena utiliza a atividade ARH1p endógena, essa última sendo essencial para a sobrevivência da levedura. No entanto, essa atividade mitocondrial, que substitui a adrenodoxina redutase de mamífero, poderia ser limitante nas cepas que produzem hidrocortisona. Uma cepa que possui certas modificações que permitem aumentar de maneira considerável o rendimento de produção em esteróide de interesse foi portanto construída a partir da cepa UCY5. Assim essa cepa é desprovida de atividade ATF2, superproduz a proteína adrenodoxina redutase e superproduz também a proteína ARH1.

[00231] Para permitir uma expressão da ADR na cepa UCY5, essa última foi transformada pelo vetor pTG10925 (conforme exemplo 2 f) que quando ele é transformado na levedura sob a forma linear permite a integração no locus *LEU2* e a expressão da ADR sob o controle do promotor *TEF1*. A expressão da ADR foi verificada por Western Blot como descrito em Dumas *et al.*, 1996. Um clone que expressa a ADR e chamado de UCY6 foi mais especialmente utilizado para as transformações seguintes.

[00232] Com o objetivo de eliminar a reação parasita de acetilação que transforma a pregnenolona em acetato de pregnenolona e que é

catalisada pela enzima *ATF2*, o gene *ATF2* que codifica para essa enzima foi rompido. Esse último foi de fato interrompido pelo marcador *URA3*, para fazer isso, o fragmento *NotI* do plasmídeo pTG10897 que contém a sequência do gene *ATF2* interrompido pelo gene funcional de levedura *URA3* foi utilizado. Esse fragmento é utilizado para transformar a cepa UCY6. As colônias capazes de crescer na ausência de uracila são selecionadas, e depois mede-se a capacidade desses clones para transformar a pregnenolona em acetato de pregnenolona como descrito por Cauet et al., 1999. Um clone capaz de crescer na ausência de uracila e incapaz de transformar a pregnenolona em acetato de pregnenolona é mais especialmente isolado. Esse clone é chamado de UCY16.

[00233] Essa cepa não podendo ser transformada por plasmídeos que portam unicamente o marcador *URA3*, dois novos plasmídeos foram construídos: os plasmídeos pCB12 e pFM7. Esses dois plasmídeos quando eles são recombinados juntos, permitem obter o plasmídeo pFM7 baseado nos marcadores *URA3* ou/e *ADE2* (conforme acima e Figura 5). Assim para obter o plasmídeo pFM10, o plasmídeo pFM7 é linearizado pela enzima de restrição *AatII* e o fragmento de DNA correspondente é isolado em gel. O plasmídeo pCB12 é no que lhe diz respeito digerido por *BamHI* e a banda de 9300 pares de bases é isolada de acordo com as técnicas clássicas de biologia molecular. Cerca de 5 µg dos fragmentos de pCB12 e pFM7 são misturados e servem para transformar a cepa UCY16. Alguns clones UCY16-pFM10, capazes de crescer em meio mínimo (sem uracila e aminoácidos), são isolados e as cepas correspondentes são testadas para seu nível de produção de esteróides de acordo com o protocolo descrito abaixo.

[00234] Alternativamente e com o objetivo de poder utilizar depois os plasmídeos do tipo pCV29 baseados em um marcador *URA3*, a

ruptura do gene *ATF2* na cepa UCY6 também foi obtida transformando-se para isso essa cepa pelo plasmídeo pAM3kanaC linearizado (conforme exemplo 13). As colônias resistentes ao G418 são em seguida testadas para a ausência ou a presença da atividade pregnenolona acetil transferase como descrito por Cauet et al., 1999. Uma colônia resistente ao G418 é que não possui mais a atividade pregnenolona acetil transferase é mais especialmente selecionada. Essa cepa é chamada de UCY24.

[00235] Com o objetivo de aumentar a atividade *ARH1* em uma cepa que contém uma via de produção exógena da hidrocortisona, a cepa UCY5 foi transformada pelos plasmídeos pTG12048 ou pTG12050 linearizado previamente por *XhoI* e *SapI* respectivamente. O plasmídeo pTG12048 que foi descrito acima permite a superexpressão do gene *ARH1* no locus *LEU2* sob o controle do promotor *CYC1*. O plasmídeo pTG12050 difere do plasmídeo pTG12048 unicamente pelo fato de que o promotor *CYC1* que controla a expressão do gene *ARH1* foi substituído pelo promotor *TEF1* tal como descrito em Degryse et al., 1995 e Dumas et al., 1996. UCY5 foi transformado por pTG12048 ou pTG12050 linearizado. Em cada um dos dois casos, as colônias capazes de crescer na ausência de leucina foram selecionadas. Além disso a presença dos cassetes de expressão para o gene *ARH1* foi verificada por PCR. Dois pares de oligonucleotídeos permitem de fato verificar a presença de uma cópia suplementar do gene *ARH1* (sob o controle do promotor *CYC1* ou *TEF1*). Por um lado, o par *arh1D* (SEQ ID N° 43) e *nfs1R* (SEQ ID N° 44) permite verificar a presença da junção entre o gene *ARH1* e o gene *NFS1*. Por outro lado, o par *leu2D* (SEQ ID N° 45) e *arh1R* (SEQ ID N° 46) permite verificar a junção entre o gene *LEU2* e o gene *ARH1*.

[00236] Além da presença do cassete de expressão para o gene

ARH1 que codifica para a atividade ARH1, a expressão da proteína ARH1p também foi testada nos clones obtidos. A detecção da superexpressão de ARH1p não é no entanto uma coisa fácil. Esse fato é devido à presença natural da proteína ARH1p a um baixo nível nas cepas de *S. cerevisiae*. Experiências de Western Blot realizadas como descrito em Dumas *et al.*, 1996 permitem no entanto confirmar o aumento da quantidade de ARH1p. Além das experiências de Western Blot que se revelam delicadas, a presença de uma quantidade aumentada de ARH1p pode ser verificada por experiências de redução do citocromo c ou de 11 beta hidroxilação do 11-deoxicortisol reconstituídas *in vitro* com mitocôndrias purificadas de leveduras recombinantes como descritas em Lacour *et al.*, 1998 e Dumas *et al.*, 1996, respectivamente. Dois clones, UCY19 e UCY20, respectivamente transformados por pTG12048 e pTG12050 e que sobre-expressam *ARH1*, são mais especialmente selecionados. O gene *ATF2* foi em seguida rompido nessas cepas como descrito mais acima. Brevemente, o plasmídeo pAM3kanaC foi linearizado e depois utilizado para transformar as cepas UCY19 e UCY20. Os clones foram em seguida selecionados por sua propriedade de resistência ao G418 e pela ausência de atividade pregnenolona acetil transferase como descrito por Cauet *et al.*, 1999. Dois clones derivados de UCY19 e UCY20 são mais especialmente selecionados. Trata-se respectivamente das cepas UCY25 e UCY27 (conforme Figura 2).

