



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 833**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 33/02 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96400301 .6**

96 Fecha de presentación : **14.02.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0727489**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.08.1996**

54

Título: **Secuencia de ADN que codifica una proteína de *A. thaliana* que tiene una actividad delta-5,7-esterol-delta-7-reductasa, la proteína delta-7Red, procedimiento de producción, las cepas de levaduras transformadas, aplicaciones.**

30

Prioridad: **15.02.1995 FR 95 01723**
01.06.1995 FR 95 06517

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2010

73

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

72

Inventor/es: **Chenivresse, Xavier;**
Duport, Catherine;
Lecain, Eric y
Pompon, Denis

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 339 833 T3

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

Secuencia de ADN que codifica una proteína de *A. thaliana* que tiene una actividad delta-5,7-esterol-delta-7-reductasa, la proteína delta-7Red, procedimiento de producción, las cepas de levaduras transformadas, aplicaciones.

La presente invención se refiere a una secuencia de ADN que codifica una proteína de *A. thaliana* que tiene una actividad delta-5,7-esterol-delta-7 reductasa, la proteína delta-7Red, a su procedimiento de producción, a las cepas de levaduras transformadas y a sus aplicaciones.

La delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa (E.C.1.3.1.21) es una enzima microsomal cuya presencia ha sido puesta en evidencia por su actividad en los homogenatos de hígado de rata (M. E. Dempsey *et al.*, Methods Enzymol., 15, 501-514, 1969) así como en las preparaciones de plantas de *Zea mays* (M. Taton *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 181, 465-473, 1991). Esta reductasa depende del NADPH y reduce *in vitro* el 7-deshidrocolesterol a colesterol.

Los esteroides son los constituyentes principales de las membranas en las eucariotas pero presentan diferencias de estructura según las especies. En las células de eucariotas tales como las levaduras, el esteroide principal es el ergosterol que contiene una doble insaturación en C-5 y C-7, una cadena lateral ramificada en C-24 y una insaturación en C-22 mientras que en los mamíferos el colesterol se caracteriza por una insaturación en C-5 y una cadena lateral saturada. El sitosterol, el estigmasterol y el campesterol, que representan los esteroides más comunes en las plantas, tienen una cadena lateral ramificada pero saturada y, como los esteroides de los vertebrados, no tienen una insaturación en C-7. La enzima responsable de esta diferencia de estructura del núcleo esteroide es la delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa.

La delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa no ha sido nunca purificada de modo homogéneo y solamente ha sido descrita una purificación parcial (M. E. Dempsey *et al.*; M. Taton *et al.*, ya citado). La proteína no ha sido caracterizada por sus propiedades físico-químicas. No se ha descrito ninguna información sobre la secuencia de la proteína y ningún anticuerpo dirigido contra ésta. Por otro lado, una aparente deficiencia en 7-deshidrocolesterol reductasa ha sido descrita en el hombre asociada al síndrome RSH/Smith-Lemli-Opitz (SLO) (J. M. Opitz *et al.*, Am. J. Med. Genet., 50, 326-338, 1994).

La clonación de un ADNc que codifica la delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa, que pueda permitir identificar la secuencia de la proteína correspondiente así como la caracterización del gen humano o la puesta en evidencia de una deficiencia congénita de éste, no es por tanto realizable con los métodos conocidos que hacen uso por ejemplo de las técnicas de hibridación y/o de detección inmunológica. Por tanto es particularmente buscada la obtención de métodos inventivos de cribado que permitan realizar la clonación, especialmente en ausencia de informaciones sobre la proteína.

El ergosterol, principal esteroide de las membranas de los hongos, contiene un par de dobles enlaces conjugados en C-5,7 que confiere una actividad antimicótica a los compuestos de la familia de los polienos tales como la nistatina (R. Bittman *et al.*, J. Biol. Chem., 260, 2884-2889, 1985). La fuerte dependencia de la acción de la nistatina de la concentración membranar de esteroides insaturados en C-5,7 ha permitido seleccionar en el *S. cerevisiae* cepas de mutantes frente a los esteroides acumulados (S. W. Molzahn *et al.*, J. Gen. Microbiol., 72, 339-348, 1972). Así los mutantes *erg2* y *erg3* acumulan esteroides que no tienen los dobles enlaces conjugados en C-5,7 debido a una deficiencia en esteroide delta-8,7 isomerasa (W. Ashman *et al.*, Lipids, 26, 628, 1991) y en esteroide delta-5 deshidrogenasa (B. Arthinton *et al.*, Gene, 102, 39, 1991) respectivamente. Tales mutantes son viables porque el ergosterol, el esteroide natural principal de la levadura, puede ser reemplazado en ciertas condiciones por diferentes esteroides de sustitución incluyendo el colesterol.

La ventaja del crecimiento de la resistencia a la nistatina de cepas de levadura enriquecidas en esteroides que no tienen la doble insaturación en C-5,7 ha sido percibida por los inventores para clonar un ADNc que codifica una proteína heteróloga que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa con un método de cribado que utiliza una interferencia metabólica en *S. cerevisiae*. El éxito de este método que ofrece la ventaja de ser independiente del conocimiento de las secuencias del ADN o de la proteína así como de una detección basada solamente sobre la actividad enzimática, no es sin embargo previsible debido a las numerosas dificultades técnicas a superar.

Una primera limitación viene del hecho de que el modo de acción de la nistatina no está totalmente elucidado (L. W. Parks *et al.*, CRC Critical Reviews in Microbiology, 301-304, 1978). Por ejemplo, la débil especificidad de la selección por la nistatina es previsible debido a la naturaleza indirecta de ésta que lleva en el caso de la levadura a la selección de mutaciones genómicas espontáneas tales como los mutantes *erg* (S. W. Molzahn *et al.* ya citado) o las mutaciones genómicas que arrastran resistencias independientes de la vía de los esteroides. Del mismo modo, las células transformadas por un banco pueden expresar genes heterólogos que confieren una resistencia a la nistatina sin relación con la vía de los esteroides.

Otro ejemplo de limitación esperada se refiere al hecho de que la proteína heteróloga puede ser débilmente activa en la célula, lo que conduce a la ausencia de resistencia o a una débil resistencia a la nistatina por ejemplo por una de las siguientes razones: 1) el gen que codifica la delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa está débilmente expresado; 2) la proteína es poco o nada activa porque está mal plegada o porque resulta de un tratamiento subcelular incorrecto; 3) la proteína de la planta no reconoce los esteroides propios de la levadura como sustratos o 4) los esteroides que pueden ser sustratos están en forma esterificada o almacenados en las vesículas y no están en contacto con la enzima. Se puede

prever por tanto que los esteroides así acumulados escapen a la acción de la delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa que, en los eucariotas, se supone que está localizada en los microsomas.

La presente invención se refiere a la clonación de un ADNc de *A. thaliana* que codifica una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa, denominada delta-7Red, según un procedimiento de clonación realizado en una levadura por interferencia metabólica basada sobre la resistencia a la nistatina. La proteína delta-7Red permite reducir los esteroides que tienen una insaturación en C-7 por un procedimiento de reducción biológica que proporciona además una solución ventajosa al problema de la reducción selectiva en C-7 de esteroides o de esteroides que tienen una doble insaturación en C-5,7, que los métodos de reducción por vía química no permiten.

La invención se refiere igualmente a las células de levadura transformadas que expresan la delta-7Red que, de forma sorprendente, acumulan productos saturados en C-7 y eventualmente saturados en C-22 que, contrariamente al ergosterol, son sustratos de la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol, es decir el citocromo P₄₅₀SCC.

Estas propiedades inesperadas permiten una utilización de las levaduras transformadas de la invención en un procedimiento de preparación de esteroides o de esteroides que tiene un interés industrial y/o farmacológico, en particular la preparación de pregnenolona por oxidación biológica de los esteroides endógenos de levadura, reducidos en C-7, por el citocromo P₄₅₀ SCC (P₄₅₀SCC) en presencia de adrenodoxina reductasa (ADR) y de adrenodoxina (ADX). Las levaduras transformadas de la invención se pueden utilizar también en un procedimiento de preparación de los esteroides intermedios de la vía de metabolización del colesterol en hidrocortisona en los mamíferos y otros vertebrados. Esta utilización presenta la ventaja de permitir la preparación de la hidrocortisona o de sus intermedios en un procedimiento de oxidación biológica que no necesita el empleo de un esteroide exógeno tal como el colesterol como sustrato inicial y de esquivar así el problema de la penetración de un esteroide en la levadura cuya impermeabilidad a los esteroides exógenos en condiciones de aerobiosis ha sido descrita (R. T. Lorentz *et al.*, J. Bacteriology, 981-985, 1986).

