



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 301**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12R 1/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95932048 .2**

86 Fecha de presentación : **22.09.1995**

87 Número de publicación de la solicitud: **0783578**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.1997**

54 Título: **Levadura con permeabilidad modificada.**

30 Prioridad: **27.09.1994 FR 94 11509**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2008

73 Titular/es: **Aventis Pharma S.A.**
20, avenue Raymond Aron
92160 Antony, FR

72 Inventor/es: **Fleer, Reinhard;**
Marcireau, Christophe y
Scherman, Daniel

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Levadura con permeabilidad modificada.

5 La presente invención se refiere a levaduras modificadas que poseen una permeabilidad celular no conforme con la de su origen, inducida por mutación genética.

La levadura es un modelo de células eucariotas y una herramienta destacada para estudiar las vías metabólicas, el ciclo celular, sus sistemas de regulación respectivos, el aislamiento de genes, la producción de proteínas heterólogas, etc... La levadura también puede utilizarse para la biotransformación de moléculas de interés o para el descubrimiento de compuestos biológicamente activos mediante cribado *in vivo*. Estas últimas aplicaciones necesitan la penetración de los xenobióticos en el interior de las células de levadura.

15 La penetración de estas moléculas, al igual que su concentración, en el interior de las células de levadura, depende de diferentes parámetros que rigen la "permeabilidad" celular. Estos diferentes parámetros intervienen principalmente a tres niveles distintos en la levadura, su pared celular, su membrana plásmica y sus mecanismos de detoxificación.

Así, para que una molécula pueda penetrar en el interior de las células de levadura y ser biotransformada o ejercer su efecto biológico en el caso de un cribado, debe atravesar la pared (compuesta esencialmente por glucanos, manoproteínas y quitinas) y la membrana plásmica (compuesta por esteroides, fosfolípidos y proteínas), dos barreras biológicas que pueden oponerse débilmente o fuertemente a su penetración. Para mantener una concentración elevada en el interior de la célula, no debe detoxificarse, por ejemplo por reexpulsión hacia el medio externo o por metabolización en la célula.

25 La bibliografía ha mostrado toda una serie de genes implicados en la biosíntesis, constitución y/o integridad de la pared, de la membrana y a nivel de los sistemas de detoxificación.

Diferentes genes intervienen en la síntesis de la pared como la serie de genes *KRE* (Hutchins, 1983; Boone, 1990; Meader, 1990, Hill, 1992; Roemer, 1991; Brown, 1993; Klis, 1994), *KTR* (Lussier, 1993; Klis, 1994) y *MNV* (Kanik, 1990; Klis, 1994; Ballou, 1982). Se han podido aislar diferentes mutantes de la pared como los mutantes *csd*, *chs*, *och*, *skn1*, *pmr1*, *pmt1*, *erd1*, *vgr1*, *vgr4*, *cal3*, *shc1*, *pkc1*, *bck1*, *mkk1*, *mkk2*, *mpk1*, *ppz1*, *ppz2*, *pmi1* (Klis, 1994). Los genes *DHS1* (Lee, 1994), *SRBI* (Stateva, 1991), así como los genes implicados en la vía de señalización de la proteína quinasa C que controla negativamente la degradación de la pared por diferentes glucanasas como *BGL2* (Shimizu, 1994; Klis, 1994), les concierne más particularmente la integridad de esta pared.

35 También se ha identificado todo un conjunto de genes implicados en la biosíntesis del ergosterol que es una forma mayoritaria de los esteroides de champiñones. Los esteroides son constituyentes de membrana. A título representativo de estos genes, se pueden citar más particularmente los genes *ERG10* (Dequin, 1988), *ERG11* y *ERG13* (Servouse, 1984), *HMG1* y *HMG2* (Basson, 1986), *ERG12* (Oulmouden, 1988), *ERG8* (Tsay, 1991), *ERG19* (Mons, 1984), *ID11* y *ERG20* (Anderson, 1989), *ERG9* (Fegueur, 1991), *ERG1* (Hoegenauer, 1991), *ERG18* (Karst, 1977), *ERG7* y *ERG17* (Karst, 1977), *ERG16* (Kalb, 1987), *ERG24* (Marcireau, 1992), *ERG6* (Hardwick, 1994), *ERG2* (Ashman, 1991), *ERG3* (Arthington, 1991), *ERG5* (Molzhan, 1972), *ERG4* (Lai, 1994). Los Fosfolípidos también son constituyentes de las membranas. Se han podido identificar diferentes genes implicados en la síntesis de los fosfolípidos como *CHO1* (Kiyono, 1987), *CHO2* (Kodaki, 1991), *PEM2* (Kodaki, 1987), *CKII* (Hosaka, 1989), *CCT1* (Tsukagoshi, 1987), *EPT1* y *CPT1* (Hjelmstad, 1991), *INO1* (Dean-Johnson, 1989), *PISI* (Nikawa, 1987) etc. Asimismo, se ha podido evidenciar diferentes genes implicados en la síntesis de ácidos grasos. La acetil-CoA carboxilasa (gen *ACCI* (Al-Fell, 1992)) permite producir malonil CoA que será utilizada por la sintasa de los ácidos grasos (genes *FAS1* (Schwezer, 1986) y *FAS2* (Mohamed, 1990)) para proporcionar los ácidos grasos. La o las insaturaciones se introducirán gracias a la acción de la desaturasa de ácidos grasos codificada por el gen *OLE1* (Stukey, 1990).

50 En lo que se refiere más particularmente al fenómeno de detoxificación, se han podido evidenciar varios mecanismos en la levadura. En particular, la neutralización de los grupos con radicales libres depende de la expresión del gen *SNQ3* (Moye-Rowley, 1989). Por otra parte, la levadura posee proteínas capaces de expulsar al medio externo xenobióticos que hayan penetrado en la célula o compuestos endógenos. Algunas como *SNQ1* (Kanawaza, 1988) tienen una especificidad de transporte bastante estricta, por el contrario otras como *PDR5* (Leppert, 1990), *SNQ2* (Servos, 1993) y *STE6* (Kuchler, 1989) tienen una especificidad débil y pueden transportar, por lo tanto, un gran número de moléculas. Se han evidenciado diferentes genes que controlan la expresión de estas proteínas como los genes *PDR1* (Meyers, 1992), *PDR3*, *PDR4*, *PDR7*, *PDR9*, *PDR11* (Dexter, 1994). Se ha mostrado principalmente que el gen *PDR5* está regulado por *PDR1*, *PDR3*, *PDR4*, *PDR7* y *PDR9* (Dexter, 1994). Otro estudio sobre la permeabilidad celular ha evidenciado el hecho de que un doble mutante *erg6/erg2* presenta una rigidez membranaria mayor y que este mutante es permeable al Ni^{2+} (Lees, 1973, Kleinhans, 1979). Ha podido identificarse otros genes implicados en estos mecanismos como *PDR2* y *PDR6* (Balzi, 1991) aunque sus funciones permanecen por el momento desconocidas.

65 Debe indicarse que las proteínas codificadas por los genes *SNQ2*, *STE6*, *PDR5* se parecen, por su composición y por su estructura a las p-glicoproteínas que se encuentran fuertemente expresadas en numerosas células tumorales que son resistentes a los agentes citotóxicos. Estas proteínas se denominan comúnmente bombas MDR (resistencia a múltiples fármacos).

El dominio de los diferentes parámetros que actúan a nivel de este mecanismo de detoxificación y, de manera más general, que controlan indirectamente o directamente la permeabilidad celular, será particularmente precioso en un plan terapéutico.

Principalmente, será particularmente ventajoso poder disponer de una levadura que presenta una permeabilidad incrementada para los fines de cribado de productos biológicamente activos o de estudios de metabolismos y/o de comportamientos celulares. En efecto, en este tipo de levaduras, la concentración intracelular de un compuesto estará incrementada respecto a las levaduras normales, para una misma concentración del producto en el medio externo. Esta concentración intracelular aumentada permitirá una detección más fácil de la actividad del producto en el marco del cribado y del descubrimiento de compuestos activos (Kirsch, 1993, Hara 1993). También será ventajosa para obtener una mayor transformación de un sustrato durante una biocatálisis (Yasubaki 1992) o para examinar el metabolismo de un compuesto, utilizando por ejemplo levaduras que expresan los citocromos p450 humanos (Renaud 1990).

De manera inesperada, la Solicitante ha evidenciado que la combinación, en una levadura, de al menos dos mutaciones a nivel de al menos dos de los genes anteriormente citados y que controla cada uno la permeabilidad, a niveles diferentes o no, afecta positivamente la permeabilidad de dicha levadura. Esto resulta en una ganancia incrementada de permeabilidad. Esta ganancia corresponde al menos a la resultante de la superposición de los efectos respectivos inducidos por cada una de las mutaciones, y más preferentemente ésta es claramente superior. Se presencia ventajosamente una adición y más preferentemente una amplificación de los efectos respectivos, es decir, una sinergia.

Más concretamente, la presente invención se refiere a una levadura modificada en la que al menos dos de los genes que controlan la permeabilidad celular de dicha levadura están modificados, teniendo dichas modificaciones un efecto aditivo o sinérgico.

Los genes afectados en su función, en el marco de la presente invención, pueden controlar la permeabilidad celular a niveles idénticos o diferentes. Sin embargo, puede ser ventajoso alterar la actividad de genes que afectan la permeabilidad celular a niveles distintos.

Estos genes modificados se eligen entre los genes que intervienen a nivel de la constitución, biosíntesis y/o integridad de la pared o de la membrana plásmica y los genes implicados en los mecanismos de detoxificación o de exportación de compuestos endógenos.

En el sentido de la presente invención, se entiende por gen modificado, un gen que se ha vuelto incapaz parcialmente o totalmente de codificar su proteína natural. La incapacidad de dichos genes para codificar sus proteínas naturales puede manifestarse bien por la producción de una proteína inactiva debido a modificaciones estructurales o conformacionales, bien por la ausencia de producción, bien por la producción de la proteína natural a un nivel atenuado o según un modo de regulación deseado o también por la producción de un mutante que tiene un espectro de actividad modificado. En este último caso, puede tratarse de una modificación de tipo aumento o disminución de la actividad específica aunque también de un cambio a nivel de su especificidad de sustrato o de producto.

Esta modificación de los genes se induce por una o varias modificaciones genéticas.

Por modificación genética, se debe entender más particularmente cualquier supresión, sustitución, delección, inserción o adición de una o varias bases en el o los genes considerados. Dichas modificaciones pueden obtenerse *in vitro* (en el ADN aislado) o *in situ*, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética, o también exponiendo dichos microorganismos a un tratamiento con agentes mutagénicos. Por agentes mutagénicos, se pueden citar por ejemplo los agentes físicos tales como los rayos energéticos (rayos X, rayos gamma, ultravioleta, etc...), o los agentes químicos capaces de reaccionar con diferentes grupos funcionales de las bases del ADN, y por ejemplo los agentes alquilantes [etilmetanosulfonato (EMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, N-nitroquinoleína-1-óxido (NQO), etc...], los agentes bialquilantes, los agentes intercalantes, etc... Por delección, se entiende cualquier supresión parcial o total del gen considerado. Puede tratarse principalmente de una parte de la región codificadora de dichas proteínas, y/o de toda o parte de la región promotora de la transcripción, de la traducción o también del transcrito.

La o las modificaciones genéticas mencionadas también pueden obtenerse por disrupción génica, por ejemplo según el protocolo inicialmente descrito por Rothstein (Rothstein, 1983) o ventajosamente por doble recombinación homóloga. En este caso, la secuencia codificadora estará, en parte o totalmente, preferentemente perturbada para permitir llegado el caso, el reemplazo, por recombinación homóloga, de la secuencia genómica salvaje por una secuencia no funcional, mutante y/o por un marcador de selección.

La o las modificaciones genéticas mencionadas pueden localizarse en el gen codificador o fuera de la región codificadora, por ejemplo en las regiones responsables de la expresión y/o de la regulación transcripcional o post-transcripcional de dichos genes.