Exemplo 18: Produção de esteróides pelas cepas de acordo com a invenção

a) Transformação dos UCY2 e UCY4 por pCV29 e pCC12

[00237] As cepas UCY2 e UCY4 foram transformadas pelos dois plasmídeos pCV29 e pCC12, descritos mais acima, dos quais as estruturas são lembradas abaixo e nas figuras 3 e 4.

[00238] O plasmídeo pCV29 porta uma origem de replicação de tipo

2 micron para replicação na levedura. Por outro lado, esse plasmídeo porta 3 cassetes de expressão respectivamente para a P45011 β humana/bovina híbrida marcada com a mitocôndria tal como descrito precedentemente, as formas maduras (com uma metionina na extremidade NH₂ terminal) da adrenodoxina e da P450_{SCC}. A expressão dessas três proteínas está sob o controle dos promotores *CYC1* (P45011 β) e *GAL10/CYC1* (ADX e P450_{SCC} sob a forma madura).

[00239] O plasmídeo pCC12 é um plasmídeo de pequeno número de cópias que porta um cassete de expressão para a forma madura da adrenodoxina redutase bovina sob o controle do promotor *TEF1* assim como um cassete de expressão para a 3 β -HSD bovina sob o controle do promotor *TDH3*.

[00240] Essas cepas são colocadas para crescer em condições clássicas de fermentação em meio Kappeli com glicose como fonte de carbono. No final da fermentação (180 h), os esteróides são extraídos como descrito precedentemente e caracterizados em cromatografia líquida de alta pressão.

[00241] A identidade dos produtos foi verificada por cromatografia em fase gasosa, por cromatografia de alta pressão em fase líquida e em fase reversa combinada ou não com a espectrometria de massa e a ressonância magnética nuclear (conforme Tabela 1).

Tabela 1. Balanço dos esteróides obtidos (resultados expressos em mg/l)

Cepas	Acetato de pregnenolona	Progesterona	4-pregnenol-17 α ,20 α diol 3 ona	Não identificado	Corticosterona	Hidrocortisona
UCY2/pC V29 + pCC12	18	7	5	5	12	15
UCY4/pC V29 + pCC12	0	30	44	24	23	80

b) Transformação das cepas UCY24, UCY25, UCY26 e UCY27 por pCV29 e pCC12 e transformação da cepa UCY16 por pFM10

[00242] Essas cepas possuem numerosas modificações e se revelam difíceis de transformar. Em consequência disso, um protocolo baseado na preparação de esferoplastos foi utilizado para essas transformações, como descrito por Burgers *et al.*, 1987. UCY16 foi transformado de acordo com esse protocolo pelos plasmídeos pFM7 e pCB12, esses últimos dando o plasmídeo pFM10 por recombinação *in vivo* na levedura. Como descrito acima, o plasmídeo pFM10 é um plasmídeo de cópias múltiplas de levedura, que não contém sequências bacterianas e que permite a expressão de 4 proteínas heterólogas. Essas quatro proteínas são como foi visto precedentemente: uma forma quimérica do citocromo P450_{11β}, a 3β-HSD bovina, a ADX madura e o citocromo P450_{SCC} maduro. Os cDNA correspondentes são colocados respectivamente sob o controle dos promotores *CYC1*, *TDH3*, *GAL10/CYC1* e *GAL10/CYC1*. Os transformantes são selecionados em um meio mínimo sem nenhuma adição. A seleção é feita unicamente baseada no marcador *ADE2* (crescimento na ausência de adenina), a presença de um gene funcional *URA3* no genoma e que serve para a inativação do gene *ATF2* não permite a seleção baseada no gene *URA3*. É portanto necessário triar várias colônias para que se tenha certeza de ter um plasmídeo pFM10 funcional na cepa UCY16.

[00243] As cepas UCY24, UCY25, UCY26 e UCY27 foram transformadas pelos plasmídeos pCV29 e pCC12 de acordo com o mesmo protocolo de preparação de esferoplastos. Como descrito acima, o plasmídeo pCV29 é um plasmídeo de cópias múltiplas em naveta entre *E. coli* e *S. cerevisiae*. Ele permite a expressão do citocromo P450_{11β}, da ADX madura e do citocromo P450_{SCC} respectivamente sob o controle dos promotores *CYC1*, *GAL10/CYC1* e

GAL10/CYC1 (conforme Figura 3). O plasmídeo pCC12 é um plasmídeo de uma cópia de levedura que permite a expressão da ADR madura bovina e da 3 β -HSD bovina sob o controle dos promotores *TEF1* e *TDH3*, respectivamente (conforme Figura 4).

[00244] Todas essas cepas são colocadas para crescer em Erlenmeyer (volume 100 ml e que contém 30 ml de meio de cultura) em condições clássicas de fermentação em meio Kappeli com como fonte de carbono 2% de etanol e 0.1% de glicose. Depois de 168 horas de cultura, 500 μ l de meio de cultura (células + meio) são extraídos em duas vezes como auxílio de 4 ml de dicloroetano. A fase orgânica é reunida e depois separada em dois para ser secada sob fluxo de nitrogênio. O extrato seco é recolocado em suspensão em 100 μ l de uma mistura de acetonitrila/água (50/50 volume/volume) ou 100 μ l de dicloroetano. Os extratos recolocados em suspensão na mistura de acetonitrila/água são tratados por HPLC, isso permite uma análise da composição em diferentes esteróides (hidrocortisona, cortexolona, corticosterona, 17-OH progesterona, 4 pregneno 17 α ,20 α diol 3 ona) como descrito em Valvo *et al.*, 1994. Os extratos recolocados em suspensão no dicloroetano são analisados por cromatografia em fase gasosa como descrito em Duport *et al.*, 1998, essa última análise permitindo medir a quantidade de pregnenolona e de progesterona das amostras. Para cada uma das cepas transformadas, mede-se assim a produtividade em esteróides de uma dezena de clones. Os resultados apresentados abaixo, dão os resultados do melhor dos dez clones testados para cada uma das cepas UCY24, UCY25, UCY26 e UCY27 transformadas por pCV29 e pCC12 e da cepa UCY16 transformada por pFM10.