La invención se refiere también a la utilización de las secuencias nucleotídicas obtenidas con ayuda del procedimiento de clonación de la invención. Una secuencia de ARN o ADN que codifica la delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa se puede utilizar para el diagnóstico o el tratamiento de afecciones que implican el producto del gen de la delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa. Por ejemplo, una deficiencia en delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa que convierte el 7-deshidrocolesterol en colesterol se supone que está implicada en el síndrome RSH/SLO. Así una secuencia de ADN humano se puede utilizar como sonda para diagnosticar una deficiencia en delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa y se puede utilizar también en terapia génica para corregir tal deficiencia.

La presente invención tiene por tanto por objeto una secuencia de ácido nucleico que contiene una secuencia que codifica una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa, siendo dicho ácido nucleico un ADN o un ARN y siendo particularmente un ADNc.

La actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa se puede poner en evidencia por ejemplo con ayuda de un ensayo enzimático *in vitro* descrito más adelante en la parte experimental.

La invención tiene más particularmente por objeto una secuencia de ADNc en la que la secuencia codificadora codifica una proteína de *A. thaliana* que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa y que tiene la secuencia nucleotídica de la secuencia SEQ ID N° 1:

GTGTGAGTAA TTTAGGTCAA CACAGATCAG AATCTGAGGC TTTGGCCGAG ACGAAGAGAA 60

AAGCAGAAGA AGAAA ATG GCG GAG ACT GTA CAT TCT CCG ATC GTT ACT TAC 111

Met Ala Glu Thr Val His Ser Pro Ile Val Thr Tyr
1 5 10

GCA TCG ATG TTA TCG CTT CTC GCC TTC TGT CCA CCT TTC GTC ATT CTC 159

Ala Ser Met Leu Ser Leu Leu Ala Phe Cys Pro Pro Phe Val Ile Leu
15 20 25

CTA TGG TAC ACA ATG GTT CAT CAG GAT GGT TCT GTT ACT CAG ACC TTT 207

Leu Trp Tyr Thr Met Val His Gln Asp Gly Ser Val Thr Gln Thr Phe
30 35 40

ES 2 339 833 T3

5	GGC TTC TTT TGG GAG AAT GGA GTT CAA GGA CTT ATC AAC ATA TGG CCA Gly Phe Phe Trp Glu Asn Gly Val Gln Gly Leu Ile Asn Ile Trp Pro 45 50 55 60	255
10	AGA CCC ACT TTG ATT GCT TGG AAA ATT ATA TTT TGC TAT GGA GCA TTT Arg Pro Thr Leu Ile Ala Trp Lys Ile Ile Phe Cys Tyr Gly Ala Phe 65 70 75	303
15	GAA GCT ATT CTT CAG CTG CTT CTG CCT GGT AAA AGA GTT GAG GGT CCA Glu Ala Ile Leu Gln Leu Leu Leu Pro Gly Lys Arg Val Glu Gly Pro 80 85 90	351
20	ATA TCT CCA GCC GGA AAC CGA CCA GTT TAC AAG GCC AAT GGT CTG GCT Ile Ser Pro Ala Gly Asn Arg Pro Val Tyr Lys Ala Asn Gly Leu Ala 95 100 105	399
25	GCT TAC TTT GTG ACA CTA GCA ACC CAT CTT GGT CTT TGG TGG TTT GGA Ala Tyr Phe Val Thr Leu Ala Thr His Leu Gly Leu Trp Trp Phe Gly 110 115 120	447
30	ATC TTC AAC CCT GCA ATT GTC TAT GAT CAC TTG GGT GAA ATA TTT TCG Ile Phe Asn Pro Ala Ile Val Tyr Asp His Leu Gly Glu Ile Phe Ser 125 130 135 140	495
35	GCA CTA ATA TTC GGA AGC TTC ATA TTT TGT GTT TTG TTG TAC ATA AAA Ala Leu Ile Phe Gly Ser Phe Ile Phe Cys Val Leu Leu Tyr Ile Lys 145 150 155	543
40	GGC CAT GTT GCA CCT TCA TCA AGT GAC TCT GGT TCA TGT GGT AAC CTA Gly His Val Ala Pro Ser Ser Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly Asn Leu 160 165 170	591
45	ATA ATT GAC TTC TAT TGG GGC ATG GAG TTG TAC CCT CGA ATT GGT AAG Ile Ile Asp Phe Tyr Trp Gly Met Glu Leu Tyr Pro Arg Ile Gly Lys 175 180 185	639
50	AGC TTT GAC ATC AAG GTG TTT ACT AAT TGC AGA TTC GGA ATG ATG TCT Ser Phe Asp Ile Lys Val Phe Thr Asn Cys Arg Phe Gly Met Met Ser 190 195 200	687
55	TGG GCA GTT CTT GCA GTC ACG TAC TGC ATA AAA CAG TAT GAA ATA AAT Trp Ala Val Leu Ala Val Thr Tyr Cys Ile Lys Gln Tyr Glu Ile Asn 205 210 215 220	735

ES 2 339 833 T3

5	GGC AAA GTA TCT GAT TCA ATG CTG GTG AAC ACC ATC CTG ATG CTG GTG Gly Lys Val Ser Asp Ser Met Leu Val Asn Thr Ile Leu Met Leu Val 225 230 235	783
10	TAT GTC ACA AAA TTC TTC TGG TGG CAA GCT GGT TAT TGG AAC ACC ATG Tyr Val Thr Lys Phe Phe Trp Trp Glu Ala Gly Tyr Trp Asn Thr Met 240 245 250	831
15	GAC ATT GCA CAT GAC CGA GCT GGA TTC TAT ATA TGC TGG GGT TGT CTA Asp Ile Ala His Asp Arg Ala Gly Phe Tyr Ile Cys Trp Gly Cys Leu 255 260 265	879
20	GTG TGG GTG CCT TCT GTC TAC ACT TCT CCA GGC ATG TAC CTT GTG AAC Val Trp Val Pro Ser Val Tyr Thr Ser Pro Gly Met Tyr Leu Val Asn 270 275 280	927
25	CAC CCC GTC GAA CTC GGA ACT CAG TTG GCA ATA TAC ATT CTC GTT GCA His Pro Val Glu Leu Gly Thr Gln Leu Ala Ile Tyr Ile Leu Val Ala 285 290 295 300	975
30	GGA ATT CTG TGC ATT TAC ATA AAG TAT GAC TGT GAT AGA CAA AGG CAA Gly Ile Leu Cys Ile Tyr Ile Lys Tyr Asp Cys Asp Arg Gln Arg Gln 305 310 315	1023
35	GAG TTC AGG AGG ACA AAC GGG AAA TGT TTG GTT TGG GGA AGA GCC CCG Glu Phe Arg Arg Thr Asn Gly Lys Cys Leu Val Trp Gly Arg Ala Pro 320 325 330	1071
40	TCA AAG ATT GTG GCG TCG TAT ACT ACA ACA TCT CGT GAA ACT AAA ACT Ser Lys Ile Val Ala Ser Tyr Thr Thr Thr Ser Gly Glu Thr Lys Thr 335 340 345	1119
45	AGT CTT CTC TTA ACG TCT GGA TGG TGG GGA TTG GCT CGT CAT TTC CAT Ser Leu Leu Leu Thr Ser Gly Trp Trp Gly Leu Ala Arg His Phe His 350 355 360	1167
50	TAT GTT CCT GAG ATC TTA AGT GCT TTC TTC TGG ACC GTA CCG GCT CTC Tyr Val Pro Glu Ile Leu Ser Ala Phe Phe Trp Thr Val Pro Ala Leu 365 370 375 380	1215
55	TTC GAT AAC TTC TTG GCA TAC TTC TAC GTC CTC ACC CTT CTT CTC TTT Phe Asp Asn Phe Leu Ala Tyr Phe Tyr Val Leu Thr Leu Leu Leu Phe 385 390 395	1263

ES 2 339 833 T3

GAT CGA GCC AAG AGA GAC GAT GAC CGA TGC CGA TCA AAG TAT GGG AAA 1311
 Asp Arg Ala Lys Arg Asp Asp Asp Arg Cys Arg Ser Lys Tyr Gly Lys
 400 405 410

TAT TGG AAG CTG TAT TGT GAG AAA GTC AAA TAC AGG ATC ATT CCG GGA 1359
 Tyr Trp Lys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Lys Tyr Arg Ile Ile Pro Gly
 415 420 425

ATT TAT TGATTGTAAC GAAGTCTGTT GTTCTCATTT TCTACTTATT ACGTTAATTC 1415
 Ile Tyr
 430

GAACGTTGGA ATCATCAAAA GACCGAGCCA AAACAAAAT GCAAATTGAT GCGATAGACA 1475

TTCTTTTCT GAAAAA AAA A 1496

La secuencia de ADNc anterior que codifica una proteína que tiene 430 aminoácidos que corresponden a la secuencia presentada en la figura 3 (SEQ ID N° 2) es una secuencia de ADNc que se puede obtener por ejemplo por clonación en una levadura, a partir de un banco de expresión de *A. thaliana*, utilizando un método de cribado fundado en la aparición de una resistencia de la levadura a la nistatina, según las condiciones operatorias cuya descripción detallada se da más adelante.