Por otro lado, determinadas alteraciones tales como las mutaciones puntuales son capaces por naturaleza de corregirse o atenuarse por mecanismos celulares, por ejemplo durante la replicación del ADN que precede a la división celular. Dichas alteraciones genéticas tienen un interés limitado a nivel industrial porque las propiedades fenotípicas que resultan no son perfectamente estables. La solicitante ha utilizado un procedimiento que permite preparar levaduras que presentan al menos dos modificaciones genéticas a nivel de dos genes respectivos, siendo la o las modi-

ficaciones mencionadas estables desde un punto de vista segregacional y/o no reversibles. Este procedimiento permite en efecto la modificación de múltiples genes utilizando el mismo marcador de selección.

Preferentemente, las levaduras según la invención presentan varias modificaciones genéticas estables desde un punto de vista segregacional. Siempre según un modo preferido, las modificaciones genéticas no son reversibles.

Por supuesto, el objeto de la presente invención no está limitado a las levaduras que contienen únicamente dos genes inactivados. Las levaduras modificadas según la invención pueden contener un número claramente superior de genes mutados.

Las levaduras según la invención pueden obtenerse modificando al menos dos genes elegidos entre los genes que intervienen a nivel de la constitución, biosíntesis y/o integridad de la pared y/o de la membrana plásmica, y/o los genes implicados en los mecanismos de detoxificación o de exportación de compuestos endógenos, sus homólogos o derivados.

En el sentido de la presente invención, se entiende por derivado, cualquier secuencia obtenida por modificación y que codifica un producto que conserva al menos una de las propiedades biológicas de la proteína natural (efecto trófico y/o diferenciador). Por modificación, se debe entender cualquier mutación, sustitución, delección, adición o modificación de naturaleza genética y/o química. Los derivados en el sentido de la invención también pueden obtenerse por hibridación a partir de bibliotecas de ácidos nucleicos, utilizando como sonda la secuencia nativa o un fragmento de ésta.

Entre los derivados preferidos, se pueden citar más particularmente las variantes naturales, las moléculas en las que uno o varios restos han sido sustituidos, los derivados obtenidos por delección de regiones que no intervienen o que intervienen poco en la interacción con los sitios de unión considerados o que expresan una actividad no deseable, y los derivados que contienen restos adicionales respecto a la secuencia nativa.

Por gen homólogo, se entiende que designa en el marco de la presente invención un gen que reemplaza una función idéntica o equivalente a la de un gen expresamente designado y aislado a partir del mismo o de otro microorganismo.

Más preferentemente, los genes susceptibles de ser modificados en el marco de la presente invención se seleccionan entre:

- los genes que intervienen a nivel de la síntesis de la pared celular o en el mantenimiento de su integridad. A título representativo de estos genes se pueden mencionar principalmente los genes *KRE*, *KTR*, *MNN*, *CSD*, *CHS*, *OCH*, *SKN1*, *PMR1*, *PMT1*, *ERD1*, *VGR1*, *VGR4*, *CAL3*, *SHC1*, *DHS1*, *SRB1*, *PKC1*, *BCK1*, *MKK1*, *MKK2*, *MPK1*, *PPZ1*, *PPZ2*, *PMI1* y *BGL2*,

- los genes que intervienen a nivel de la síntesis de la pared celular participando principalmente en la síntesis de los esteroides, constituyentes de las membranas celulares, y más particularmente los genes *ERG10*, *ERG11*, *ERG13*, *HMG1*, *HMG2*, *ERG12*, *ERG8*, *ERG19*, *ID11*, *ERG20*, *ERG9*, *ERG1*, *ERG18*, *ERG7*, *ERG17*, *ERG16*, *ERG24*, *ERG6*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG5* y *ERG4*,

- los genes implicados en los mecanismos de detoxificación o de exportación de compuestos endógenos desarrollados por la célula tales como los genes *SNQ1*, *SNQ2*, *SNQ3*, *STE6*, *PDR1*, *PDR2*, *PDR3*, *PDR4*, *PDR6*, *PDR7*, *PDR9* y *PDR11* y sus homólogos.

Las células de levaduras susceptibles de ser modificadas según la invención pueden elegirse entre los géneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Schizosaccharomyces* y sus análogos y más preferentemente entre los géneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*. La especie preferida de *Saccharomyces* es *S. cerevisiae*.

Según un modo particular de la invención, las mutaciones pueden efectuarse a nivel de al menos dos genes que controlan la permeabilidad celular de las levaduras a niveles diferentes. Por ejemplo, puede tratarse de una levadura que asocia a una inactivación de un gen implicado en los mecanismos de detoxificación, una inactivación de un gen implicado en la síntesis de esteroides.

A título ilustrativo de las levaduras reivindicadas se pueden citar principalmente y más particularmente las levaduras en las que se han modificado los genes *PDR1*, *PDR5*, *SNQ2*, *ERG6* como en la cepa yCM61, descrita en los ejemplos a continuación.

En este caso particular, se observa una sinergia particularmente ventajosa. Dicha levadura posee una permeabilidad claramente incrementada que se traduce en una hipersensibilidad a productos citotóxicos que tienen dianas intracelulares y mecanismos de acción diferentes (véanse los ejemplos).

La invención también tiene por objeto un procedimiento de preparación de una levadura genéticamente modificada y su utilización. Preferentemente, el procedimiento de la invención consiste en reemplazar los genes cromosómicos considerados por una versión modificada *in vitro*.

La presente invención se dirige de manera general a cualquier utilización de una levadura según la invención con fines de penetración de un compuesto en dicha levadura. Las levaduras que presentan una permeabilidad incrementada según la invención se revelaran muy particularmente ventajosas para el descubrimiento de productos biológicamente activos en los cribados microbiológicos (Kirsch 1993, Hara 1993). Por otro lado, son interesantes en biocatálisis (Yabusaki 1992) o como modelo para el estudio de metabolismo, para la comprensión del comportamiento celular y para los estudios de toxicología.

La presente invención se describirá de manera más completa mediante las figuras y ejemplos siguientes, que deben considerarse como ilustrativos y no limitativos.

Leyenda de la figuras

Figura 1: Plásmido pDIS1

Figura 2: Plásmido pDIS3

Figura 3: Plásmido pDIS4

Figura 5: Plásmido pCM2

Figura 6: Plásmido pCM4

Figura 7: Plásmido pCM5

Figura 8: Plásmido pCM6

Figura 9: Plásmido pCM7

Figura 10: Plásmido pCM8

Figura 11: Plásmido pCM12

Figura 12: Plásmido pCM13

Figura 13: Plásmido pCM10

Figura 14: Plásmido pCM11

Técnicas generales de clonación

Los métodos clásicamente utilizados en biología molecular tales como las extracciones preparativas de ADN plasmídico, la centrifugación de ADN plasmídico en gradiente de cloruro de cesio, la electroforesis en geles de agarosa o de acrilamida, la purificación de fragmentos de ADN por electroelución, las extracciones de proteínas con fenol o con fenol-cloroformo, la precipitación de ADN en medio salino con etanol o isopropanol, la transformación en *Escherichia coli*, etc..., son muy conocidos por el experto en la técnica y están descritos de manera extensa en la bibliografía [Maniatis T. *et al.*, "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. *et al.* (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Nueva York, 1987].

Las enzimas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) o Amersham y se utilizan según las recomendaciones de los proveedores.

Los plásmidos del tipo pBR322, pUC y los fagos de la serie M13 son de origen comercial (Bethesda Research Laboratories). Los plásmidos del tipo pIC han sido descritos por Marsh (Marsh, 1984).

Para las ligaciones, los fragmentos de ADN se separan según su tamaño por electroforesis en gel de agarosa o de acrilamida, se extraen con fenol o con una mezcla fenol/cloroformo, se precipitan con etanol y se incuban en presencia de la ADN ligasa del fago T4 (Biolabs) según las recomendaciones del proveedor.

El reemplazo de los extremos 5' protuberantes se efectúa mediante el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Biolabs) según las especificaciones del proveedor. La destrucción de los extremos 3' protuberantes se efectúa en presencia de la ADN Polimerasa del fago T4 (Biolabs) utilizada según las recomendaciones del fabricante.

Los oligodesoxinucleótidos se sintetizan químicamente según el método de las fosforamiditas utilizando grupos protectores β -cianoetilos (Sinha 1984). Después de la síntesis, los grupos protectores se eliminan por tratamiento con amoníaco y dos precipitaciones con butanol permiten purificar y concentrar los oligodesoxinucleótidos (Sawadogo, 1991). La concentración de ADN se determina midiéndolo la densidad óptica a 260 nm.

ES 2 288 301 T3

Las transformaciones de *S. cerevisiae* con el ADN de los plásmidos de expresión de las proteínas de la presente invención se efectúan mediante cualquier técnica conocida por el experto en la técnica, y de la que se proporciona un ejemplo en el texto.

5 Las cepas de levaduras utilizadas en los ejemplos pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas de levaduras de la presente invención se cultivan en erlenmeyers a 28°C en medio rico (YPG: 1% extracto de levadura, 1% Bactopeptona, 2% glucosa) o en medio mínimo (YNB: 0,67% Base Nitrogenada para Levaduras (Yeast Nitrogen Base) (difco) sin aminoácidos, 2% glucosa) con agitación constante. El medio mínimo se suplementa en base y en aminoácido llegado el caso a razón de 50 mg/L.

Ejemplo 1

15 *Preparación de las cepas que poseen ERG4, PDR1 o ERG4 y PDR1 inactivados*

1) *Preparación de los plásmidos que permiten efectuar múltiples disrupciones génicas con eliminación del marcador de selección*

20 El plásmido Bluescript II (ks⁻) se digiere con DraI. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 692 pb correspondiente a una parte del gen AMP^R se electroeluye a continuación y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo. Este fragmento se liga en el plásmido Bluescript II (ks⁻) previamente digerido con SmaI. Después de transformación de *E. coli* y análisis de los plásmidos, no se retienen más que los plásmidos que poseen el fragmento insertado (el plásmido obtenido se denomina pDisIdrs). El plásmido pDisIdrs se digiere con EcoRV y se liga con el fragmento DraI-DraI de 692 pb descrito anteriormente. Después de transformación de *E. coli* y análisis de los plásmidos, no se retienen más que los plásmidos que poseen el fragmento insertado en repetición directa con lo anterior (obtención del plásmido pDisI2drs). El plásmido pCXJ1 (Chen 1987) que posee el gen *URA3* se digiere con EcoRI. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 1.282 pb se electroeluye a continuación y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo. Este fragmento se liga en el plásmido pDisI2drs previamente digerido con EcoRI. Después de transformación de *E. coli* y análisis de los plásmidos, no se retienen más que los plásmidos que poseen el fragmento *URA3* EcoRI-EcoRI insertado. Este plásmido se denomina pDIS1 (véase la figura 1).

35 El plásmido pDIS1 se digiere con ClaI y BamHI. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 2.702 pb que contiene el gen *URA3* flanqueado por dos secuencias en repetición directa se electroeluye a continuación y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo. Este fragmento se liga en el plásmido pIC20H digerido por una parte con ClaI y BamHI y por otra parte con ClaI y BglII. Los nuevos plásmidos que tienen este fragmento de 2.702 pb ligado, denominados respectivamente pDIS3 (véase la figura 2) y pDIS4 (véase la figura 3), se obtienen después de transformación de *E. coli*.