Tabela 2. Balanço das esteróides obtidos (resultados expressos em mg/l exceto a última linha: resultados expressos em porcentagem da totalidade dos esteróides)

	UCY24 pCV29+ pCC12	UCY25 pCV29+ pCC12	UCY26 pCV29+ pCC12	UCY27 pCV29+ pCC12	UCY16 pFM10	UCY4 pCV29+ pCC12
17 OH progesterona	0,6	0,6	1,0	0,6	0,5	0,2
deoxicorticosterona	0,5	0,0	0,2	0,3	1	0,0
cortisolona	4,5	2,7	2,1	2,0	7,6	0,7
4 pregneno 17 α ,20 diol 3 ona	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5
corticosterona	7,5	10,8	7,5	9,0	8,9	3,4
hidrocortisona	17,7	29,2	22,3	24,7	15,8	12,3
Esteróides Totais	30,8	43,3	33,1	36,6	33,8	21,2
% hidrocortisona	57	67	67	67	47	58

NB: Não se detecta nem pregnenolona nem acetato de pregnenolona no meio de cultura dessas cepas

[00245] As cepas UCY16 pFM10, UCY24 pCV29+pCC12, UCY25 pCV29+pCC12, UCY26 pCV29+pCC12 e UCY27 pCV29+pCC12 apresentadas acima são portanto capazes de produzir quantidades de hidrocortisona superiores às quantidades de hidrocortisona produzidas pela cepa UCY4/pCV29+pCC12. A quantidade total de esteróides passa assim de 21,2 $\mu\text{g/ml}$ na cepa UCY4/pCV29+pCC12 para 43,3 $\mu\text{g/ml}$ na cepa UCY25 pCV29+pCC12 enquanto que a quantidade de hidrocortisona passa de 12,3 $\mu\text{g/ml}$ para 29,2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Além disso, a hidrocortisona representa nesses exemplos até cerca de 70% dos esteróides totais. Observa-se portanto um grande aumento da quantidade e da qualidade da hidrocortisona produzida pois nenhuma dessas cepas produz o contaminante 4 pregnen 17,20 diol 3 ona. Essa última característica especialmente vantajosa é devido à ausência das proteínas codificadas pelos genes *GCY1* e/ou *YPR1* que são responsáveis pela reação da cetona em 20.

[00246] Também é interessante notar que de maneira inesperada, a

superprodução controlada de ARH1p sob o controle do promotor CYC1 aumenta de modo significativo a quantidade de esteróides totais produzidos assim como a produção de hidrocortisona (conforme UCY24 pCV29+pCC12 versus UCY25 pCV29+pCC12). No entanto essa expressão não deve ser muito grande para que se obtenha o efeito desejado. Assim, se uma expressão da proteína ARH1 a um nível superior em relação a um nível fisiológico é desejável, é preciso ter o cuidado para não superexpressar demais essa proteína sob pena de perder esse aumento de produção em esteróides. Assim, o promotor *TEF1* que é reconhecido como muito mais forte do que *CYC1* (Nacken *et al.*, 1996) dá resultados insatisfatórios (conforme UCY25 pCV29+pCC12 versus UCY27 pCV29+pCC12). Em conclusão a cepa UCY25/pCV29+pCC12 tem um potencial estimado para produzir 200 mg/l de hidrocortisona em fermentador com um único contaminante maior (a corticosterona).

c) Exemplo de produção em grande volume das cepas de acordo com a invenção

[00247] Duas das cepas precedentes foram colocadas para crescer em um fermentador de grande volume em meio Kappeli de acordo com técnicas bem conhecidas pela pessoa versada na técnica (conforme por exemplo Risenberg D. *et al.*, 1999). A técnica de cultura utilizada é um elemento descontínuo alimentado com meio concentrado (fed-batch). O fermentador com volume total de 15 litros contém no início 6 litros de meio. A adição de modo contínuo de 4 litros de meio concentrado suplementar no decorrer da fermentação assim como de líquidos corretores de pH e a adição contínua de etanol leva o volume final a cerca de 11,5 litros no final da cultura. As cepas UCY4 pCV29+pCC12 e UCY16 pFM10 foram assim cultivadas durante 180 h e uma produção aumentada em hidrocortisona pôde assim ser obtida (conforme tabela 3). A partir desses resultados, foram

extrapolados os resultados que podem ser considerados para as cepas UCY24 pCV29+pCC12, UCY25 pCV29+pCC12, UCY26 pCV29+pCC12 e UCY27 pCV29+pCC12 (conforme tabela 3).

Tabela 3. Produção de hidrocortisona de diferentes clones obtidos de acordo com a invenção (resultados em mg/l)

Cepas	Hidrocortisona em mg/l
UCY4 pCV29+pCC12	80
UCY16 pFM10	110
UCY24 pCV29+pCC12	123*
UCY25 pCV29+pCC12	203*
UCY26 pCV29+pCC12	155*
UCY27 pCV29+pCC12	172*

* Esses resultados foram obtidos por extrapolação dos resultados obtidos em fermentador de grande volume com as cepas UCY4 pCV29+pCC12 e UCY16 pFM10.

Depósito de material biológico

[00248] Os organismos seguintes foram depositados em 24 de janeiro de 2001 na Coleção Nacional de Culturas de Microorganismos (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, França, de acordo com as disposições do tratado de Budapeste.

- Cepa CDR07 MAT α Número de ordem I-2616
- Cepa TGY260 Número de ordem I-2615

Lista das cepas descritas no presente pedido

Fy1679-18b = (n) MAT α *ura3-52 trp1- Δ 63 leu2- Δ 1 his3- Δ 200 fen1* GAL fen^S *ura⁻ trp⁻ leu⁻ his⁻*.