El conocimiento de la secuencia nucleotídica SEQ ID N° 1 anterior permite reproducir la presente invención por métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo por síntesis química o por cribado de un banco genómico o de un banco de ADNc con ayuda de sondas de oligonucleótidos de síntesis por las técnicas de hibridación o por amplificación por PCR.

La invención tiene también por objeto una secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa y que se hibrida con la secuencia nucleotídica SEQ ID N° 1 en condiciones de rigurosidad media o elevada o que presenta una identidad de secuencia de aproximadamente 60 y más con esta secuencia.

Las secuencias que se hibridan de forma detectable con la secuencia SEQ ID N° 1, se hibridan en las condiciones estándar de rigurosidad media, por ejemplo una hibridación a 42°C, durante 12 horas en una solución de formamida al 50%, SSCX6 seguida de lavados o de rigurosidad menos elevada, por ejemplo una hibridación a 42°C durante 24 horas en una solución de formamida al 20%, SSCX6 seguida de lavados en las condiciones estándar conocidas (T. Maniatis *et al.*, Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

El porcentaje de identidad de secuencia nucleotídica se puede determinar utilizando por ejemplo el programa BLAST "basic local alignment search tool" (S. F. Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) sobre el servidor NCBI.

La invención se refiere también a una secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa y que es amplificable por la técnica de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos que codifican una secuencia de consenso que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 3:

Leu Leu Xaa Xaa Gly Trp Xaa Gly Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Tyr
 1 5 10 15

en la que Xaa en la posición 7 es Trp o Tyr y Xaa en la posición 12 es His o Lys asociados a un cebador oligo dT.

La secuencia SEQ ID N° 3 anterior corresponde a una secuencia de consenso nueva que ha sido definida por alineamiento de identidad de secuencias de aminoácidos entre la secuencia nueva SEQ ID N° 2, deducida de la secuencia nucleotídica SEQ ID N° 1, y las secuencias conocidas ya sean de otras esterol reductasas que tienen una especificidad de acción en una posición distinta de la posición C-7, o ya sean de receptores de la lámina B, como se detalla más adelante en la parte experimental. A partir de la información dada por la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 3, se puede definir y sintetizar un cebador constituido por más de 45 nucleótidos que, asociado a un segundo cebador oligo dT (17 nucleótidos) como secuencia de rebote, permitirá, con ayuda de un kit comercial de PCR (por ejemplo Stratagen) amplificar un ADN que codifica una proteína que tiene la actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa.

ES 2 339 833 T3

La invención se refiere también a una proteína de *A. thaliana* que tiene una actividad delta-5,7 estero1-delta-7 reductasa y que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2:

5	Met Ala Glu Thr Val His Ser Pro Ile Val Thr Tyr Ala Ser Met Leu	
	1 5 10 15	
10	Ser Leu Leu Ala Phe Cys Pro Pro Phe Val Ile Leu Leu Trp Tyr Thr	
	20 25 30	
15	Met Val His Gln Asp Gly Ser Val Thr Gln Thr Phe Gly Phe Phe Trp	
	35 40 45	
20	Glu Asn Gly Val Gln Gly Leu Ile Asn Ile Trp Pro Arg Pro Thr Leu	
	50 55 60	
25	Ile Ala Trp Lys Ile Ile Phe Cys Tyr Gly Ala Phe Glu Ala Ile Leu	
	65 70 75 80	
30	Gln Leu Leu Leu Pro Gly Lys Arg Val Glu Gly Pro Ile Ser Pro Ala	
	85 90 95	
35	Gly Asn Arg Pro Val Tyr Lys Ala Asn Gly Leu Ala Ala Tyr Phe Val	
	100 105 110	
40	Thr Leu Ala Thr His Leu Gly Leu Trp Trp Phe Gly Ile Phe Asn Pro	
	115 120 125	
45	Ala Ile Val Tyr Asp His Leu Gly Glu Ile Phe Ser Ala Leu Ile Phe	
	130 135 140	
50	Gly Ser Phe Ile Phe Cys Val Leu Leu Tyr Ile Lys Gly His Val Ala	
	145 150 155 160	
55	Pro Ser Ser Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly Asn Leu Ile Ile Asp Phe	
	165 170 175	
60	Tyr Trp Gly Met Glu Leu Tyr Pro Arg Ile Gly Lys Ser Phe Asp Ile	
	180 185 190	
65	Lys Val Phe Thr Asn Cys Arg Phe Gly Met Met Ser Trp Ala Val Leu	
	195 200 205	
	Ala Val Thr Tyr Cys Ile Lys Gln Tyr Glu Ile Asn Gly Lys Val Ser	
	210 215 220	

ES 2 339 833 T3

5 **Asp Ser Met Leu Val Asn Thr Ile Leu Met Leu Val Tyr Val Thr Lys**
 225 230 235 240

 Phe Phe Trp Trp Glu Ala Gly Tyr Trp Asn Thr Met Asp Ile Ala His
 245 250 255

 10 **Asp Arg Ala Gly Phe Tyr Ile Cys Trp Gly Cys Leu Val Trp Val Pro**
 260 265 270

 15 **Ser Val Tyr Thr Ser Pro Gly Met Tyr Leu Val Asn His Pro Val Glu**
 275 280 285

 Leu Gly Thr Gln Leu Ala Ile Tyr Ile Leu Val Ala Gly Ile Leu Cys
 20 290 295 300

 Ile Tyr Ile Lys Tyr Asp Cys Asp Arg Gln Arg Gln Glu Phe Arg Arg
 25 305 310 315 320

 Thr Asn Gly Lys Cys Leu Val Trp Gly Arg Ala Pro Ser Lys Ile Val
 325 330 335

 30 **Ala Ser Tyr Thr Thr Thr Ser Gly Glu Thr Lys Thr Ser Leu Leu Leu**
 340 345 350

 35 **Thr Ser Gly Trp Trp Gly Leu Ala Arg His Phe His Tyr Val Pro Glu**
 355 360 365

 Ile Leu Ser Ala Phe Phe Trp Thr Val Pro Ala Leu Phe Asp Asn Phe
 40 370 375 380

 Leu Ala Tyr Phe Tyr Val Leu Thr Leu Leu Leu Phe Asp Arg Ala Lys
 45 385 390 395 400

 Arg Asp Asp Asp Arg Cys Arg Ser Lys Tyr Gly Lys Tyr Trp Lys Leu
 405 410 415

 50 **Tyr Cys Glu Lys Val Lys Tyr Arg Ile Ile Pro Gly Ile Tyr**
 420 425 430

55 La invención tiene especialmente por objeto una proteína de *A. thaliana* que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa y que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2 anterior y que se denomina delta-7Red.

60 La invención se refiere también a una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa que tiene una secuencia de aminoácidos que presentan una identidad de secuencia de aproximadamente 60% y más con la secuencia SEQ ID N° 2.

El porcentaje de identidad se puede determinar por ejemplo utilizando el programa BLAST indicado anteriormente.

65 La invención se refiere igualmente a una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa y que tiene una reactividad inmunológica cruzada con la proteína de *A. thaliana* delta-7Red definida antes.

ES 2 339 833 T3

La proteína se puede detectar por ejemplo por inmuno-precipitación con ayuda de un antisuero dirigido contra la proteína delta-7Red, preparado según métodos conocidos.

Uno de los aspectos de la invención se refiere a una proteína que tiene una actividad delta 5,-7 esterol-delta-7 reductasa tal como la obtenida por expresión en una célula hospedadora que contiene una secuencia de ADN definida precedentemente y se refiere especialmente a una proteína de *A. thaliana* tal como la obtenida por expresión en una célula hospedadora que contiene una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2 anterior.

Cuando se obtiene la proteína de la invención por expresión en una célula hospedadora, ésta se realiza según los métodos de ingeniería genética y de cultivo celular conocidos por los expertos en la técnica.

La expresión se puede realizar en una célula hospedadora procariota, por ejemplo *E. coli* o en una célula hospedadora eucariota, por ejemplo una célula de mamífero, una célula de insecto o una levadura que contiene la secuencia que codifica la delta-7 Red de la invención precedida de un promotor conveniente.

La proteína recombinante obtenida puede ser glucosilada o no glucosilada.

La invención se refiere especialmente a una proteína según la invención tal como la obtenida por expresión en una levadura.

La invención se refiere también a un anticuerpo dirigido contra una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa definida precedentemente. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal preparado según los métodos conocidos por los expertos en la técnica.

La invención se refiere también a un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN definida precedentemente así como a una célula hospedadora transformada por este vector.