2) *Obtención de construcciones que permiten la disrupción de los genes ERG4, PDR1 y ERG4-PDR1*

45 a) *Construcción que permite la disrupción del gen ERG4*

El fragmento BamHI-BamHI de 6.670 pb del plásmido pA-B6.5 (Balzi 1987) cuya secuencia está depositada en el banco de datos EMBL bajo la referencia S58126 se liga en el plásmido Bluescript II (ks⁻) previamente digerido con BamHI. Este fragmento de ADN contiene entre otros los ORF correspondientes a los genes *ERG4* y *PDR1*. Después de transformación de *E. coli*, se retiene el plásmido que posee el inserto y se denomina pCM1 (véase la figura 4). El plásmido pDIS4 se digiere con XbaI y Ecl136II. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 2.725 pb se electroeluye a continuación y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo. El plásmido pCM1 se digiere con AvrII y SnaBI con el fin de eliminar una parte del ORF *ERG4* que se reemplazará con el casete de disrupción. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 8.925 pb se electroeluye a continuación y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo. Los dos fragmentos así preparados se ligan juntos. Después de transformación de *E. coli* se prepara el plásmido que permite la disrupción del gen *ERG4*. Este nuevo plásmido se denomina pCM2 (véase la figura 5). Se digiere finalmente con SacI y SacII. El fragmento lineal así obtenido se electroeluye y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo, con vistas a la transformación que permite la disrupción del gen *ERG4*.

b) *Construcción que permite la disrupción de los genes PDR1 y ERG4*

65 El plásmido pCM1 se digiere con AvrII y HpaI con el fin de eliminar una parte del ORF *ERG4* y del ORF *PDR1* que se reemplazará por el casete de disrupción. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 6.302 pb se electroeluye a continuación y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo. El plásmido pDIS4 se digiere con XbaI y Ecl136II para obtener el casete de disrupción

compatible. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 2.725 pb se electroeluye a continuación y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo. Los dos fragmentos así preparados se ligan juntos. Después de transformación de *E. coli*, se prepara el plásmido denominado pCM4 (véase la figura 6) que permite la disrupción de los genes *ERG4* y *PDR1*. Se digiere finalmente con SacI y SalI. El fragmento lineal así obtenido se electroeluye y se purifica por una extracción con una mezcla fenol cloroformo, con vistas a la transformación que permite la disrupción de los genes *ERG4* y *PDR1*.

c) Construcción que permite la disrupción del gen *PDR1*

El plásmido pCM1 se digiere con SacII y se extrae con una mezcla fenol cloroformo y finalmente se vuelve a ligar con el fin de eliminar un fragmento de ADN perjudicial para la construcción que permite la disrupción del gen *PDR1*. Después de transformación de *E. coli* se obtiene el plásmido del que se ha eliminado el fragmento de 2.854 pb y se designa pCM5 (véase la figura 7). Este plásmido se digiere a continuación con BstBI y BsaBI. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 5.983 pb se electroeluye a continuación y extrae con una mezcla fenol-cloroformo. El plásmido pDIS3 se digiere con ClaI y Ecl136II. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 2.709 pb se electroeluye a continuación y se extrae con una mezcla fenol-cloroformo. Los dos fragmentos así preparados se ligan juntos. Después de transformación de *E. coli* se prepara el plásmido que permite la disrupción del gen *PDR1*, denominado pCM6 (véase la figura 8). Se digiere finalmente con SalI y SacI. El fragmento lineal así obtenido se electroeluye y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo, con vistas a la transformación que permite la disrupción del gen *PDR1*.

3) Transformación de la levadura

La cepa de levadura utilizada es la cepa *S. cerevisiae* 5247 (Marcireau, 1992) de genotipo *ura3, trp1, MAT α*. Esta cepa se transforma según el método descrito por Gietz (Gietz, 1992).

Los clones que tienen integrado el casete de disrupción se seleccionan para su prototrofia para el uracilo. Después de haber verificado que la integración se realiza en el locus (obtención del fenotipo esperado) el casete *URA3* se pierde después de pasar a medio completo. Los clones que hayan perdido el casete *URA3* por recombinación de las dos secuencias repetidas se seleccionan sobre un medio que contiene 10 mM de 5-fluoroorotato.

4) Obtención de cepas de levadura que poseen los genes *PDR1*, *ERG4* y *PDR1-ERG4* modificados

La cepa 5247 se transforma como se ha descrito en 3) con los fragmentos preparados como se ha descrito en 2a), 2b), 2c). Después de eliminar el marcador de selección, se obtienen las cepas yCM30 ($\Delta pdr1$, *ura3*, *trp1*, *MAT α*), yCM63 ($\Delta erg4$, *ura3*, *trp1*, *MAT α*) y yCM65 ($\Delta pdr1$, $\Delta erg4$, *ura3*, *trp1*, *MAT α*).

Ejemplo 2

Evaluación de la permeabilidad de la levadura obtenida según el ejemplo 1

La permeabilidad de las levaduras obtenidas en el ejemplo 1 se determina mediante la evaluación de la sensibilidad a diferentes productos citotóxicos. Las diferentes levaduras se siembran a una densidad óptica de 0,05 a 700 nm en medio mínimo YNB correctamente suplementado en bases y aminoácidos en presencia de una concentración creciente de xenobióticos. Los cultivos se ponen a 28°C y a 200 rpm durante 48 horas. Se determina la densidad óptica a 700 nm. Se determina la CE₅₀ como la concentración de xenobiótico que inhibe la mitad del crecimiento de la levadura comparativamente con un control sin xenobiótico.

La tabla I siguiente muestra los resultados obtenidos.

Ejemplo 3

Preparación de las cepas que poseen *ERG6* y *ERG6-PDR1* inactivados

1) Obtención de construcciones que permiten la disrupción de los genes *ERG6* y *ERG6, PDR1*

a) Construcción que permite la disrupción del gen *ERG6*

El gen *ERG6* se obtiene por PCR con el fin de introducir sitios de restricción adecuados. Los cebadores utilizados son TTA CTT TCG ATT TAA GTT TTA CAT AAT TTA AAA SEQ ID N°1 para el extremo 5' y GGC CTG CTC ATG AAC GTG CTA TCT T SEQ ID N°2 para el extremo 3'. El programa de temperatura para la PCR es el siguiente: 2 minutos a 91°C después 30 ciclos de un minuto a 91°C después 2 minutos a 45°C y 3 minutos a 72°C y para

ES 2 288 301 T3

terminar 5 minutos a 72°C. El producto de PCR después de electroforesis en gel de agarosa 0,8% se electroeluye y se extrae con una mezcla fenol-cloroformo. Después, se digiere con DraI y XhoI mientras que pIC20H se digiere con EcoRV y XhoI. Después de electroforesis en gel de agarosa 0,8% los dos fragmentos se electroeluyen y se extraen con una mezcla fenol-cloroformo y se ligan juntos. Después de transformación de *E. coli*, el plásmido denominado pCM7 (véase la figura 9) se prepara a partir de las colonias obtenidas. Este último se digiere con XbaI y KpnI. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 3.594 pb se electroeluye a continuación y se extrae con una mezcla fenol-cloroformo. El plásmido pDIS1 se digiere con XbaI y KpnI. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 2.744 pb de electroeluye a continuación y se extrae con una mezcla fenol-cloroformo. Los dos fragmentos así preparados se ligan juntos. Después de transformación de *E. coli*, se obtiene el plásmido pCM8 (véase la figura 10). Para la disrupción de *ERG6* se digiere finalmente con BamHI y BglIII. El fragmento lineal así obtenido se electroeluye y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo, con vistas a la transformación que permite la disrupción del gen *ERG6*.

2) Transformación de la levadura

Una levadura se transforma según el protocolo descrito en el ejemplo 1.3).

3) Obtención de las cepas delecionadas para *ERG6* y *ERG6*, *PDR1*

La cepa 5247 se transforma con el fragmento preparado como se ha descrito en 1a. Después de eliminar el marcador de selección se obtiene la cepa yCM55 ($\Delta erg6$, *ura3*, *trp1*, *MAT* α).

La cepa yCM30 se transforma con el fragmento preparado como se ha descrito en 1a. Después de eliminar el marcador de selección se obtiene la cepa yCM57 ($\Delta pdr1$, $\Delta erg6$, *ura3*, *trp1*, *MAT* α).

Ejemplo 4

Evaluación de la permeabilidad de las cepas de levadura yCM30, yCM55, yCM57

Esta evaluación se realizó según el protocolo descrito en el ejemplo 2. Los resultados correspondientes figuran en la tabla II.

Ejemplo 5

*Preparación de cepas de levaduras que poseen *PDR5* y *SNQ2* inactivados*

1) Obtención de construcciones que permiten la disrupción de los genes *PDR5* y *SNQ2*

a) Disrupción del gen *PDR5*

El fragmento de ADN AvrII-HindIII (que contiene una parte del ORF *PDR5*) de 4.736 pb del plásmido pDR3.3 (Leppert 90) cuya secuencia está depositada en el banco de datos EMBL bajo la referencia L19922 se liga en el plásmido Bluescript II (ks) previamente digerido con HindIII y XbaI. Después de transformación de *E. coli*, se retiene el plásmido denominado pCM12 que posee el inserto (véase la figura 11). Este plásmido se digiere a continuación con BstBI y BglIII. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 4.811 pb se electroeluye a continuación y se extrae con una mezcla fenol-cloroformo. El plásmido pDIS4 se digiere con ClaI y BamHI. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 2.702 pb se electroeluye a continuación y se extrae con una mezcla fenol-cloroformo. Los dos fragmentos así preparados se ligan juntos. Después de transformación de *E. coli*, se prepara el plásmido denominado pCM13 que permite la disrupción de *PDR5* (véase la figura 12). Se digiere finalmente con ClaI y SacI. El fragmento lineal así obtenido se electroeluye y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo, con vistas a la transformación que permite la disrupción del gen *PDR5*.

b) Disrupción del gen *SNQ2*

El fragmento de ADN NarI-BglIII de 3.688 pb (que contiene una parte del ORF *SNQ2*) del plásmido pEH5222 (Servos 1993) cuya secuencia está depositada en el banco de datos EMBL bajo la referencia X66732 se liga en el plásmido Bluescript II (ks⁻) previamente digerido con BamHI y ClaI. Después de transformación de *E. coli*, se retiene el plásmido denominado pCM10 que posee el inserto (véase la figura 13). Este plásmido se digiere a continuación con ClaI y HpaI con el fin de eliminar una parte del ORF *SNQ2* que se reemplazará por el casete de disrupción. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 5.230 pb se electroeluye a continuación y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo. El plásmido pDIS3 se

digiere con ClaI y Ecl136II para obtener el casete de disrupción compatible. Los diferentes fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. El fragmento de 2.709 pb se electroeluye a continuación y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo. Los dos fragmentos así preparados se ligan juntos. Después de transformación de *E. coli*, se prepara el plásmido denominado pCM11 (véase la figura 14) que permite la disrupción de *SNQ2*. Se digiere finalmente con XbaI y SalI. El fragmento lineal así obtenido se electroeluye y se purifica por una extracción con una mezcla fenol-cloroformo, con vistas a la transformación que permite la disrupción del gen *SNQ2*.

2) Obtención de las cepas delecionadas para *PDR5* y *SNQ2*

La cepa 5247 se transforma con el fragmento preparado como se ha descrito en 1a y 1b. Después de eliminar el marcador de selección se obtienen la cepa yCM3 ($\Delta pdr5$, *ura3*, *trp1*, *MAT α*) y la cepa yCM67 ($\Delta snq2$, *ura3*, *trp1*, *MAT α*).

3) Obtención de las cepas delecionadas para *PDR1*, *PDR5*, *SNQ2* y *ERG6*

La cepa yCM30 se transforma con el fragmento preparado como se ha descrito en el ejemplo 5 en 1a. Después de eliminar el marcador de selección se obtiene la cepa yCM45 ($\Delta pdr1$, $\Delta pdr5$, *ura3*, *trp1*, *MAT α*). La cepa yCM45 se transforma con el fragmento preparado como se ha descrito en el ejemplo 5 en 1b. Después de eliminar el marcador de selección se obtiene la cepa yCM51 ($\Delta pdr1$, $\Delta pdr5$, $\Delta snq2$, *ura3*, *trp1*, *MAT α*). La cepa yCM51 se transforma con el fragmento preparado como se ha descrito en el ejemplo 1 en 1a. Después de eliminar el marcador de selección se obtiene la cepa yCM61 ($\Delta pdr1$, $\Delta pdr5$, $\Delta snq2$, $\Delta erg6$, *ura3*, *trp1*, *MAT α*).