Fy1679-28c = (n) MAT α *ura3-52 trp1- Δ 63 leu2- Δ 1 his3- Δ 200 fen1* GAL fen^S *ura⁻ trp⁻ leu⁻ his⁻*.

TGY195#4 = Fy1679-18b *ypr1::URA3*.

TGY212-1 = Fy1679-18b *ypr1::TEF1_p::P450c21 [5x?]ura⁻ trp⁻ leu⁻ his⁻*.

TGY243-1 = TGY212-1 *gcy1::URA3 trp⁻ leu⁻ his⁻*.

TGY245-2D = TGY243-1 *gcy1::TDH3_p::P450c21* *ura⁻ trp⁻* *leu⁻ his⁻*.

TGY260-A = TGY245-2D *LEU2::CYC1_p::ARH1* *ura⁻ trp⁻ his⁻*.

CDR01 = Fy1679-18b *MAT α LEU2::'b-mat* ADR' *ura⁻ trp⁻* *his⁻*.

CDR07 MAT α = *MAT α ade2::GAL10/CYC1_p:: Δ^7* *ura⁻ trp⁻ leu⁻* *his⁻ ade⁻* (esporo de CA10 x Fy1679-28c).

CDR07 MATa = *MATa ade2::GAL10/CYC1_p:: Δ^7* *ura⁻ trp⁻ leu⁻* *his⁻ ade⁻* (esporo de CA10 x Fy1679-28c).

CA03 = CDR01 *ade2::GAL10/CYC1_p:: Δ^7* *ura⁻ trp⁻ ade⁻ his⁻*, resistente à nistatina (Duport *et al.*, 1998).

CA10 = CDR03 *erg5::PGK1_p::higro^R* *ura⁻ trp⁻ ade⁻ his⁻*, resistente à nistatina e à higromicina (Duport *et al.*, 1998).

SB14 (2n) = TGY260-A x CDR07 *MAT α* .

YCC4 = (n) *MAT α ade2::GAL10/CYC1_p:: Δ^7 , LEU2::CYC1_p::ARH1, ypr1::TEF1_p::P450c21, ERG5, fen1(?)*, *ura⁻ trp⁻ ade⁻ his⁻*, resistente à nistatina, (esporo de SB14).

YCC8 = YCC4 transformada com pLIP5 (*TRP1::TEF1_p::P450c17::PGK1_t*), *ura⁻ ade⁻ his⁻*, resistente à nistatina.

UCY2 = YCC8 transformada com pTG12093 (*HIS3::TDH3_p::CoxVI_{pré}::matADX::PGK1_t*): *HIS3::TDH3_p::CoxVI_{pré}::matADX::PGK1_t, ERG5, fen1 (?)*, *ura⁻ ade⁻*, resistente à nistatina.

UCY4 = UCY2 *atf2- Δ ::G418^R* *ura⁻ ade⁻*, resistente à nistatina e ao G418.

YCC5 = (n) *MAT α ade2::GAL10/CYC1_p:: Δ^7 Redutase, LEU2::CYC1_p::ARH1, gcy1::TDH3_p::P450c21, ERG5, fen1(?)*, *ura⁻ trp⁻ ade⁻ his⁻*, (resistente à nistatina, esporo de SB14).

YCC9 = YCC5 transformada com pLIP5 (*TRP1::TEF1_p::P450c17::PGK1_t*), *ura⁻ ade⁻ his⁻*, resistente à nistatina.

UCY3 = YCC9 transformada com pTG12093 (*HIS3::TDH3_p::CoxVI_{pré}::matADX::PGK1_t*):
HIS3::TDH3_p::CoxVI_{pré}::matADX:: PGK1_t, ERG5, fen1 (?), *ura⁻ ade⁻*,
 (resistente à nistatina).

UCY26 = UCY3 *atf2-Δ::G418^R ura⁻ ade⁻*, (resistente à nistatina e ao G418).

YSA2 (2n) = TGY245-2D x UCY2.

UCY5 = (n) *MATα ade2::GAL10/CYC1_p::Δ7Redutase, LEU2:: CYC1_p::ARH1, ypr1::TEF1_p::P450c21, ERG5, gcy1::TDH3_p::P450c21 fen (?)*, *ura⁻ trp⁻ his⁻*, resistente à nistatina, (esporo de YSA2).

UCY6 = UCY5 *LEU2::TEF1::matADR::PGK1_t*.

UCY16 = UCY6, *atf2::URA3::atf2*.

UCY19 = UCY5 *LEU2::CYC1::ARH1*.

UCY20 = UCY5 *LEU2::TEF1::ARH1*.

UCY25 = UCY19, *atf2-Δ::G418^R* (resistente à nistatina e ao G418).

UCY27 = UCY20, *atf2-Δ::G418^R* (resistente à nistatina e ao G418).

UCY24 = UCY6, *atf2-Δ::G418^R* (resistente à nistatina e ao G418).

Bibliografia:

Anderson S. *et al.*, Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem*, 1989. 264 (14): p. 8222-8229.

Arreguin de Lorencez M. e Kappeli O. J., Regulation of gluconeogenic enzymes during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* growing in a chemostat. *Gen Microbiol*, 1987. 133 (Pt 9): p. 2517-22.

Bonneaud N. *et al.*, A family of low and high copy

replicative, integrative and single-stranded *S. Cerevisiae/E. Coli* shuttle vectors. *Yeast*, 1991 Aug-Sep; 7 (6): p. 609-15.

Burgers P. M. et. Percival K. J., Transformation of yeast spheroplasts without cell fusion. *Anal Biochem*, 1987. 163 (2): p. 391-7.

Cauet *et al.*, Pregnenolone esterification in *Saccharomyces cerevisiae*. A potential detoxification mechanism. *Eur J Biochem*, 1999. 261 (1): p. 317-24.

Chau SC. *et al.*, Cloning of cDNA encoding steroid 11 beta-hydroxylase (P450c11). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987. Oct; 84 (20): p. 7193-7.

Degryse E. *et al.*, In vivo cloning by homologous recombination in yeast using a two-plasmid-based system. *Yeast*, 1995. 11 (7): p. 629-40.

Degryse E., In vivo intermolecular recombination in *Escherichia coli*: application to plasmid constructions. *Gene*, 1996. 170 (1): p. 45-50.

Degryse E. *et al.*, Pregnenolone metabolized to 17alpha-hydroxypro-gesterone in yeast: biochemical analysis of a metabolic pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1999. 71 (5-6): p. 239-46.