Los vectores de expresión son vectores conocidos que permiten la expresión de la proteína bajo el control de un promotor conveniente. Para las células procariotas, el promotor puede ser por ejemplo el promotor lac, el promotor trp, el promotor tac, el promotor β -lactamasa o el promotor PL. Para las células de mamíferos, el promotor puede ser por ejemplo el promotor SV40 o los promotores del adenovirus. También se pueden utilizar vectores de tipo Baculovirus para la expresión en células de insectos. Para las células de levadura, el promotor puede ser por ejemplo el promotor PGK, el promotor ADH, el promotor CYC1 o el promotor GAL10/CYC1.

Las células hospedadoras pueden ser células procariotas o células eucariotas. Las células procariotas son por ejemplo *E. coli*, *Bacillus* o *Streptomyces*. Las células hospedadoras eucariotas comprenden levaduras y hongos filamentosos así como células de organismos superiores, por ejemplo células de mamíferos o células de insectos. Las células de mamíferos pueden ser células CHO de hámster o células Cos de mono. Las células de insectos son por ejemplo células SF9. Las células de levadura pueden ser por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* o *Kluyveromyces lactis*.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de clonación de un ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa en un microorganismo, que comprende un método de cribado elegido entre

- la resistencia del microorganismo a la nistatina o a un compuesto análogo cuya toxicidad depende de la presencia de esteroides que tienen una insaturación en la posición C-7,
- la hibridación del ácido nucleico con la secuencia nucleotídica de la secuencia SEQ ID N° 1 anterior,
- la identificación del ácido nucleico por vía informática según el programa BLAST entre las secuencias de ADN aisladas al azar.

Por microorganismo, se entiende una levadura tal como por ejemplo *S. cerevisiae*, *S. pombe* o *K. lactis*.

Los compuestos análogos a la nistatina comprenden por ejemplo la anfotericina B o la filipina.

Por hibridación, se entiende una hibridación en condiciones de rigurosidad media o elevada según las condiciones estándar conocidas (T. Maniatis *et al.*, ya citado).

La identificación por vía informática se realiza según el programa BLAST indicado anteriormente.

Un ejemplo de procedimiento de clonación anterior en el que el método de cribado utiliza la resistencia a la nistatina en una levadura, se describe más adelante en la parte experimental.

La invención tiene especialmente por objeto una célula hospedadora, elegida entre una levadura o un hongo filamentoso, transformada por un vector que contiene una secuencia de ADN de la invención definida precedentemente.

ES 2 339 833 T3

Uno de los objetos de la invención se refiere también a un procedimiento de preparación de una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa en el que se cultiva una célula hospedadora transformada de la invención y se aísla la proteína expresada y se refiere particularmente a un procedimiento en el que la célula hospedadora es una levadura transformada en la que la secuencia de ADN codificadora está bajo el control de un promotor de levadura.

Uno de los objetos de la invención se refiere también a un procedimiento de reducción *in vitro* de un esterol insaturado en la posición C-7, en el que se incuba el esterol a reducir con la proteína obtenida por procedimiento anterior y se aísla eventualmente el esterol reducido obtenido.

Uno de los objetos de la invención se refiere también a un procedimiento de reducción *in vivo* de un esterol exógeno insaturado en la posición C-7, en el que se incuba el esterol con una célula hospedadora transformada de la invención y se aísla eventualmente el esterol reducido obtenido. La célula hospedadora puede ser una célula procariota o una célula eucariota, en particular una levadura o un hongo filamentoso.

Uno de los objetos de la invención se refiere también a un procedimiento de reducción *in vivo* de un esterol endógeno insaturado en la posición C-7, en el que se cultiva una cepa hospedadora transformada de la invención elegida entre una levadura o un hongo filamentoso y se aísla eventualmente el esterol reducido acumulado.

La invención se refiere particularmente a un procedimiento de reducción *in vitro* o *in vivo* definido antes, en el cual el esterol reducido obtenido es un sustrato de la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P₄₅₀SCC) y se refiere muy particularmente a un procedimiento de reducción *in vivo* en el cual el esterol endógeno a reducir es el ergosta 5,7 dien 3-ol, el ergosta 5,7,24(28) trien 3-ol o el ergosta 5,7,22 trien 3-ol o una mezcla de estos.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de producción de pregnenolona, en el cual se cultiva una célula hospedadora transformada de la invención elegida entre una levadura o un hongo filamentoso, se aísla eventualmente el esterol o los esteroides endógenos reducidos en la posición C-7 acumulados, se incuban los esteroides reducidos en presencia de P₄₅₀SCC, y eventualmente en presencia de adrenodoxina reductasa (ADR) y de adrenodoxina (ADX), y se aísla eventualmente la pregnenolona obtenida.

La invención tiene particularmente por objeto un procedimiento de producción de la pregnenolona definido antes en el que la célula hospedadora es una levadura.

La invención se refiere también a un procedimiento de producción de pregnenolona en el que se cultiva una levadura transformada por uno o varios vectores que permiten la coexpresión de una proteína que tiene la actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa y de P₄₅₀SCC y eventualmente de la ADR y de la ADX y se aísla eventualmente la pregnenolona libre o esterificada.

La invención se refiere particularmente al procedimiento anterior en el que se cultiva una levadura transformada que coexpresa una proteína que tiene la actividad delta-5,7 esterol delta-7 reductasa, el P₄₅₀SCC, la ADR y la ADX, muy particularmente el procedimiento anterior en el que la proteína que tiene la actividad delta-5,7 esterol delta-7 reductasa es la proteína de *A. thaliana* delta-7Red y especialmente el procedimiento anterior en el que la cepa de levadura es la cepa EC01/pCD63.

Ejemplos de producción de pregnenolona según la invención se dan más adelante en la parte experimental.

La levadura transformada utilizada para la realización del procedimiento de producción de pregnenolona anterior puede ser por ejemplo una levadura co-transformada por un vector de expresión de la invención que contiene una secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa y un vector de expresión del citocromo P₄₅₀SCC y eventualmente de la ADX y de la ADR. Los vectores de expresión del citocromo P₄₅₀SCC y/o de la ADX son conocidos y las preparaciones están descritas por ejemplo en la solicitud de patente europea EP 0340878 así como más adelante en la parte experimental.

La levadura transformada utilizada puede ser igualmente una levadura en la que la secuencia de ADN que codifica la proteína que tiene la actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa está integrada en un locus particular del genoma, por ejemplo en el locus ADE2 y en la que el ergosterol no es ya el esterol mayoritario en las condiciones de expresión de la delta-7 reductasa. La levadura "integrada" obtenida puede ser transformada a continuación por casetes de expresión integradas o por vectores de expresión que contienen una secuencia de ADN que codifica el citocromo P₄₅₀SCC y eventualmente la ADX y la ADR.

Un ejemplo de construcción de cepas de levadura que producen *in vivo* la pregnenolona o su éster acético se da más adelante en la parte experimental.

La invención tiene por tanto igualmente por objeto una cepa de levadura transformada que coexpresa una proteína que tiene la actividad delta-5,7 esterol delta-7 reductasa, el P₄₅₀SCC, la ADR y la ADX y que acumula pregnenolona libre o esterificada, particularmente una cepa de levadura anterior en la que la proteína que tiene la actividad delta-5,7 esterol delta-7 reductasa es la proteína de *A. thaliana* delta-7Red y especialmente una cepa de levadura denominada EC01/pCD63 cuya construcción detallada se da más adelante en la parte experimental.

La invención se extiende también a una secuencia de ADN humano tal como el obtenido según el procedimiento de clonación definido anteriormente, utilizada como sonda para diagnosticar una deficiencia congénita en delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa. La deficiencia en delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa comprende por ejemplo la deficiencia en 7-deshidrocolesterol reductasa responsable de tasas anormalmente bajas de colesterol en el plasma.

La invención se refiere igualmente a un método de detección de la deficiencia en delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa que comprende la incubación de una muestra que contiene ADN genómico humano con la sonda definida anteriormente en condiciones de hibridación estándar y la puesta en evidencia de la fijación o de la ausencia de fijación de la sonda al ADN genómico, la ausencia de fijación o la reducción de ésta lo que indica una deficiencia congénita en delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa.

El método de la invención puede permitir por ejemplo detectar una deficiencia congénita en delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa prenatal o en el recién nacido así como en los pacientes con afecciones variadas y especialmente en los pacientes que tienen las manifestaciones clínicas del síndrome RSH/SLO.

Las figuras anexas ilustran ciertos aspectos de la invención:

La figura 1 representa el perfil en esteroides totales extraídos a partir del clon F22 resistente a la nistatina obtenido por cribado del banco de *A. thaliana* en la levadura FY 1679. El análisis se hace por RP-HPLC a 205 nm o a 285 nm (figura 1A) o por CPG en comparación con la levadura FY1679 no transformada (figura 1B).

La figura 2 representa una carta de restricción del fragmento Not I del plásmido pF22 y la estrategia de secuenciación.

La figura 3 representa la secuencia nucleotídica del ADNc delta-7Red (SEQ ID N° 1) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID N° 2).