Ejemplo 6

Evaluación de la permeabilidad de la cepa de levadura obtenida en el ejemplo 5

La permeabilidad de las cepas de levaduras 5247 y yCM61 se determina mediante la evaluación de la sensibilidad a diferentes productos citotóxicos. Las diferentes levaduras se siembran a una densidad óptica de 0,05 a 700 nm en medio mínimo YNB correctamente suplementado en bases y aminoácidos en presencia de una concentración creciente de xenobióticos. Los cultivos se ponen a 28°C y a 200 rpm durante 48 horas. Se determina la densidad óptica a 700 nm. Se determina la CE₅₀ como la concentración de xenobiótico que inhibe la mitad del crecimiento de la levadura comparativamente con un control sin xenobiótico.

La tabla III siguiente muestra los resultados obtenidos.

(Tabla pasa a página siguiente)

CEPA	DOXORRUBICINA		ACTINOMICINA D		CICLOHEXIMIDINA	
	CE ₅₀ (μM)	RELACIÓN	CE ₅₀ (μM)	RELACIÓN	CE ₅₀ (μM)	RELACIÓN
5247 (wt)	40,5	1	23,9	1	53	1
yCM63 (Δerg4)	9,2	4,4	6,4	3,7	-	-
yCM30 (Δpdr1)	18,4	2,2	12,7	1,9	2,5	21,2
yCM65 (Δpdr1, Δerg4)	5,15	7,8	5,8	4,1	0,5	106

TABLA 1

cepa	DOXORRUBICINA		ACTINOMICINA D		CICLOHEXIMIDINA	
	CE ₅₀ (μ M)	RELACIÓN	CE ₅₀ (μ M)	RELACIÓN	CE ₅₀ (μ M)	RELACIÓN
5247 (wt)	40,5	1	23,9	1	53	1
yCM55 (Δ erg6)	12	3,4	5,6	4,3	2,3	23
yCM30 (Δ pdr1)	18,4	2,2	12,7	1,9	2,5	21,2
yCM57 (Δ pdr1, Δ erg6)	1,7	23,8	0,75	31,9	0,2	265

TABLA II

COMPUESTO	5247 (wt) CE ₅₀ (μM)	yCM61 (Δ <i>pdr1</i> , Δ <i>pdr5</i> , Δ <i>snq2</i> , Δ <i>erg6</i>) CE ₅₀ (μM)	RELACIÓN
Novobiocina	245	9	27
Lovastatina	143	3,8	37
Sulfometurón	6,9	0,13<<	>>50
Camptotecina	>>574	5,74	>>100
Cicloheximida	71	0,142	500

TABLA III

Referencias bibliográficas

- **Al-Fell** *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 4534,
- 5 - **Anderson** *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 19169,
- **Ashman** *et al.*, *Lipids* 1991, 26, 628,
- **Arthington** *et al.*, *Gene* 1991, 102, 39,
- 10 - **Ballou** 1982, The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*, metabolism and gene expression, eds Cold Spring Harbor Laboratory, 335,
- **Balzi** *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1073, 241,
- 15 - **Basson** *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, 53,5563,
- **Boone** *et al.*, *J. Cell. Biol.* 1990, 110, 1833;
- 20 - **Brown** *et al.*, *Genetics* 1993, 133, 837,
- **Chen** *et al.*, *Curr. Genet.* 1987, 12, 185
- **Dean-Johnson** *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 1274,
- 25 - **Dequin** *et al.*, *Cur. genet.* 1988, 13,471,
- **Dexter** *et al.*, *Genetics* 1994, 136, 505,
- 30 - **Gietz** *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 1992, 20, 1425,
- **Fegueur** *et al.*, *Cur. Genet* 1991, 20, 365,
- **Hara** *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 2281
- 35 - **Hardwick** *et al.*, *Yeast* 1994, 10, 265,
- **Hill** *et al.*, *Genetics* 1992, 130, 273,
- 40 - **Hjelmstad** *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 4357,
- **Hoegenauer** *et al.*, *Gene* 1991, 107, 155,
- **Hosaka** *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 2053,
- 45 - **Hutchins** *et al.*, *J. Bacteriol.* 1983, 154, 161,
- **Kalb** *et al.*, *DNA* 1987, 6, 529,
- 50 - **Kanawaza** *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 1988, 8, 664,
- **Kanik** *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 1990, 10, 898,
- **Karst** *et al.*, *Molec. Gen. Genet* 1977, 154, 269,
- 55 - **Kiyono** *et al.*, *J. Biochem* 1987, 102, 1089,
- **Klis**, *Yeast* 1994, 10, 851,
- 60 - **Kodaki** *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 15428,
- **Kodaki** *et al.*, *J. Biochem* 1991, 109, 276,
- **Kuchler** *et al.*, *EMBO J.* 1989, 8, 3973,
- 65 - **Lai** *et al.*, *Gene* 1994, 140, 41,
- **Lee** *et al.*, biosciences biotechnology and biochemistry, 1994, 58,391,

ES 2 288 301 T3

- **Leppert et al.**, *Genetics* 1990, 125, 30,
- **Lussier et al.**, *Yeast* 1993, 9; 1057,
- 5 - **Marcireau et al.**, *Cur. Genet.* 1992, 22, 267,
- **Marsh et al.** *Gene* 32 (1984) 481,
- **Meadar et al.**, *Mol Cell. Biol.* 1990, 10, 3013;
- 10 - **Meyers et al.**, *Curr. Genet.* 1992, 21, 431,
- **Mohamed et al.**, *J. Biol. Chem.* 1990, 263, 12315,
- 15 - **Molzhan et al.**, *J. Gen. Microbiol* 1972, 72, 339,
- **Mons**, thèse de doctorat, université de Poitiers 1984,
- **Moye-Rowley et al.**, *Genes et development* 1989, 3, 283,
- 20 - **Nikawa et al.**, *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 4876,
- **Oulmouden et al.**, *Gene* 88,253,
- 25 - **Renaud et al.**, *Eur. J. Biochem.*, 1990, 194, 889
- **Roemer et al.**, *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 1991, 88, 11295,
- **Rothstein Meth. Enzymol.** 101 (1983) 202,
- 30 - **Sawadogo et van Dyke**, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 674,
- **Schwezer et al.**, *Molec. Gen. Genet* 1986, 203, 481,
- 35 - **Servos et al.**, *Mol. Gen. Genet.* 1993, 236, 214,
- **Servouse et al.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984, 123, 424,
- **Shimizu et al.**, *Mol. Gen. Genet.* 1994, 242, 641,
- 40 - **Sinha et al.**, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 4539,
- **Stateva et al**, *Mol. Cell. Biol.* 1991, 11, 4235,
- 45 - **Stukey et al.**, *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 20144,
- **Tsay et al.**, *Mol. Cell. Biol.* 1991, 11, 620,
- **Tsukagoshi et al.**, *Eur. J. Biochem* 1987 169, 477.
- 50 - **Yabusaki**, The international review of pharmaceutical technology research and development, 1992, 163.

REIVINDICACIONES

1. Levadura modificada que tiene una permeabilidad celular incrementada, **caracterizada** porque al menos dos genes que controlan, a niveles diferentes, la permeabilidad celular elegidos entre:

(a) los genes que intervienen a nivel de la síntesis de los esteroides, sus derivados y sus homólogos,

(b) los genes que intervienen a nivel de los mecanismos de detoxificación o de exportación de compuestos endógenos, sus derivados y homólogos

están inactivados.

2. Levadura modificada según la reivindicación 1, **caracterizada** porque los genes que intervienen a nivel de la síntesis de los esteroides se eligen entre los genes *ERG10*, *ERG11*, *ERG13*, *HMG1*, *HMG2*, *ERG12*, *ERG8*, *ERG19*, *ID11*, *ERG20*, *ERG9*, *ERG1*, *ERG18*, *ERG7*, *ERG17*, *ERG16*, *ERG24*, *ERG6*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG4* y cualquier gen homólogo.

3. Levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizada** porque los genes que intervienen a nivel de los mecanismos de detoxificación o de exportación de compuestos endógenos se eligen entre los genes *SNQ1*, *SNQ2*, *SNQ3*, *STE6*, *PDR1*, *PDR2*, *PDR3*, *PDR4*, *PDR6*, *PDR7*, *PDR9* y *PDR11* y cualquier gen homólogo.

4. Levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque los genes se inactivan por una o varias modificaciones genéticas, de manera que son parcialmente o totalmente incapaces de codificar las proteínas naturales o activas.

5. Levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque las inactivaciones son mutaciones puntuales o múltiples, sustituciones, deleciones, adiciones y/o modificaciones de naturaleza genética y/o química.

6. Levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque los genes inactivados codifican proteínas menos funcionales o no funcionales o mutantes que tienen un espectro de actividad modificado.

7. Levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque pertenece a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* o *Schyzosaccharomyces*.

8. Levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque se trata de una levadura *S. cerevisiae* en la que los genes *PDR1*, *PDR5*, *SNQ2*, *ERG6* están modificados.

9. Procedimiento de preparación de una levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque se reemplaza todo o parte de dichos genes cromosómicos considerados por una versión modificada *in vitro*.

10. Utilización de una levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 con vistas a la penetración de un compuesto en dicha levadura.

11. Utilización de una levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el cribado de compuestos biológicamente activos.

12. Utilización de una levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en biocatálisis.

13. Utilización de una levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 como modelo de metabolismos y/o de estudios toxicológicos.