Dumas B. *et al.*, 11 beta-hydroxylase activity in recombinant yeast mitochondria. In vivo conversions of 11-deoxycortisol to hydrocortisone. *Eur J Biochem*, 1996. 238 (2): p. 495-504.

Duport C. *et al.*, Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat Biotechnol*, 1998. 16 (2): p. 186-9.

Hu MC. E Chung BC., Expression of human 21-hydroxylase (P450c21) in bacterial and mammalian cells: a system to characterize normal and mutant enzymes. *Mol Endocrinol.*, 1990. 4 (6): p. 893-8.

Kawamoto T. *et al.*, Cloning of cDNA and genomic DNA for human cytochrome P-450 11 beta. *FEBS Lett*, 1990. 269 (2): p. 345-9.

Kuronen P. *et al.*, Reversed-phase liquid chromatographic separation and simultaneous profiling of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. *J. Chromatogr A*, 1999. 863 (1): p. 25-35.

Lacour T., T. Achstetter, e B. Dumas, Characterization of recombinant adrenodoxin reductase homologue (Arh 1 p) from yeast. Implication in vitro cytochrome p45011beta monooxygenase system. *J Biol Chem*, 1998. 273 (37): p. 23984-92.

Lathe R. *et al.*, Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts. *Gene*, 1987. 57: p. 193-201.

Lecain E. *et al.*, Cloning by metabolic interference in yeast and enzymatic characterization of *Arabidopsis thaliana* sterol delta 7-reductase. *J Biol Chem*, 1996. 271 (18): p. 10866-73.

Meng-Chung Hu e Bon-chu Chung. Expression of human 21-hydroxylase (P450c21) in bacterial and mammalian cells: A system to characterize normal and mutant enzyme. *DNA and Cell Biology*. 1991. 10 (3): p. 201-209.

Nacken, V. T. Archstetter, e E. Degryse, Probing the limits of expression levels by varying promoter strength and plasmid copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1996. 175 (1-2): p. 253-60.

Parent SA. *et al.*, Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequences in *S. Cerevisiae*. *Yeast*, 1985 1 (2): p. 83-138.

Risenberg D. e R. Guthke, High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999. 51: p. 422-430.

Thierry *et al.*. The complete sequence of the 8.2 kb segment left of MAT on chromosome III reveals five ORFs, including a gene for yeast ribokinase. *Yeast*, 1990. Nov-Dec; 6 (6): p. 521-34.

Urban, P. *et al.*, Characterization of recombinant plant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast. Kinetic and spectral

properties of the major plant P450 of the phenylpropanoid pathway. Eur J biochem, 1994. 222 (3): p. 843-50.

Valvo, L, *et al.*, General high-performance liquid chromatographic procedures for the rapid screening of natural corticosteroids. J Pharm Biomed Anal, 1994. 12 (6): p 805-10.

Wu, DA. *et al.*, Expression and functional study of wild-type and mutant human cytochrome P450c21 in *Saccharomyces cerevisiae*. DNA Cell Biol, 1991. 10 (3): p. 201-9.

Yanisch-Perron *et al.*, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, 1985. 33 (1): p. 103-19.

Zhao HF. *et al.*, Molecular cloning, cDNA structure and predicted amino acid sequence of bovine 3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase. FEBS Lett, 1989. 259 (1): p. 153-7.

REIVINDICAÇÕES

1. Cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizada pelo fato de que é geneticamente modificada para produzir, de maneira autônoma, a partir de uma fonte de carbono simples, um esteroide derivado do metabolismo do colesterol, em que o dito esteroide é selecionado do grupo consistindo em pregnenolona, 17 α -hidróxi pregnenolona, cortisol, cortexolona, progesterona, 17 α -hidróxi progesterona; em que a modificação genética compreende:

(a) a inativação dos genes ATF2, GCY1 e YPR1, e

(b) a integração de pelo menos um gene ou um cDNA heterólogo em um cassete de expressão, em que o gene ou cDNA é escolhido do grupo consistindo do gene ou cDNA que codifica a esterol Δ 7-redutase de *A. thaliana*, o citocromo P450_{SCC} bovino, a adrenodoxina (ADX) bovina, a adrenodoxina redutase (ADR) bovina, a 3 β -hidroesteróide desidrogenase / isomerase bovina, a 3 β -hidroesteróide desidrogenase / isomerase humana, o citocromo P450 C17 bovino, o citocromo P450 C21 humano, o citocromo P450 C11 humano, o citocromo P450 C11 bovino, e o citocromo híbrido P450 C11 humano-bovino.

2. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito cassete de expressão está situado em um plasmídeo de cópias múltiplas ou um plasmídeo de pequeno número de cópias.

3. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o cassete de expressão está situado em um plasmídeo de cópias múltiplas, em que o plasmídeo de cópias múltiplas é um plasmídeo à base de um replicon 2 micron de levedura que se replica em *Saccharomyces cerevisiae*, ou um plasmídeo de pequeno número de cópias compreendendo uma origem de replicação ARS cromossômica com um centrômero de levedura.

4. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos um gene ou cDNA heterólogo em um cassete de expressão está sob o controle de um promotor escolhido no grupo consistindo nos promotores endógenos de *S. cerevisiae* *TDH3*, *TEF1*, *PGK1*, *CYC1*, *GAL10*, *ATF2*, *TIR1*, *ARH1*, *ADE2*, e pelo promotor híbrido *GAL10-CYC1*.

5. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o pelo menos um gene ou cDNA heterólogo em um cassete de expressão compreende uma sequência terminadora operável selecionada do grupo consistindo nas sequências terminadoras dos genes endógenos de *S. cerevisiae* *PGK1*, *CYC1*, *ATF2*, *ADE2*, *NCP1*.

6. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o pelo menos um gene ou cDNA heterólogo em um cassete de expressão compreende uma sequência terminadora operável selecionada do grupo consistindo nas sequências terminadoras dos genes endógenos de *S. cerevisiae* *PGK1*, *CYC1*, *ATF2*, *ADE2*, *NCP1*.

7. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o citocromo P450_{SCC} bovino é a forma madura do citocromo P450_{SCC} bovino tendo uma metionina na extremidade NH₂ terminal, e em que a adrenodoxina bovina é a forma madura da adrenodoxina bovina tendo uma metionina na extremidade NH₂ terminal.

8. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o cassete de expressão compreende um gene ou cDNA que codifica adrenodoxina redutase bovina, em que o cassete está localizado em um plasmídeo de uma cópia, um plasmídeo de pequeno número de cópias, ou integrado no cromossomo de cepa de levedura.

9. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o cassete de expressão possui os elementos que asseguram a presença da adrenoxina redutase no citosol da cepa de levedura.

10. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o gene ou cDNA heterólogo é selecionado do grupo consistindo em gene ou cDNA que codifica 3 β -hidroesteroide desidrogenase / isomerase bovino, 3 β -hidroesteroide desidrogenase / isomerase humano, citocromo P450 C17 bovino, citocromo P450 C11 humano, citocromo P450 C11 bovino e citocromo híbrido P450 C11 humano-bovino, em que o cassete de expressão está localizado em um plasmídeo de grande número de cópias.

11. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o gene ou cDNA heterólogo é selecionado do grupo consistindo em gene ou cDNA que codifica citocromo P450 C11 humano, citocromo P450 C11 bovino e citocromo híbrido P450 C11 humano-bovino, em que o cassete de expressão está localizado em um plasmídeo de cópias múltiplas e o citocromo P450 C11 produzido a partir do cassete de expressão compreende um sinal de endereçamento do citocromo P450 C11 para a mitocôndria.

12. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a cepa de levedura compreende pelo menos um cassete de expressão que codifica adrenodoxina bovina, em que o cassete de expressão está situado em um plasmídeo de cópias múltiplas, com um promotor fraco, e a adrenodoxina produzida a partir do cassete de expressão compreende um sinal de endereçamento da adrenodoxina para as mitocôndrias.

13. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que ela apresenta pelo menos dois cassetes de expressão, cada compreendendo um gene ou cDNA que codifica

proteína adrenodoxina bovina, em que o dito primeiro cassete de expressão codifica proteína adrenodoxina bovina que é ativa no citosol da dita cepa de levedura e o dito segundo cassete de expressão codifica proteína adrenodoxina bovina que é ativa nas mitocôndrias de cepa de levedura.

14. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a cepa de levedura compreende pelo menos um cassete de expressão compreendendo um ou mais genes que codificam proteínas tendo atividade NADPH P450 redutase, em que o cassete de expressão está situado em um plasmídeo de cópias múltiplas ou integrado no cromossomo.

15. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a cepa de levedura expressa a proteína adrenodoxina redutase (ARH1) endógena de *S. cerevisiae* a um nível superior em relação a *S. cerevisiae* correspondente antes de ser geneticamente modificada.

16. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que a dita cepa de levedura compreende um gene ARH1 endógeno funcional e geneticamente modificado pela introdução de uma cópia adicional do gene ou cDNA de ARH1 endógeno que codifica uma proteína ARH1 funcional em um cassete de expressão.

17. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a expressão do gene ou cDNA de ARH1 endógeno adicional é colocada sob o controle do promotor CYC1.

18. Cepa de levedura, caracterizada pelo fato de que trata-se da cepa TGY260 depositada na CNCM em 24 de janeiro de 2001 sob o número de ordem I-2615 que compreende adicionalmente uma ruptura ou inativação adicional do gene ATF2.

19. Cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é geneticamente modificada para produzir, de maneira autônoma, a partir de uma fonte de carbono simples, um esteroide derivado do metabolismo do colesterol, em que o dito esteroide é selecionado do grupo consistindo em pregnenolona, 17α -hidróxi pregnenolona, cortisol, cortexolona, progesterona, 17α -hidróxi progesterona, em que a modificação genética compreende:

(a) a inativação dos genes ADE2, ATF2, GCY1 e YPR1, e

(b) a integração de pelo menos um gene ou um cDNA heterólogo em um cassete de expressão, em que o gene ou cDNA é escolhido do grupo consistindo do gene ou cDNA que codifica a esterol $\Delta 7$ -redutase de *A. thaliana*, o citocromo P450_{SCC} bovino, a adrenodoxina bovina, a adrenodoxina redutase bovina, a 3β -hidroesteróide desidrogenase / isomerase bovina, a 3β -hidroesteróide desidrogenase / isomerase humana, o citocromo P450 C17 bovino, o citocromo P450 C21 humano, o citocromo P450 C11 humano, o citocromo P450 C11 bovino, e o citocromo híbrido P450 C11 humano-bovino.

20. Cepa de levedura de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que compreende um gene ou cDNA que codifica esterol $\Delta 7$ -redutase de *A. thaliana* em um cassete de expressão integrado no cromossomo da cepa de levedura no locus ADE2.

21. Cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é geneticamente modificada para produzir, de maneira autônoma, a partir de uma fonte de carbono simples, um esteroide derivado do metabolismo do colesterol, em que o dito esteroide é selecionado do grupo consistindo em pregnenolona, 17α -hidróxi pregnenolona, cortisol, cortexolona,

progesterona, 17 α -hidróxi progesterona, em que a modificação genética compreende:

- (a) a inativação dos genes ERG5, ATF2, GCY1 e YPR1, e
- (b) a integração de pelo menos um gene ou um cDNA heterólogo em um cassete de expressão, em que o gene ou cDNA é escolhido do grupo consistindo do gene ou cDNA que codifica a esterol Δ 7-redutase de *A. thaliana*, o citocromo P450_{SCC} bovino, a adrenodoxina bovina, a adrenodoxina redutase bovina, a 3 β -hidroesteróide desidrogenase / isomerase bovina, a 3 β -hidroesteróide desidrogenase / isomerase humana, o citocromo P450 C17 bovino, o citocromo P450 C21 humano, o citocromo P450 C11 humano, o citocromo P450 C11 bovino, e o citocromo híbrido P450 C11 humano-bovino.

22. Cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é geneticamente modificada para produzir, de maneira autônoma, a partir de uma fonte de carbono simples, um esteroide derivado do metabolismo do colesterol, em que o dito esteroide é selecionado do grupo consistindo em pregnenolona, 17 α -hidróxi pregnenolona, cortisol, cortexolona, progesterona, 17 α -hidróxi progesterona, em que a modificação genética compreende:

- (a) a inativação dos genes ADE2, ERG5, ATF2, GCY1 e YPR1, e
- (b) a integração de pelo menos um gene ou um cDNA heterólogo em um cassete de expressão, em que o gene ou cDNA é escolhido do grupo consistindo do gene ou cDNA que codifica a esterol Δ 7-redutase de *A. thaliana*, o citocromo P450_{SCC} bovino, a adrenodoxina bovina, a adrenodoxina redutase bovina, a 3 β -hidroesteróide desidrogenase / isomerase bovina, a 3 β -hidroesteróide desidrogenase / isomerase humana, o citocromo P450 C17 bovino, o

citocromo P450 C21 humano, o citocromo P450 C11 humano, o citocromo P450 C11 bovino, e o citocromo híbrido P450 C11 humano-bovino.

23. Processo de produção de um esteroide, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de fermentação de uma cepa de levedura como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22 na presença de uma fonte de carbono simples, e de recuperação do esteroide produzido.