La figura 4 ilustra la medida *in vitro* de la actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa de una fracción microsomal de FY1679 transformada con el vector de expresión inducible "delta-7/V8". El análisis se hace por CPG y muestra la transformación del sustrato de 7-deshidrocolesterol (TR = 16,528) en colesterol (TR = 15,887) en presencia de los esteroides endógenos ergosta 5,22 dien 3-ol (TR = 16,682); ergosterol (TR = 17,249); ergosta 5-en 3-ol (TR = 17,664).

La figura 5 ilustra la producción de pregnenolona *in vitro* por escisión de ergosta 5-en 3-ol (fig. 5A); de ergosta 5,24(28) dien 3-ol (5B) o de ergosta 5,22 dien 3-ol (5C) purificada a partir de una levadura transformada que expresa la delta-7Red, e incubada después con P₄₅₀SCC, ADX y ADR. El análisis se hace por CPG en comparación con un testigo de escisión de colesterol (trazo lleno).

La figura 6 ilustra la construcción del plásmido integrativo pADΔ7 que permite la integración del ADNc que codifica la delta-7Red (esterol Δ7 reductasa) en el locus ADE2.

La figura 7 representa el análisis por CPG de los esteroides totales extraídos por saponificación alcalina de la cepa FY1679 y de la cepa integrada ELR01 cultivadas en presencia de galactosa.

La figura 8 esquematiza la construcción del vector bifuncional *E. coli-S. cerevisiae* V13 que contiene un sitio único SalI (Sa) en el sitio de clonación múltiple.

La figura 9 representa las etapas de la construcción de los plásmidos integrativos pCD62-1 y pCD62-2 que permiten insertar la casete de expresión ADR en la región intergénica de los genes *leu2* y *splitΔ*.

SCM1 y SCM2: sitios de clonación múltiples.

La figura 10 representa la estrategia de la construcción de la cepa CDR01.

La figura 11 representa las etapas de la construcción del plásmido de expresión pCD63 que contiene las dos casetes de expresión ADX y P₄₅₀SCC.

La figura 12 representa el análisis por CPG de los esteroides extraídos a partir de las células (lisado celular) o del medio de cultivo (medio) aisladas a partir de la cepa EC01/pCD63 después de una inducción por la galactosa de 9 h (figura 12a) o de 24 h (figura 12b).

La figura 13 representa la estructura del plásmido pTG 7457.

La figura 14 representa la estructura del plásmido pTG 7453.

La figura 15 representa la estructura del plásmido pTG 10014.

La figura 16 representa la estructura del plásmido pTG 10004.

La figura 17 representa la estructura del plásmido pTG 10031.

La figura 18 representa la estructura del plásmido pTG 10033.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, sin limitarla.

Ejemplo 1

Clonación de ADNc que codifica la delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa (delta-7Red) de A. thaliana

A - Cribado del banco de expresión de A. thaliana en la levadura

El banco de expresión de ADNc de partida es el banco descrito por M. Minet *et al.* (Plant J., 2, 417-422, 1992) que ha sido preparado a partir de ARNm de *A. thaliana* en fase de germinación en la fase de dos hojas y cuyos ADNc bordeados por el sitio Not I han sido insertados en el sitio Bst XI de la casete de expresión del vector bifuncional *E. coli*/S. *cerevisiae* pFL61. Esta casete contiene las secuencias del promotor y del terminador del gen de la fosfogliceratoquinasa (PGK). El origen de la replicación de la levadura derivada de la secuencia 2 μ y un marcador de selección URA3 aseguran la propagación del vector en la levadura. La propagación del vector en *E. coli* se deriva del plásmido pUC19.

La cepa de levadura FY 1679 (Mata), que es una cepa isogénica de la cepa S288C descrita por A. Thierry *et al.* (Yeast, 6, 521-534, 1990), ha sido transformada por el banco de ADNc utilizando el método del acetato de litio descrito por D. Gietz *et al.* (Nucleic Acids Res., 20, 1425, 1992).

Las células se han extendido sobre un medio sintético SGI que contiene 7 g/l de "base de nitrógeno para levaduras" (Difco), 1 g/l de bactocasaminoácidos (Difco), 20 g/l de glucosa, 20 mg/l de triptófano y que está desprovisto de uracilo. Se han obtenido 10⁵ transformantes prototrofos para el uracilo, después se han agrupado y se han extendido de nuevo sobre el mismo medio sintético desprovisto de uracilo y que contiene 2 o 5 μ g/ml de nistatina a razón de 5x10⁴ células por placa. Se han cribado así 10⁶ células para cada concentración de nistatina. Después de 3 días de incubación a 28°C, se han recuperado aproximadamente 100 clones, que han llegado hasta la concentración de 2 μ g/ml de nistatina, constituyendo los grupos de 5 clones cuya composición en esteroides ha sido analizada por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa (denominada RP-HPLC en el texto que sigue) mientras que se ha obtenido un solo clon resistente, denominado F22, a la concentración de 5 μ g/ml de nistatina.

B - Análisis de los esteroides acumulados en el clon F22

Los esteroides totales de la levadura se preparan según el método de saponificación alcalina descrito por L. Parks *et al.* (Methods in Enzymol., 111, 333-346, 1985), después se analizan por RP-HPLC y/o por cromatografía en fase gaseosa (denominada CPG).

El residuo de esteroides obtenido se disuelve en la mezcla etanol-tetrahidrofurano-agua (65:10:25 v/v) y después se analiza por RP-HPLC sobre una columna de sílice injertada C18 Applied Biosystems (100 x 2,1 mm) a un caudal de 1 ml/min y a 55°C con ayuda de un gradiente lineal de metanol en agua (50% a 100% en 18 min) y una detección fotométrica a 205 nm y 285 nm en comparación con los estándares de ergosterol, campesterol y colesterol.

La composición en esteroides se analiza también por CPG sobre una columna capilar SE-30 Alltech (30 m x 0,32 mm) con helio como gas portador, una temperatura de 280°C y 310°C para el inyector y el detector respectivamente, con un aumento inicial de la temperatura de 110°C a 245°C a la velocidad de 45°C/min, después de 3°C/min hasta alcanzar 280°C.

El análisis por RP-HPLC (figura 1A) y el análisis por CPG (figura 1B) muestran el perfil de los esteroides acumulados en el clon F22 obtenido anteriormente caracterizado por la desaparición casi completa del ergosterol, esteroide mayoritario de la cepa no transformada FY 1679, y su reemplazamiento por dos esteroides mayores y en cantidad análoga que no absorben a 285 nm y que no tienen una doble insaturación conjugada según el análisis por RP-HPLC.

En la figura 1A, el campesterol (Sigma) (24-R-ergosta 5-en 3-ol) contiene aproximadamente 35% de dihidrobrassicasterol (24-S-ergosta 5-en 3-ol).

C - Clonación del ADNc delta-7Red

Los plásmidos que provienen del clon F22 han sido amplificados en *E. coli* según el método descrito por J. N. Strathern *et al.* (Methods in Enzymol., 194, 319-329, 1991), y han sido digeridos después por Not I. Se ha obtenido un fragmento de 600 pares de bases (bp) aproximadamente y un fragmento de 1,6 kbp. La cepa FY1679 ha sido transformada con cada uno de los fragmentos anteriores respectivamente. La composición en esteroides de cada clon de levadura transformada ha sido analizada como se ha indicado anteriormente y ha permitido distinguir el plásmido que lleva el gen responsable del perfil modificado en esteroides. El plásmido así identificado se ha denominado pF22.

D - Determinación de la secuencia del ADNc delta-7Red

El inserto de ADNc de pF22 ha sido subclonado en el sitio Not I del vector pUC9N derivado de pUC9 (Pharmacia) en el cual el sitio Eco RI del sitio múltiple de clonación está reemplazado por la inserción de un sitio de restricción Not I conservando siempre la fase de lectura del gen LacZ. A continuación se ha determinado una carta de restricción (figura 2).

Los fragmentos de restricción que tienen el sitio externo Not I y los sitios internos EcoRI, PvuII o HindIII respectivamente, han sido subclonados en el plásmido pBluescript (Stratagen). La secuencia nucleotídica ha sido determinada por el método de Sanger con la ADN polimerasa Sequenase (kit Stratagen) sobre las dos cadenas utilizando los cebadores directo e inverso de pUC9, T3 y T7 de pBluescript o cebadores específicos deducidos de la secuencia nucleotídica del ADNc.

La compilación del conjunto de las secuencias obtenidas da la secuencia nucleotídica del ADNc delta-7Red de *A. thaliana* (SEQ ID N° 1) representada en la figura 3. Esta secuencia contiene 1496 nucleótidos que terminan por una secuencia de poliadenilación. Presenta una fase de lectura abierta que comienza por una metionina iniciadora en el nucleótido 76 y que termina por un codón de terminación en el nucleótido 1366. Resulta una fase de lectura abierta de 1290 nucleótidos que codifica una proteína de 430 aminoácidos. La región codificadora del ADNc delta-7Red codifica la proteína delta-7Red cuya secuencia deducida en aminoácidos (SEQ ID N° 2) se muestra en la figura 3. La secuencia de la proteína comprende 430 aminoácidos que tienen una masa molecular calculada de 49.286 kDa.