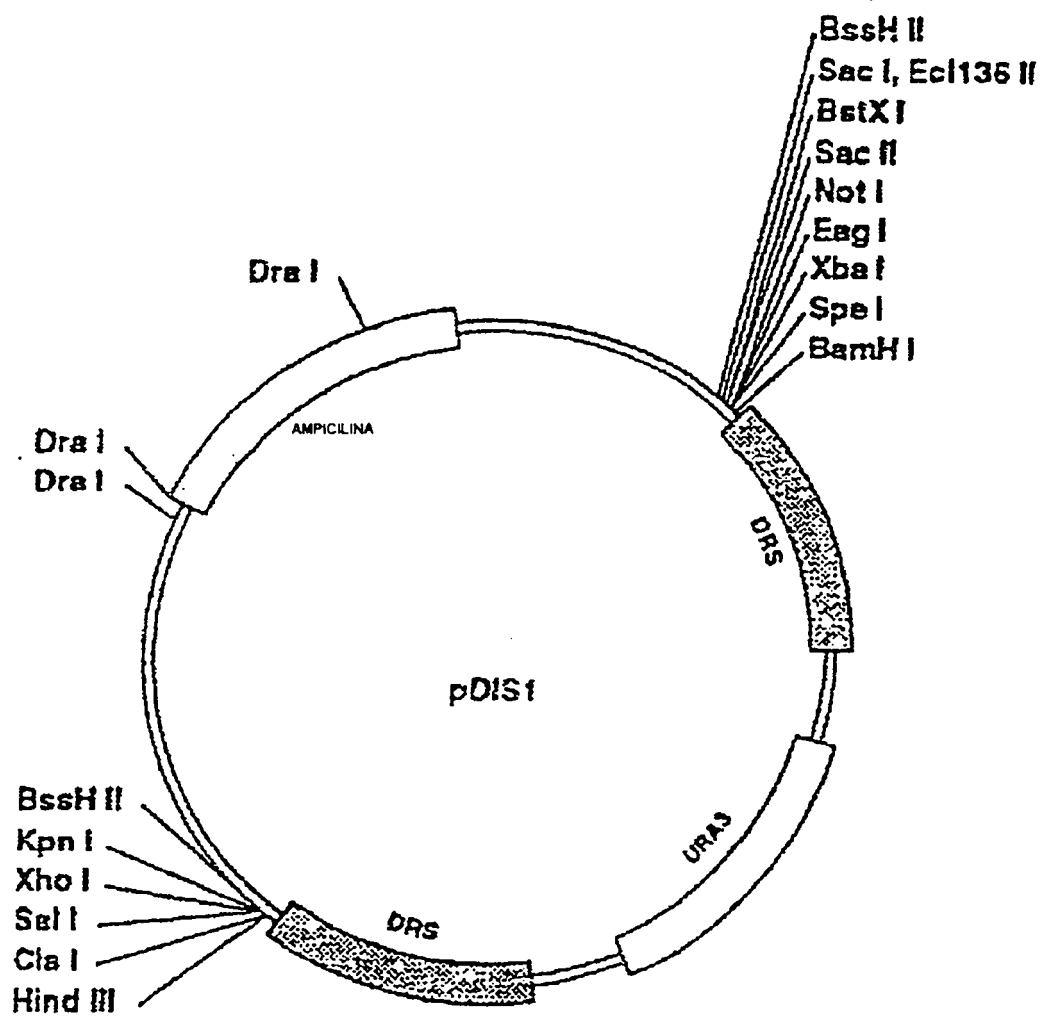


Figura 1

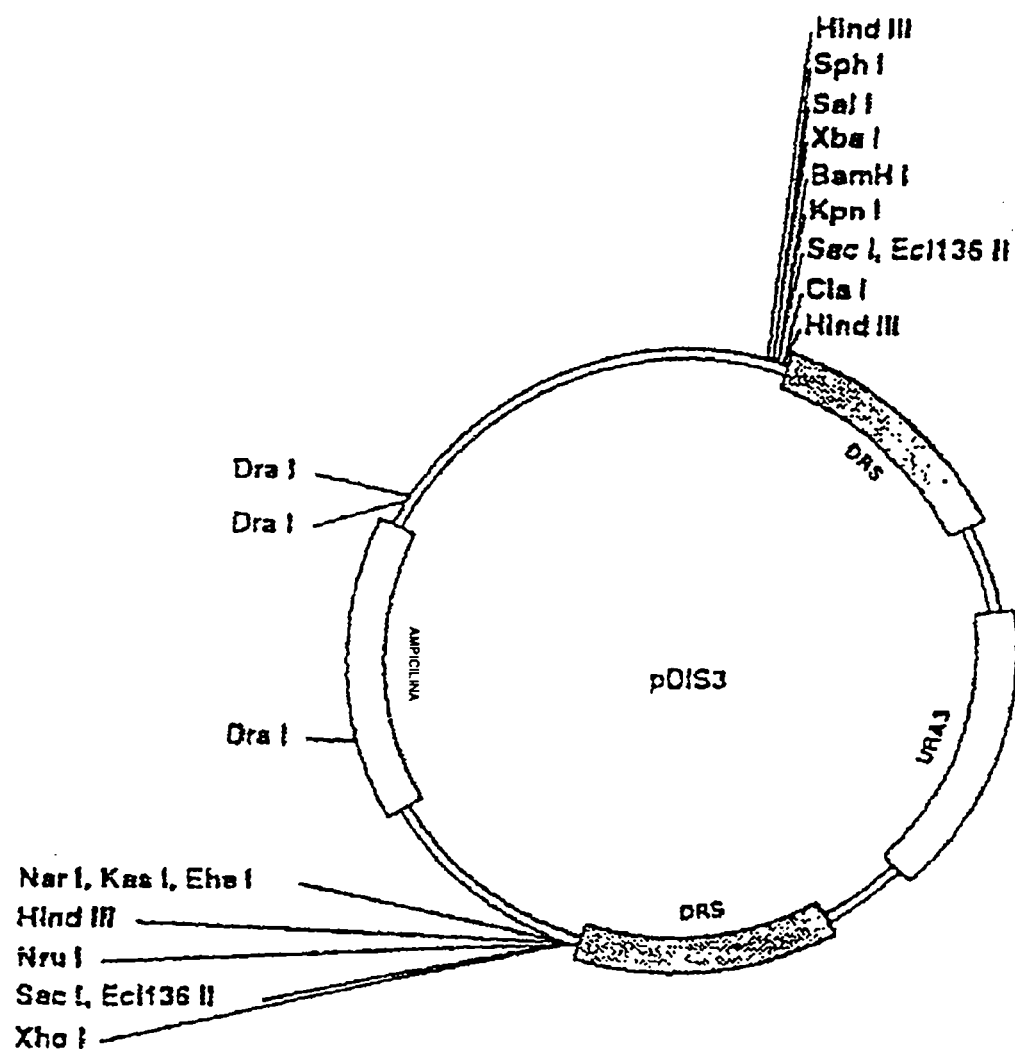


Figura 2

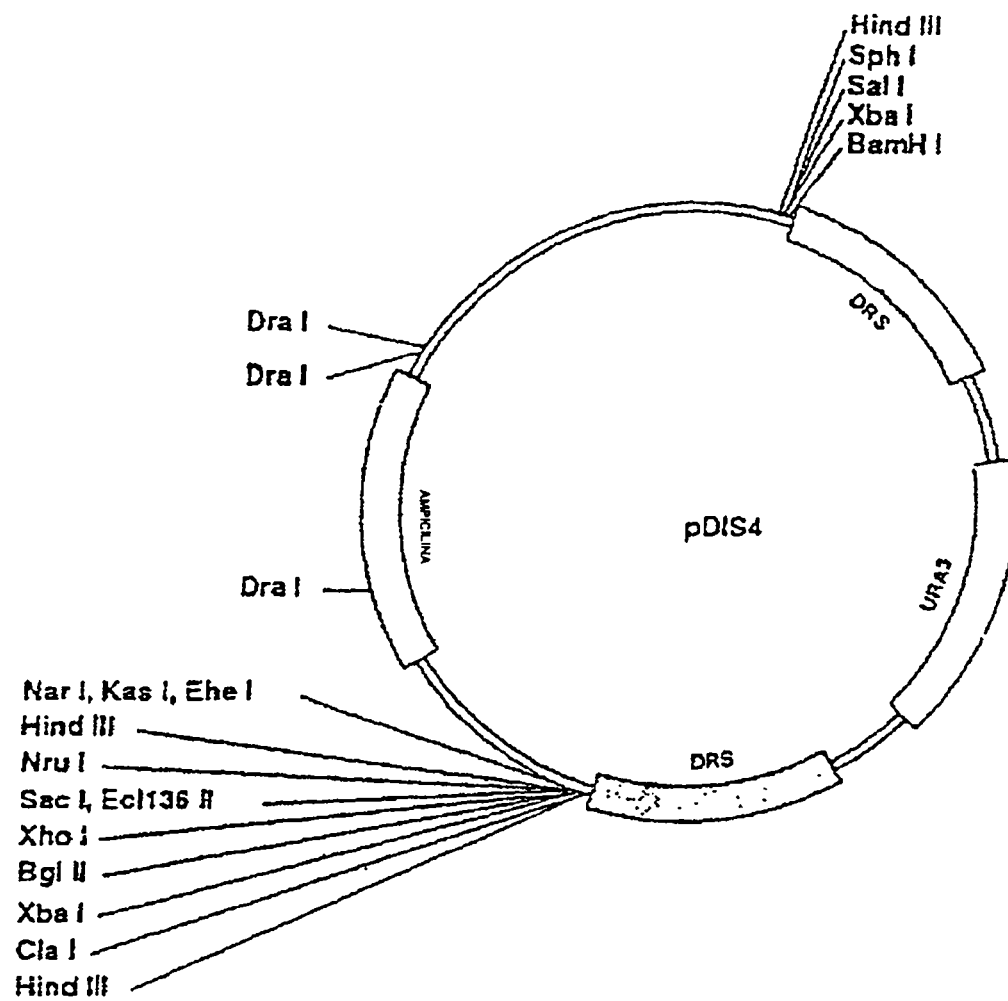


Figura 3

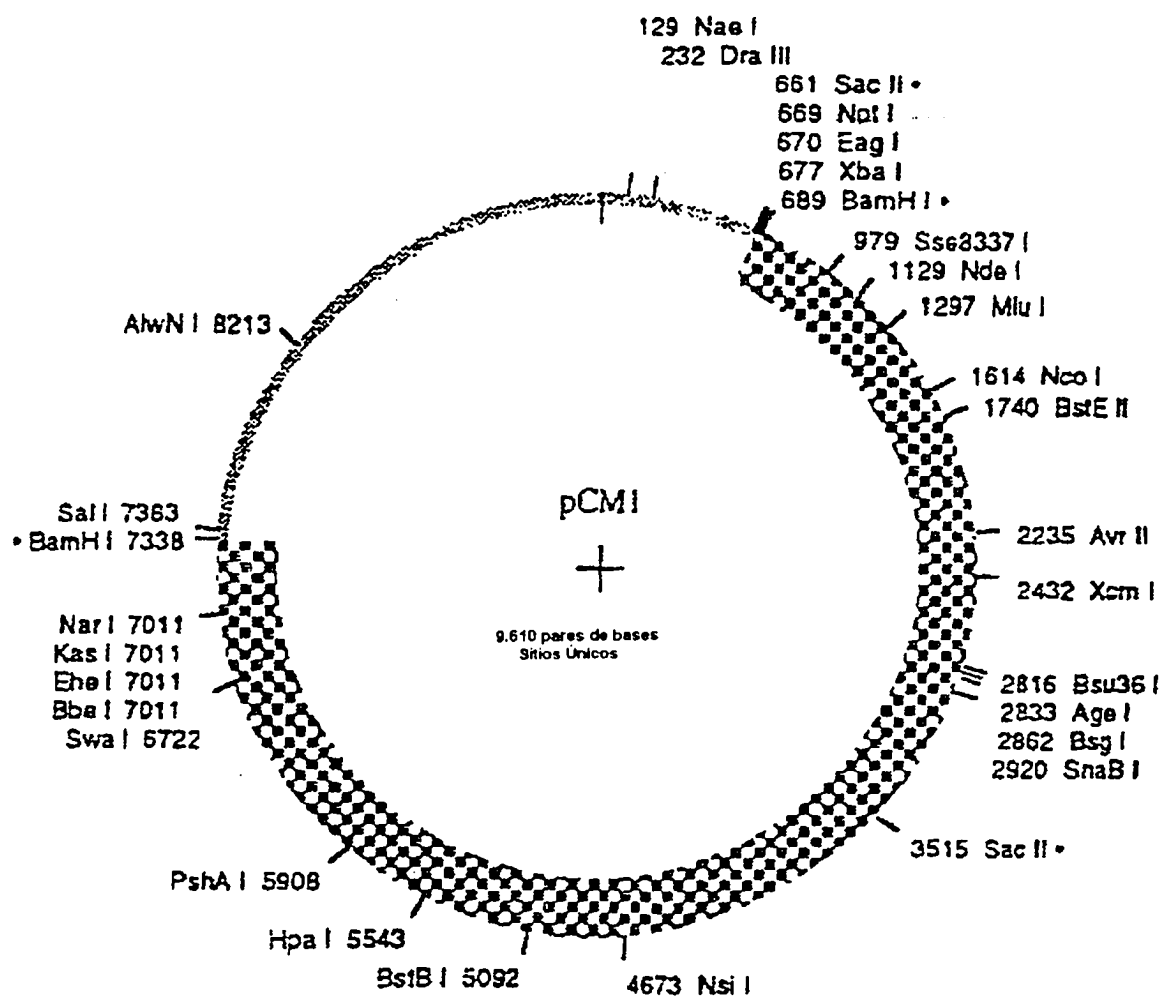


Figura 4

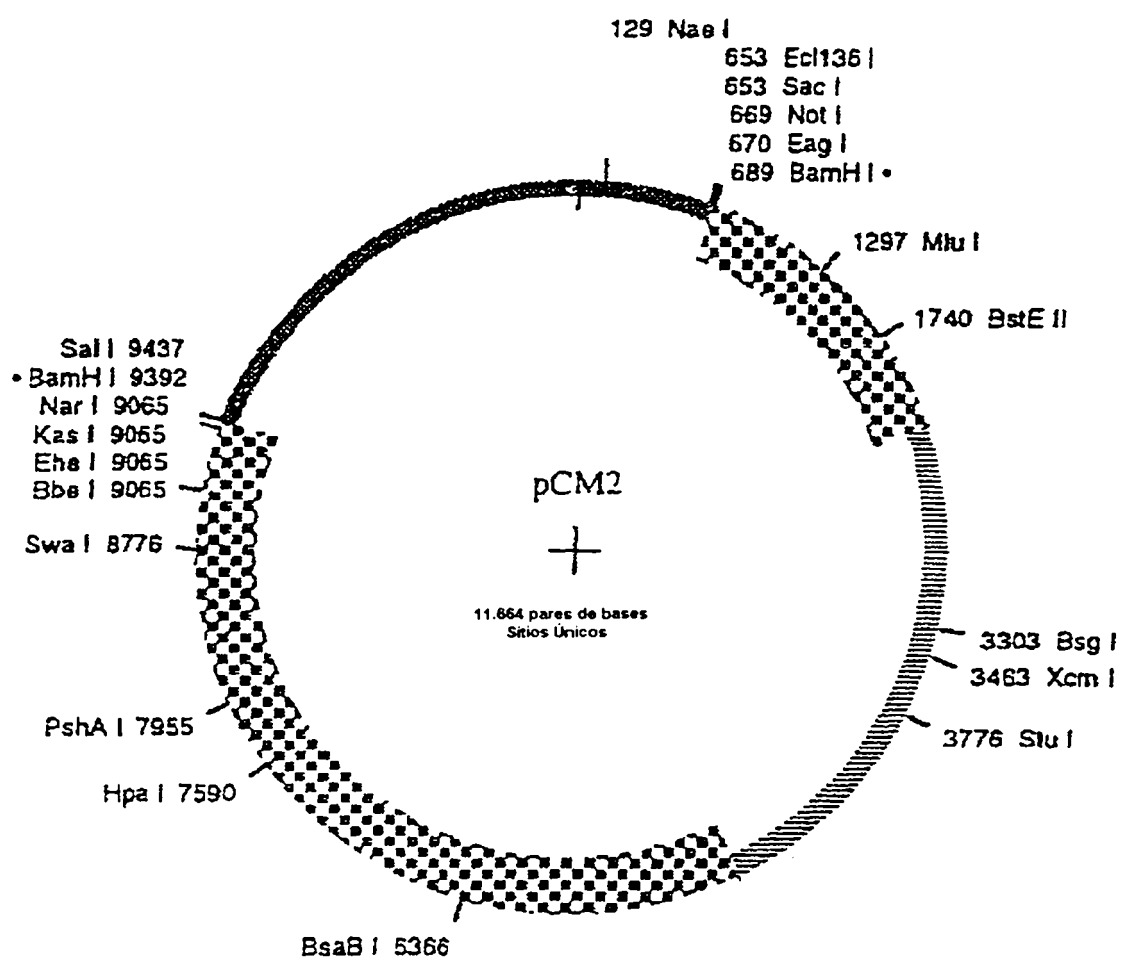


Figura 5

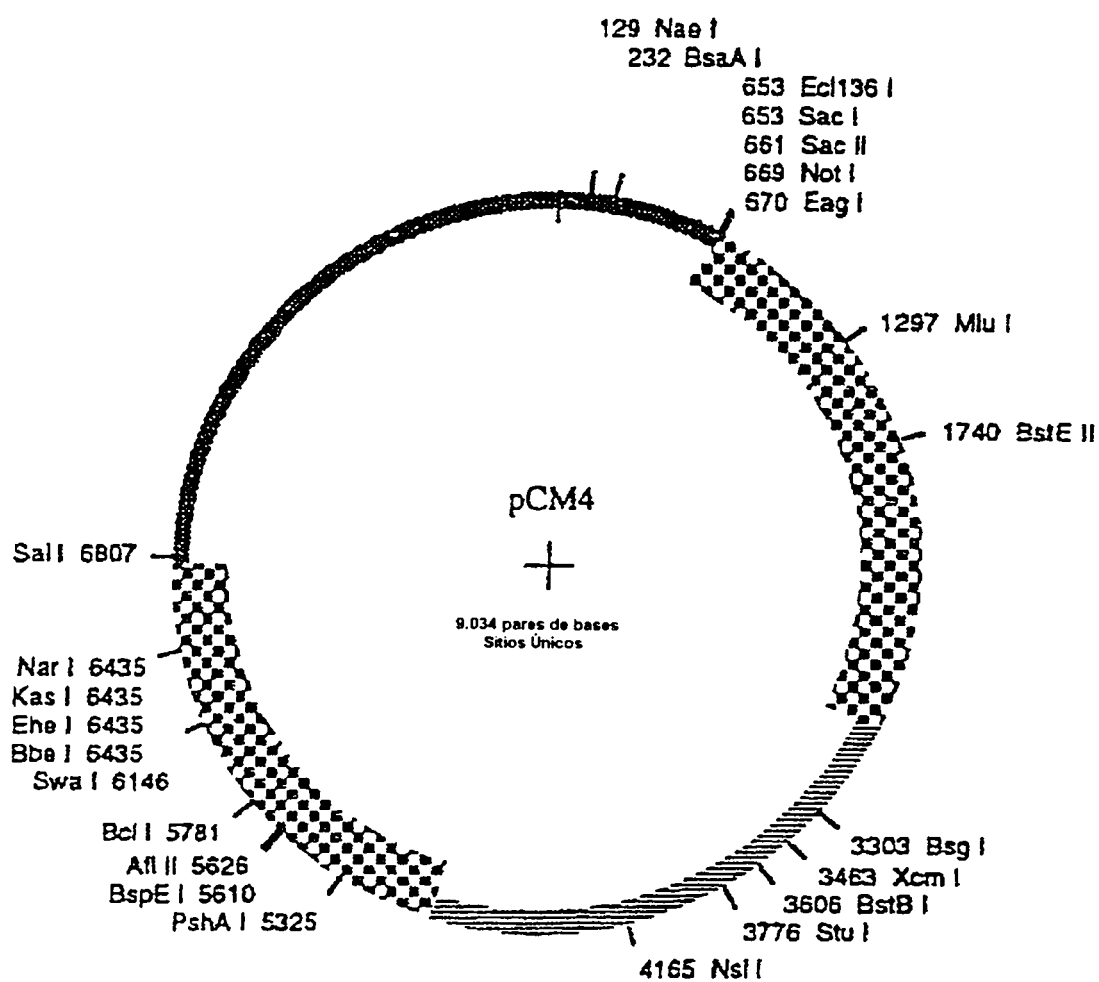


Figura 6

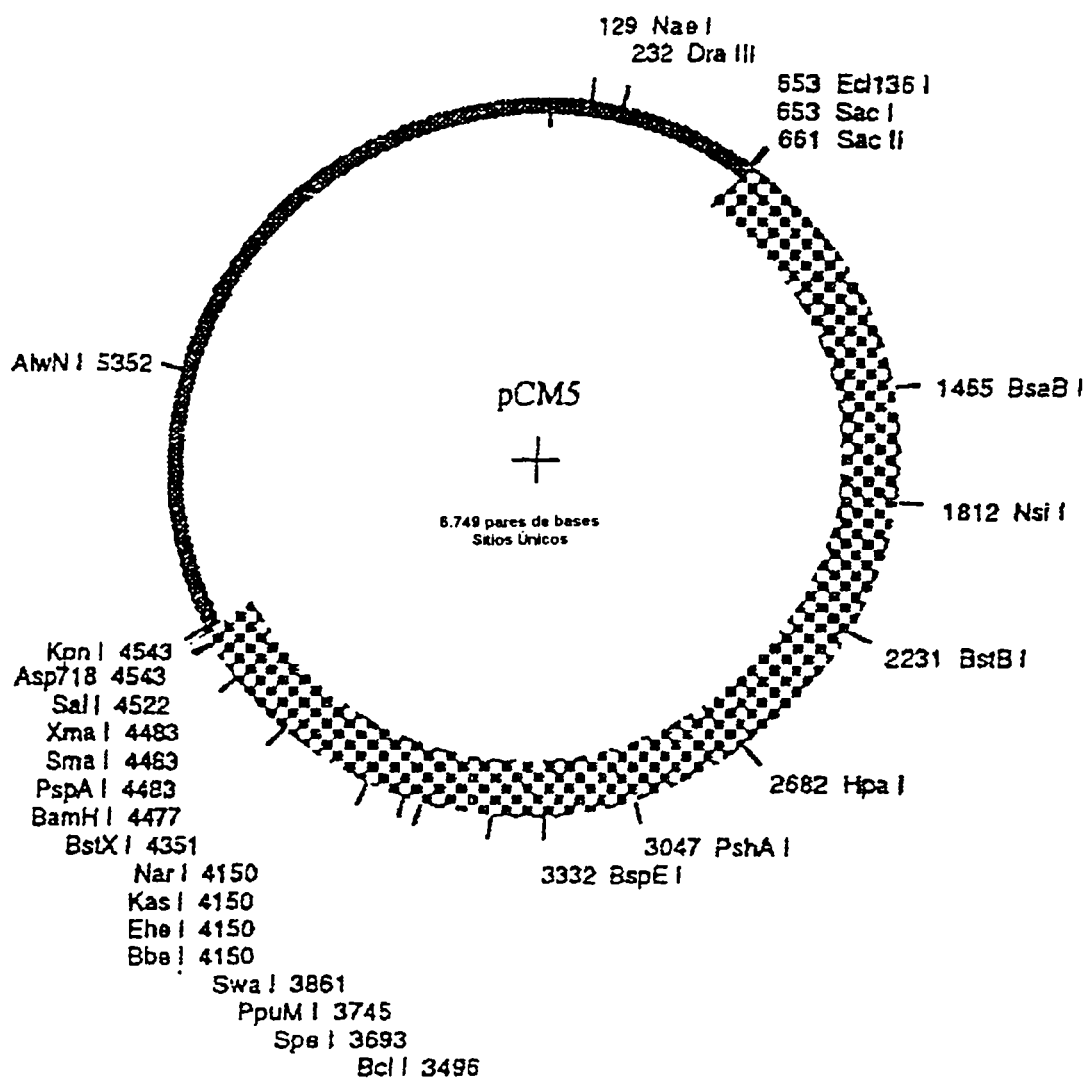


Figura 7