1/5

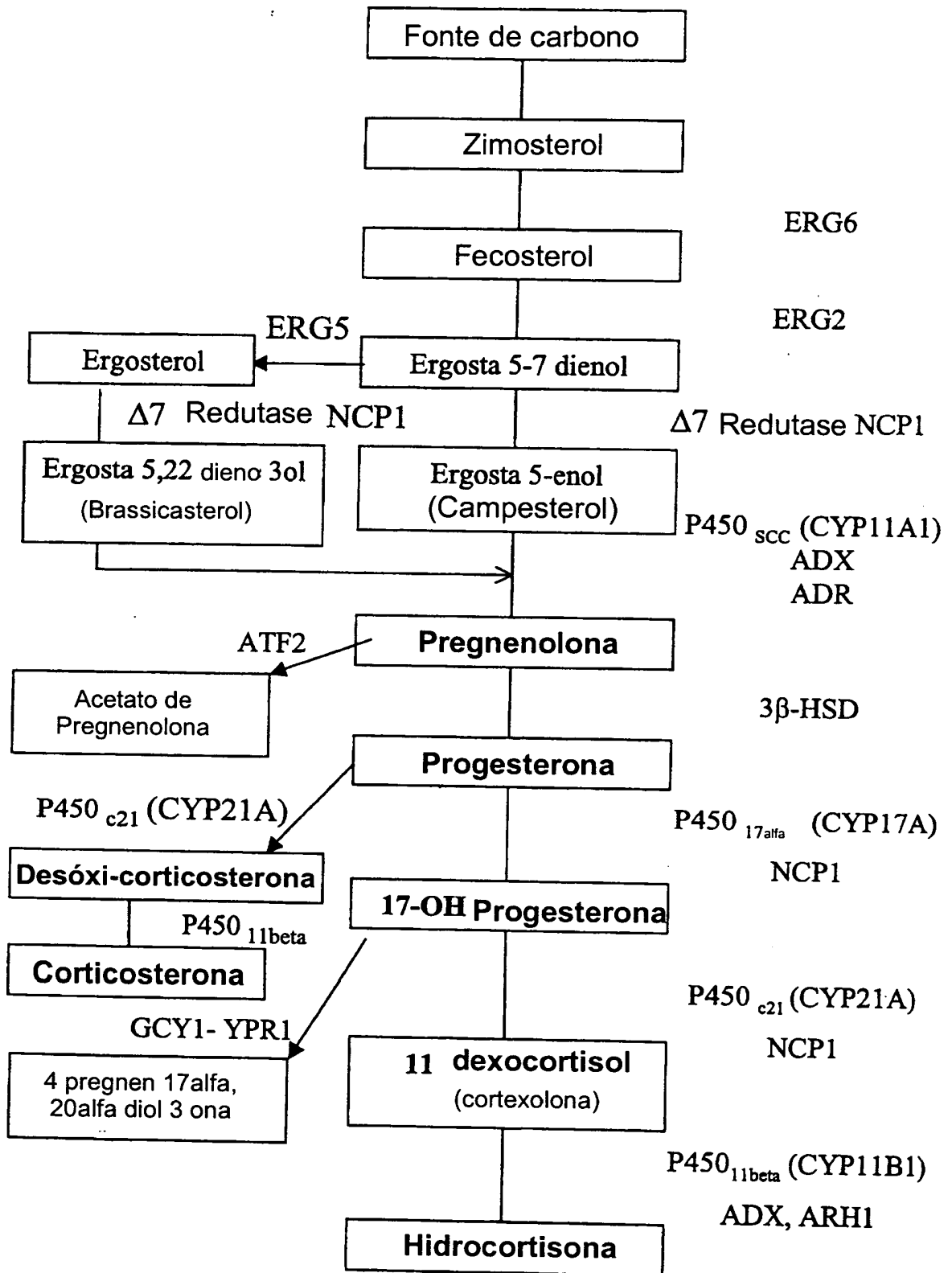


Fig. 1

86

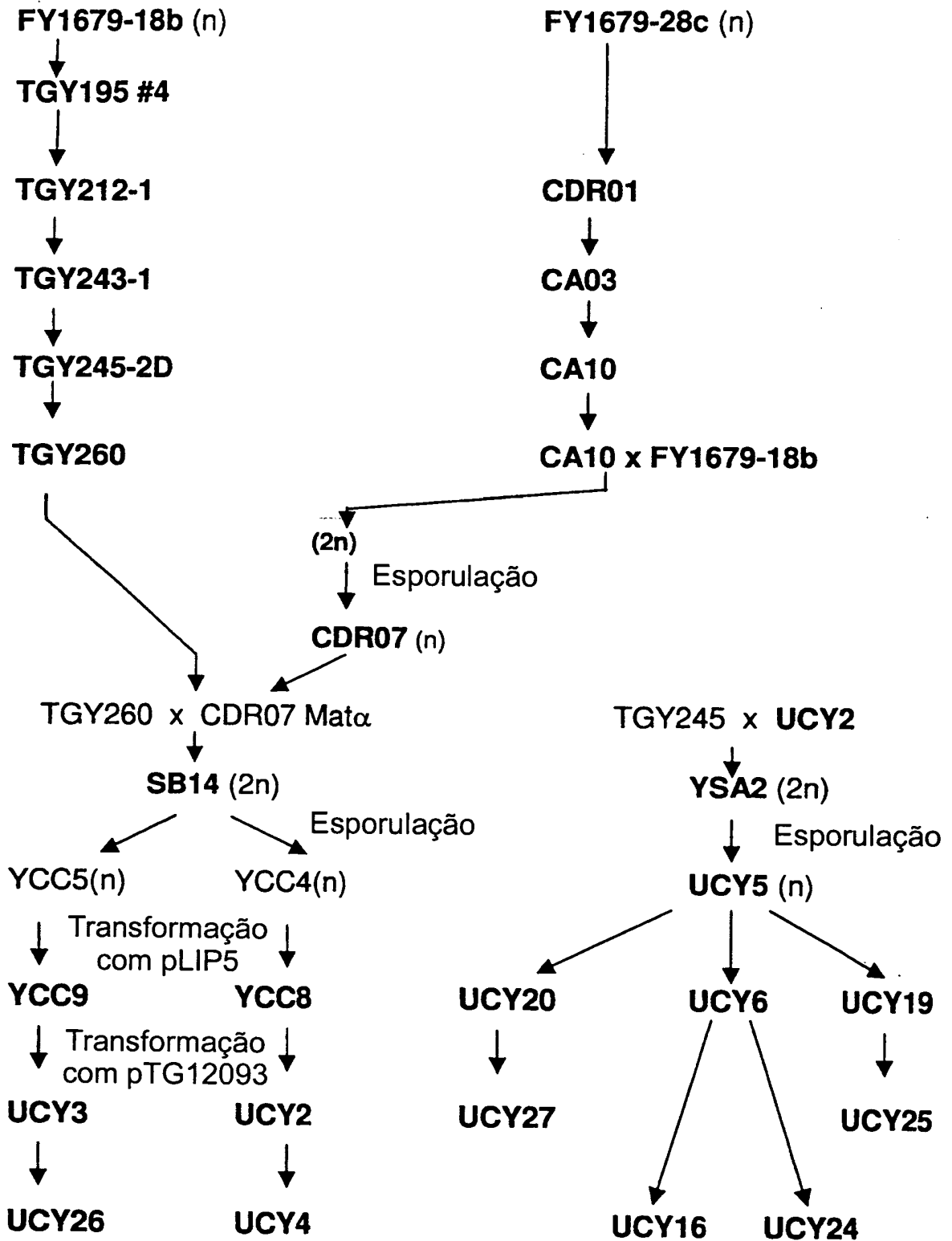


Fig. 2

2000

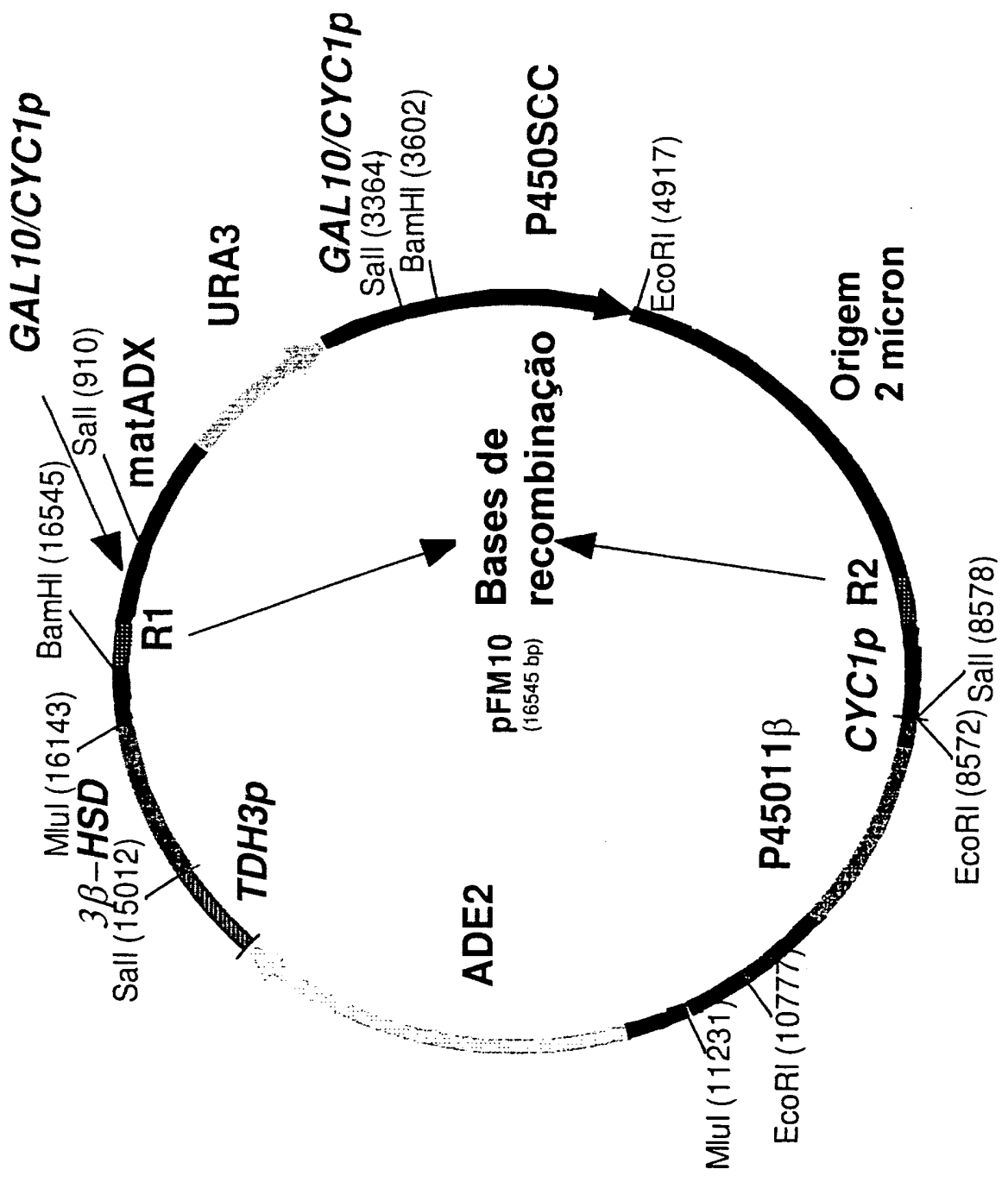


Fig. 5