Una muestra de la cepa *E. coli* DH5-1 que contiene el ADNc delta-7Red en el vector pUC9N (denominado ADNc delta7red/pUC9N) ha sido depositada en la CNCM el 10 febrero de 1995 con el número I-1535.

E - Determinación de la secuencia de consenso SEQ ID N° 3

Por investigación informatizada en las bases de secuencias (Genbank y EMBL), se ha puesto en evidencia que la secuencia de la proteína delta-7Red de *A. thaliana* presenta ciertas similitudes de secuencia con otras esteroles reductasas, en particular la esteroles C-14 reductasa y la esteroles C-24(28) reductasa de *S. cerevisiae* descritas por R. T. Lorentz *et al.* (DNA Cell Biol., 11, 685-692, 1992) y W. Chen *et al.* (Yeast, 7, 305-308, 1991) respectivamente así como el producto del gen sts 1+ de *S. pombe* descrito por M. Shimanuki *et al.* (Mol. Biol. Cell, 3, 263-273, 1992) y de la esteroles C-14 reductasa de *Neurospora crassa* (N° X77955 en la base EMBL). Además, la proteína delta-7Red presenta una similitud con los 400 aminoácidos del extremo C-terminal del receptor de la lámina B de pollo y con la del receptor humano correspondiente descritos por H. J. Worman *et al.* (J. Cell Biol., 111, 1535-1542, 1990) y E. Schuler *et al.* (J. Biol. Chem., 269, 11312-11317, 1994).

Se han establecido alineaciones de identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2 deducida del ADNc delta-7Red obtenido anteriormente y las de las tres esteroles reductasas de levadura y de los dos receptores de la lámina B y después se ha definido una secuencia de consenso nueva que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N° 3):

Leu Leu Xaa Xaa Gly Trp Xaa Gly Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Tyr

1 5 10 15

en la que Xaa en la posición 7 es Trp o Tyr y Xaa en la posición 12 es His o Lys, para preparar los oligonucleótidos utilizables como cebadores para amplificar por PCR nuevas secuencias de ADN genómico o de ADNc que codifica una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esteroles-delta-7 reductasa.

F - Expresión de la proteína delta-7Red en la levadura

a) Construcción del vector de expresión delta-7/V8 inducible en la levadura

La delección de las regiones no codificadoras del ADNc de pF22 se ha efectuado por la técnica de amplificación PCR utilizando los oligonucleótidos específicos siguientes:

5'CGCGGATCCA TGGCGGAGAC TGTACATTC 3' (SEQ ID N° 4)

y

5'CAGGGTACCT CAATAAATTC CCGGAATG 3' (SEQ ID N° 5)

que han sido definidos para introducir un sitio de restricción BamH I inmediatamente corriente arriba del codón de iniciación y un sitio Kpn I inmediatamente corriente abajo del codón de terminación.

ES 2 339 833 T3

El ADNc ha sido amplificado a partir de 1 ng de plásmido “ADNc delta7red/pUC9N” en presencia de 2 unidades de Pfu DNA polimerasa y una concentración 0,2 μ M de cada uno de los cebadores anteriores utilizando las condiciones de amplificación siguientes: 94°C, 10 s; 52°C, 50 s; 74°C, 90 s; 33 ciclos con el kit PCR de Stratagen.

Se ha obtenido un fragmento de 1300 bp aproximadamente, y después se ha digerido por las enzimas de restricción BamH I y Kpn I y se ha insertado en los sitios BamH I y Kpn I del vector bifuncional *E. coli/S. cerevisiae* pYeDP1/8-2 (denominado V8) descrito por C. Cullin *et al.* (Gene, 65, 203-217, 1988). V8 lleva el marcador de selección URA3 y contiene una casete de expresión en la levadura que contiene el promotor GAL10/CYC1 y la secuencia terminadora del gen PGK. El vector así obtenido, denominado delta-7/V8, permite la expresión inducible por la galactosa de la proteína delta-7Red.

b) Producción de la proteína delta-7red

La cepa de levadura FY 1679 (Mata) ha sido transformada con el plásmido delta-7/V8 obtenido anteriormente utilizando el método del acetato de litio descrito por D. Gietz *et al.* (ya citado).

La levadura transformada ha sido cultivada a 27°C, en medio selectivo SGI descrito anteriormente pero en el cual la concentración de glucosa es de 5 g/l, hasta la obtención de una saturación de densidad celular ($DO_{600\text{ nm}} = 12$). El cultivo se diluye a continuación por adición de un volumen de medio completo YP (10 g/l en extracto de levadura (Difco) y 10 g/l en bactopectona (Difco)), y después adición de etanol (1,5% v/v) como fuente de carbono. Cuando el crecimiento ha permitido alcanzar una concentración celular de al menos 7×10^7 células/ml, la expresión de la delta-7Red ha sido inducida por adición de galactosa a la concentración de 20 g/l.

La inducción se ha realizado también en medio mínimo selectivo SLI, que corresponde al medio SGI en el cual la glucosa es reemplazada por la galactosa (20 g/l), hasta la obtención de una concentración celular de 2×10^7 células/ml.

c) Ensayo enzimático *in vitro* de la actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa

La expresión de la proteína delta-7Red ha sido puesta en evidencia utilizando un ensayo enzimático descrito por M. Taton *et al.* (Biochem. Bioph. Res. Commun., 181, 465-473, 1991) pero sin sistema de regeneración del NADPH, con preparaciones celulares microsomaes o citosólicas de la levadura inducida anteriormente.

Las fracciones celulares han sido obtenidas por pulverización mecánica de células inducidas y aislamiento de las fracciones por ultracentrifugación según el método descrito por P. Urban *et al.* (Eur. J. Biochem., 222, 843-850, 1994). Las células se recogen y después se lavan dos veces con el tampón TE-KCl (TrisHCl 50 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM, KCl 0,1 M) y se ponen en suspensión en el tampón de lisis TE-sorbitol 0,6 M. Se añaden perlas de vidrio de 0,45-0,5 mm de diámetro (Braun) hasta aflorar la superficie de la suspensión celular que se agita a continuación durante 5 min a 4°C. Se recupera el lisado celular en superficie y las perlas de vidrio se lavan tres veces con el tampón de lisis. El lisado y los lavados se reúnen y después se centrifugan a 20.000 g durante 13 min a 4°C de forma que se eliminan las fracciones mitocondriales. El sobrenadante recogido se centrifuga durante 1 h a 100.000 g y a 4°C. El residuo que contiene la fracción microsomal y el sobrenadante que representa la fracción citosólica se recogen por separado.

La fracción microsomal o la fracción citosólica obtenidas se incuban respectivamente durante 90 min a 37°C en el tampón Tris/HCl 100 mM a pH 7,3 que contiene como sustrato 7-deshidrocolesterol 150 μ M emulsionado con tween 80 (1,5 g/l) y en presencia de NADPH 2 mM. Los esteroides se extraen por adición de 3 volúmenes de mezcla metanol-diclorometano (50:50, v/v) y después se analizan en CPG en comparación con los productos estándar.

La formación de colesterol (TR = 15,887 mn) a partir de 7-deshidrocolesterol (TR = 16,528 mn) se muestra en la figura 4 con una fracción microsomal (3,5 mg/ml en proteína) obtenida anteriormente a partir de la levadura FY 1679 transformada con el vector delta-7/V8, inducida durante 3 h y cuyos esteroides endógenos tienen tiempos de retención superiores (TR = 16,682 min para el ergosta 5-22 dien 3-ol;

TR = 17,249 min para el ergosterol y TR = 17,664 min para el ergosta 5-en 3-ol).

Estos resultados demuestran que la proteína delta-7Red, por una parte es expresada en la levadura transformada, y por otra parte posee una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa.

Ejemplo 2

Reducción *in vivo* de esteroides endógenos de levadura insaturados en la posición C-7

Cepas de levadura cuyos esteroides mayoritarios tienen un doble enlace en la posición C-5,7 han sido transformadas con el vector delta-7/V8 obtenido en el ejemplo 1, después cultivadas e inducidas como se indica en el ejemplo 1. Los esteroides endógenos, cuyo perfil se analiza por CPG, han sido extraídos y purificados por RP-HPLC como se indica

ES 2 339 833 T3

en el ejemplo 1 utilizando una columna C18 preparativa (100 X 4,6 mm), y después identificados por IR, UV, SM y RMN. Las tres cepas siguientes han sido utilizadas respectivamente:

- La cepa FY1679 descrita en el ejemplo 1;

- La cepa mutante *erg5*, denominada PLC 1051, caracterizada por una deficiencia en esteroles C-22 desaturasa, que ha sido construida por cruce entre la cepa FY1679 y la cepa original *pol5* descrita por S. W. Molzahn *et al.* (J. Gen. Microbiol., 72, 339-348, 1972) y que acumula ergosta 5,7-dien 3-ol.