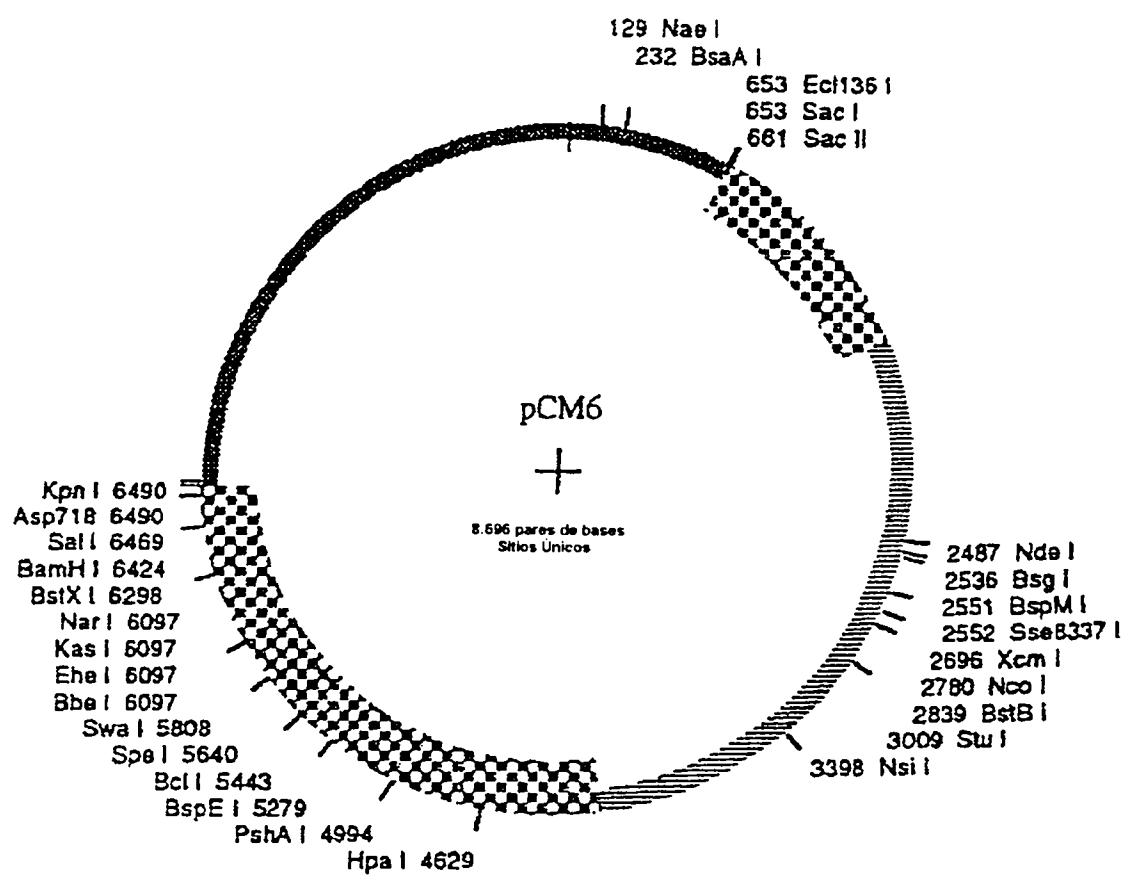


Figura 8

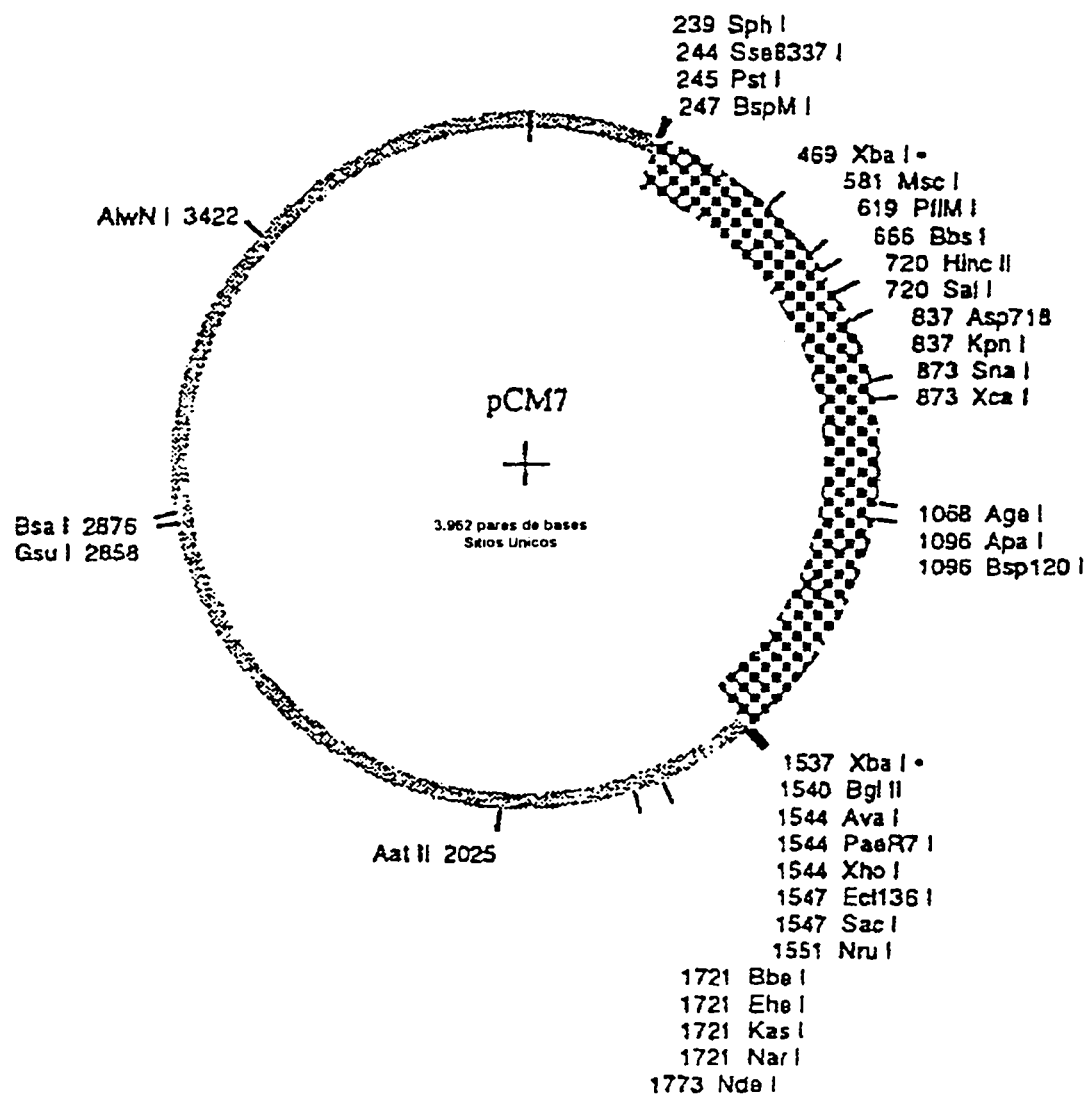


Figura 9

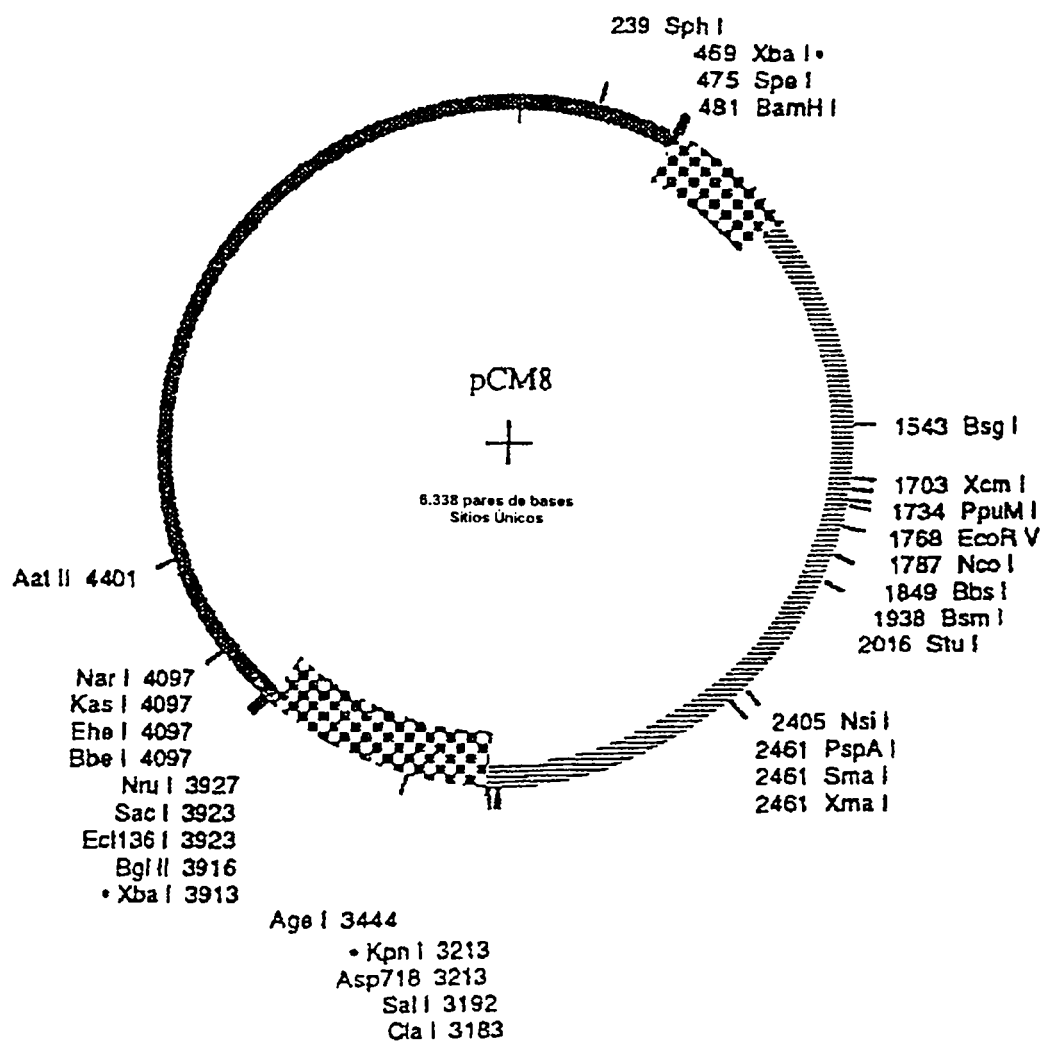


Figura 10

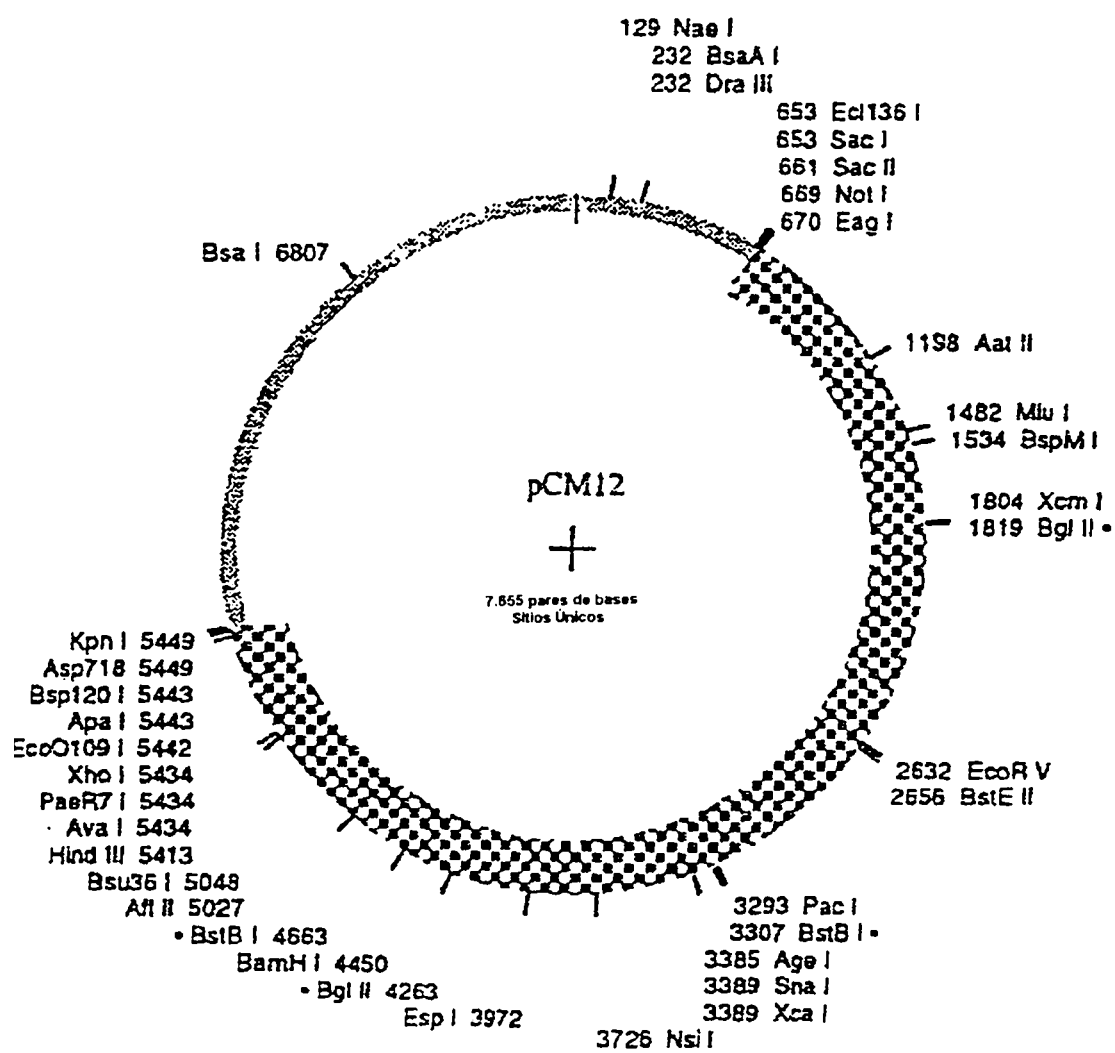


Figura 11

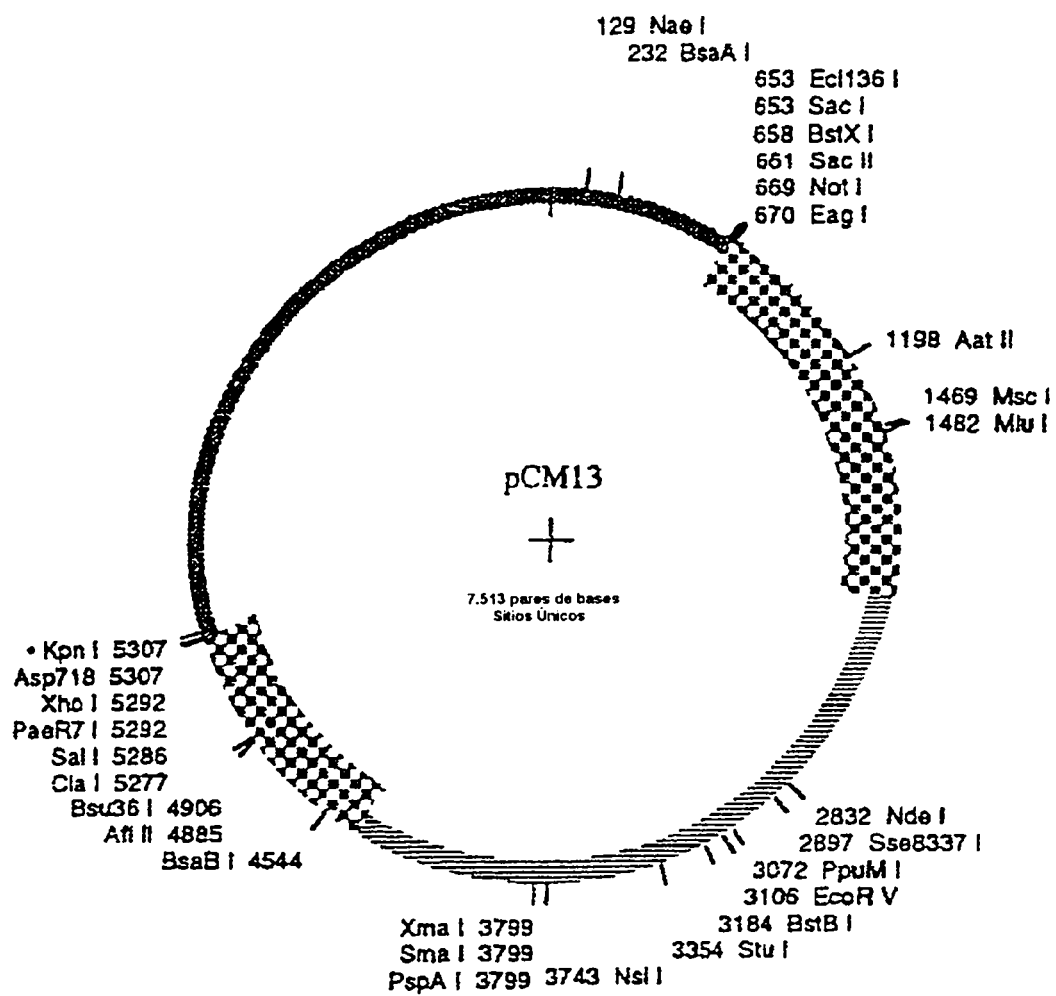


Figura 12

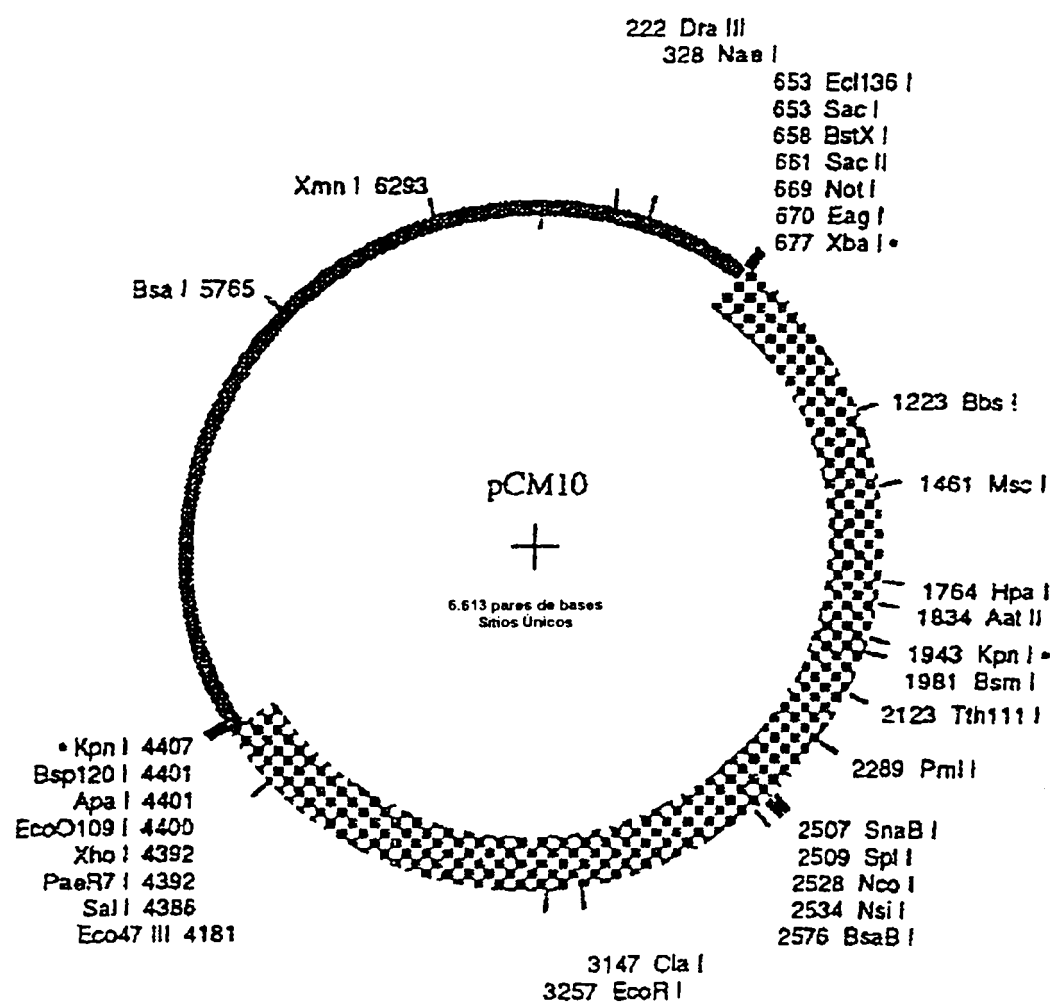


Figura 13

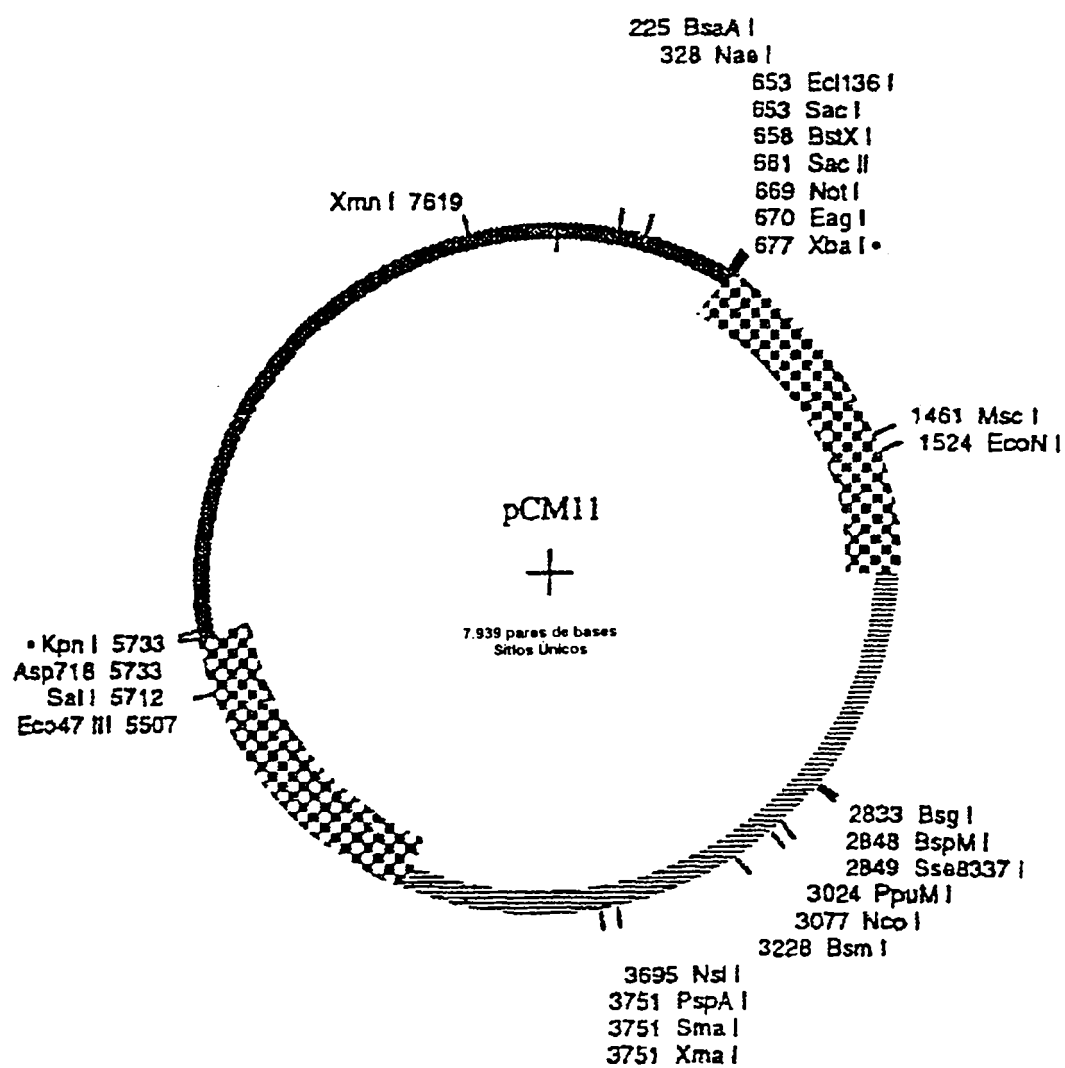


Figura 14

ES 2 288 301 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIONES GENERALES:

(i) DEPOSITARIO:

(A) NOMBRE: RHONE POULENC RORER S.A.

(B) CALLE: 20, Avenue Raymond Aron

(C) CIUDAD: ANTONY

(E) PAÍS: FRANCIA

(F) CÓDIGO POSTAL: 92165

(G) TELÉFONO: 40.91.69.22

(H) FAX: (1) 40.91.72.96

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: LEVADURA CON PERMEABILIDAD MODIFICADA

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

(iv) FORMA DESCIFRABLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE SOPORTE: Cinta

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (OEB)

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

TTACTTTCGA TTAAAGTTTT ACATAATTTA

(2) INFORMACIONES PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

GGCCTGCTCA TGAACGTGCT ATCTT