- La cepa doble mutante *erg4,5*, denominada PLC 1451, caracterizada por una deficiencia en esteroles C-22 desaturasa (*erg5*) y esteroles C-24(28) reductasa (*erg4*), ha sido obtenida por cruce entre la cepa FY1679 y una cepa *pol5* descrita por S. W. Molzahn *et al.* (ya citado) y ha adquirido una resistencia espontánea a la nistatina a lo largo de un cribado sistemático de levaduras a la búsqueda de mutantes de esteroides y que acumula ergosta 5,7,24(28) trien 3-ol. La cepa haploide resultante, que lleva la doble mutación *erg4, erg5*, crece en presencia de galactosa y de sustrato no fermentable y es auxotrofa para el uracilo, el triptófano y la histidina. Las cepas PLC 1051 y PLC 1451 han sido depositadas en la CNCM el 10 de febrero de 1995 con los números I-1536 y I-1537 respectivamente.

Los esteroides mayores reducidos identificados respectivamente a partir de las tres cepas transformadas anteriormente se indican en la siguiente tabla:

Cepa inicial	Esterol endógeno mayor inicial	Esterol endógeno mayor reducido en C-7
FY 1679	ergosta 5,7,22 trien 3-ol (ergosterol)	ergosta 5-en 3-ol (dihidrobrasicasterol) ergosta 5,22 dien 3-ol (brasicasterol)
<i>erg5</i> PLC 1051	ergosta 5,7 dien 3-ol	ergosta 5-en-3-ol
<i>erg4,5</i> PLC 1451	ergosta 5,7,24(28)trien -3-ol	ergosta 5,24(28) dienol (ostreasterol)

Ejemplo 3

Producción de pregnenolona *in vitro* por escisión de esteroides endógenos de levadura reducidos en C-7

La producción de pregnenolona se realiza utilizando el ensayo enzimático de escisión de la cadena lateral del colesterol *in vitro* descrito por Wada *et al.* (Arch. Biochem. Biophys., 290, 376-380, 1991) en el cual una concentración de 260 μ M de un esteroles reducidos en C-7 obtenido en el ejemplo 2 se incubaba en 150 μ l de tampón fosfato 10 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, tween 20 al 0,3% en presencia de adrenodoxina reductasa 140 nM, de adrenodoxina 1,16 μ M y de citocromo P₄₅₀SCC 0,68 μ M de origen bovino obtenidos a partir de glándulas suprarrenales por ejemplo según D. W. Seybert *et al.*, J. Biol. Chem., 254, 12088-12098, 1979.

La reacción se activa por adición de NADPH 150 μ M. Después de una incubación de 80 min a 37°C, la reacción se para por adición de un volumen de mezcla metanol-diclorometano (50:50 v/v). Los esteroides se extraen y se analizan por CPG como se indica en el ejemplo 1.

La figura 5 muestra respectivamente que el ergosta 5-en 3-ol (fig. 5A), el ergosta 5,24(28) dien 3-ol (fig. 5B) o el ergosta 5,22 dien 3-ol (fig. 5C) son sustrato del citocromo P₄₅₀SCC y conducen a un producto que tiene un TR idéntico al de la pregnenolona obtenida en las mismas condiciones por escisión del colesterol.

Los resultados obtenidos muestran que una levadura transformada que expresa la delta-7Red acumula esteroides utilizables directamente para preparar la pregnenolona por oxidación biológica *in vitro*.

ES 2 339 833 T3

Ejemplo 4

Construcción de cepas de levadura que producen in vivo la pregnenolona o su éster acético

- 5 A - Construcción de la cepa *ELR01* que contiene una casete de expresión para la delta-7Red de *A. thaliana* integrada en el locus *ADE2* de la cepa haploide *FY1679* tipo a (*FY1679* Mata)

a) Construcción del plásmido integrativo *pADdelta-7* (*pADA7*)

- 10 La construcción del plásmido *pADA7* ha sido dirigida como se describe en la figura 6. El fragmento *Bgl*III (2244pb) que contiene el gen *ADE2* de *S. cerevisiae* se ha aislado del plásmido *pASZ* 11 (A. Stotz *et al.*, gen, 95, 91, 1990) y se ha insertado en el vector *pBluescript*II KS+ (Stratagen) en el sitio *Bam*HI del sitio de clonación múltiple.

- 15 El plásmido obtenido, denominado *pBS-ADE2*, ha sido linealizado a continuación en su sitio *Stu* I único y desfosforilado.

Un fragmento de 2,44 kb aproximadamente que contiene el promotor *GAL10/CYC1*, la fase codificadora de la delta-7Red (esterol $\Delta 7$ reductasa) y el terminador *PGK* (*tPGK*) ha sido obtenido a partir del plásmido delta-7/V8, obtenido en el ejemplo 1F por la técnica de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos siguientes

- 20 5' GATTACGCCA AGCTTTTCGA AAC 3' (SEQ ID N° 6)

y

- 25 5' AGATCTTGAG AAGATGCGGC CAGCAAAAC 3' (SEQ ID N° 7)

- 30 que han sido definidos para aparearse respectivamente con el extremo 3' de *tPGK* y el extremo 3' del gen *URA3*. Se ha utilizado el plásmido delta-7/V8 como matriz (80 ng), los oligonucleótidos anteriores (0,5 μ M cada uno), la *Pfu* DNA polimerasa nativa (1 unidad en el tampón recomendado por Stratagen) y las condiciones de amplificación siguientes: 35 ciclos; 1 min a 95°C; 5 s a 95°C; 30 s a 56°C; 4 min 30 s a 70°C). El fragmento de amplificación obtenido se ha clonado a continuación con extremos romos en el plásmido *pBS-ADE2* linealizado anteriormente para dar el plásmido *pADA7* en el cual el fragmento *Not*I-*Pst*I de 4720 pb aproximadamente lleva el gen *ADE2* interrumpido por la casete de expresión de la delta-7Red.

- 35 b) Integración cromosómica en la cepa de levadura *FY1679* Mata

- 40 El fragmento *Not*I-*Pst*I (4720 bp), aislado a partir del plásmido *pADA7* digerido con las enzimas de restricción *Not*I y *Pst*I, ha sido introducido en la levadura *FY1679* Mata por transformación utilizando el método del acetato de litio descrito por D. Gietz *et al.* (ya citado).

- Los transformantes que tienen integrado este fragmento por recombinación homóloga han sido seleccionados por su resistencia a la nistatina, siendo debido este fenotipo a la expresión de la delta-7Red que convierte los delta-5,7 esteroides de la levadura en delta-5 esteroides.

- 45 Las células transformadas han sido incubadas a 28°C durante 4 horas en medio completo YP descrito en el ejemplo 1F que contiene glucosa (20 g/l) y suplementado con adenina (20 mg/l). Estas células se concentran a continuación, y después se extienden sobre un medio mínimo SLI-agar (1 g/l de bactocasaminoácidos; 7 g/l de "base de nitrógeno para levaduras"; 20 g/l de galactosa; 20 mg/l de adenina; 20 g/l de agar) y se incuban durante una noche a 28°C para inducir la expresión del gen de la delta-7Red. La ausencia de complementación de uracilo permite limitar el crecimiento de las células. Los clones han sido recuperados, agrupados y después extendidos en placas sobre un medio completo YP que contiene galactosa (20 g/l), suplementado con adenina (20 mg/l) y en presencia de concentraciones crecientes de nistatina (0 μ g/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 5 μ g/ml, 20 μ g/ml respectivamente). El 4° día, se han obtenido una veintena de clones que han llegado hasta la concentración de 5 μ g/ml de nistatina. Doce de estos clones han sido repetidos sobre las placas en medio mínimo WO (7 g/l de "base de nitrógeno para levaduras" sin aminoácidos, 20 g/l de glucosa) enriquecido en uracilo, leucina, triptófano, histidina y adenina (20 mg/l cada uno).

- 60 La auxotrofia para la adenina debida a la rotura del gen *ADE2* se ha confirmado a continuación observando la ausencia de crecimiento sobre el medio mínimo WO descrito anteriormente enriquecido en uracilo, leucina, triptófano, histidina pero desprovisto de adenina.

- La presencia de la casete de expresión en el genoma de la levadura ha sido controlada por amplificación por PCR a partir del ADN genómico de los clones obtenidos y utilizando los cebadores que tienen las secuencias SEQ ID N° 6 y SEQ ID N° 7 anteriores.

- 65 La funcionalidad del gen delta-7Red integrado ha sido confirmada por el análisis por CPG de la composición de esteroides acumulados en la levadura y extraídos por saponificación alcalina según el modo operatorio descrito en el ejemplo 1B con una columna capilar SE 30 de cinco metros (Alltech). El análisis muestra un perfil modificado que comprende los esteroides saturados en C-7 cuando los clones se cultivan en presencia de galactosa. La cepa obtenida,

ES 2 339 833 T3

denominada ELR01, acumula el ergosta 5 en 3-ol y el ergosta 5,22 dien 3-ol en lugar de ergosta 5, 7, 22 trien 3-ol (ergosterol), esteroide mayoritario de la cepa FY1679 inicial como se muestra en la figura 7.

La cepa ELR01 así construida expresa el gen de la delta-7Red cuando se cultiva en presencia de galactosa debido al hecho del control transcripcional por el promotor GAL10/CYC1. Aunque la unidad de expresión para la delta-7Red tenga el mismo sentido de transcripción que el gen ADE2, ninguna expresión de la delta-7Red es detectable por análisis de la composición en esteroides por CPG cuando se realiza el cultivo en presencia de glucosa, a consecuencia de la represión del promotor GAL10/CYC1.

B - Construcción de la cepa CDR01 que contiene una casete de expresión para la forma madura de la adrenodoxina reductasa bovina (ADRM) integrada entre los loci LEU2 y SPL1 de la cepa haploide FY1679 de apareamiento tipo alfa (mat alfa)

a) Construcción del vector bifuncional *E. coli-S. cerevisiae* V13

El vector V13 corresponde al vector V8 (C. Cullin *et al.*, ya citado) que lleva el marcador de selección URA3 y una casete de expresión en la levadura que contiene el promotor GAL10/CYC1 (pG/C) y en el cual un sitio SalI (Sa) suplementario ha sido introducido en el sitio de clonación múltiple, según el esquema de construcción dado en la figura 8.

El vector V8 ha sido digerido por las enzimas de restricción HindIII y BamHI y el fragmento BamHI-HindIII obtenido (1722 pb) que contiene el gen URA3 y el promotor GAL10/CYC1 (indicado más adelante como “ura-gal”), ha sido sub-clonado entre los sitios correspondientes del vector pUC18 (Pharmacia) digerido por las enzimas de restricción HindIII y BamHI.

El fragmento “ura-gal” ha sido amplificado a continuación por PCR a partir de 30 ng del plásmido obtenido pUC18/“ura-gal” desnaturalizado durante 30 s a 95°C utilizando las siguientes condiciones: 30 ciclos; 5 s a 86°C; 10 s a 95°C; 40 s a 38°C; 5 s a 55°C y 2 min a 74°C), 2 unidades de Taq DNA polimerasa (Boehringer) en el tampón del fabricante y concentración 1 μ M de cada uno de los cebadores que tienen las siguientes secuencias nucleotídicas:

5' GGGGATCCGT GGTCGACGTA ATTTAGTGTG TGTATTTGTG TTTGCG 3' (SEQ ID N° 8)

y

5' GTAAAACGAC GGCCAGT 3' (SEQ ID N° 9)

El cebador SEQ ID N° 8 contiene un sitio BamHI GGATCC idéntico al del fragmento “ura-gal”, 3 nucleótidos consecutivos en el sitio BamHI que no se hibridan a la matriz, un sitio SalI GTGAC y una secuencia homóloga a la del promotor GAL10/CYC1. El cebador SEQ ID N° 9 se aparea con la secuencia que precede al sitio Hind III del sitio de clonación múltiple de pUC18. El fragmento HindIII-BamHI de 1722 pb obtenido después de amplificación ha sido digerido por XhoI y Bam HI liberando un fragmento de 254 pb que contiene el promotor GAL10/CYC1 (pG/C) que ha sido sub-clonado a continuación en el vector V8 digerido por las enzimas de restricción BamHI y XhoI.

El vector V13 resultante contiene los sitios de restricción que permiten sub-clonar fácilmente los ADNc que codifican la adrenodoxina reductasa bovina madura (ADRM), la adrenodoxina bovina madura (ADXm) y el citocromo P₄₅₀SCC bovino.

A partir del vector V13, se han preparado respectivamente el vector V13-ADR, el vector V13-ADX y el vector V13-SCC10 de la forma siguiente:

α) Construcción del vector V13-ADR

Un fragmento SalI-KpnI de 1478 pb que lleva el ADNc que codifica ADRm ha sido aislado del plásmido pGBADR-2 descrito en el ejemplo 25 de la solicitud de patente europea EP 340878 y ha sido sub-clonado en los sitios correspondientes del vector V13 para dar el vector V13-ADR.

β) Construcción del vector V13-ADX

Un fragmento SalI BamHI de 390 pb que lleva el ADNc que codifica ADXm ha sido aislado del plásmido pGBADX-1 descrito en el ejemplo 23 de la solicitud de patente europea EP 340878 y ha sido sub-clonado en los sitios correspondientes del vector V13 para dar el vector V13-ADX.

γ) Construcción del vector V13-SCC10

Un fragmento SalI-EcoRI de 1554 pb que lleva el ADNc que codifica P₄₅₀SCC ha sido aislado del plásmido pGBSCC-10 descrito en el ejemplo 6 de la solicitud de patente europea EP 340878 y ha sido sub-clonado en los sitios correspondientes del vector V13 para dar el vector V13-SCC10.

ES 2 339 833 T3

b) Construcción de los plásmidos integrativos pCD62-1 y pCD62-2:

La construcción de los plásmidos pCD62-1 y pCD62-2 ha sido dirigida como se describe en la figura 9.

α) Construcción del plásmido pFL26CD

Un sitio NotI ha sido introducido en el plásmido pFL26 (N. Bonneaud *et al.*, Yeast, 7, 609-615, 1991), en la región intergénica que separa el gen leu2 del extremo 5' del gen spl1 (señalado como spl1Δ) (C. Kolman *et al.*, J. Bacteriol., 175, 1433, 1993) según el modo operatorio siguiente:

Dos fragmentos de ADN de 704 pb y 347 pb que llevan respectivamente el extremo 5' de leu2 y el extremo 3' de Spl1Δ han sido sintetizados por PCR con ayuda de cebadores que tienen las siguientes secuencias nucleotídicas:

5' TTGAAGGTTC AACATCAATT GATTG 3' (SEQ ID N° 10)

y

5' GTGTGGCGGC CGCCTCCTTG TCAATATTAA TGTTAAAG 3' (SEQ ID N° 11)

para la amplificación del fragmento de 704 pb y las secuencias nucleotídicas

5' CAAGGAGGCG GCCGCCACAC AAAAAGTTAG GTGT 3' (SEQ ID N° 12)

y

5' TCTGCTTCCC TAGAACCTTC TTATG 3' (SEQ ID N° 13)

para la amplificación del fragmento de 347 pb.

Los cebadores SEQ ID N° 11 y SEQ ID N° 12 poseen una secuencia GGCGGCCG que corresponde a un sitio NotI y en la que 3 bases no se aparean con la matriz. El cebador SEQ ID N° 10 se aparea con una secuencia situada 536 pb corriente arriba del codón de terminación de leu2 y el cebador SEQ ID N° 13 tiene una secuencia situada 194 pb corriente arriba del de spl1Δ.

Los fragmentos de 704 pb y de 347 pb son en primer lugar amplificados por PCR utilizando como matriz el plásmido pFL26 y como enzima la Pfu DNA polimerasa en las condiciones estándar descritas por el proveedor (Stratagen).

Los dos fragmentos amplificados obtenidos se aparean sobre 20 pb al nivel de los extremos generados por el cebador SEQ ID N° 11 (fragmento 704 pb) y el cebador SEQ ID N° 12 (fragmento 347 pb) a partir del extremo 5'; estos 20 pb corresponden respectivamente a los 20 primeros nucleótidos de cada uno de estos cebadores.

El producto resultante del apareamiento de los fragmentos de ADN de 704 pb (1 ng) y de 347 pb (2 ng) ha sido amplificado utilizando los cebadores SEQ ID N° 10 y SEQ ID N° 13 y las condiciones siguientes: 30 ciclos de 10 s a 95°C, 5 s a 60°C, 1 min a 45°C, 5 s a 65°C y 2 min a 72°C seguidos de un ciclo de 7 min a 72°C; 50 pmol de cada cebador y 1 unidad de Pfu DNA polimerasa en 50 μl de tampón de reacción (Stratagen). Se ha obtenido un fragmento amplificado de 1031 pb que contiene un sitio de corte NotI. Este fragmento ha sido digerido a continuación por las enzimas BstXI y NsiI y el fragmento de 920 pb obtenido, que contiene el sitio NotI, ha sido insertado en el lugar del fragmento BstXI-NsiI inicial de pFL26 para dar el plásmido pFL26CD, cuya carta se representa en la figura 9a.

β) Construcción del plásmido pCD60

- preparación del plásmido pDP10036:

Un fragmento Sall-BamHI de 390 pb que lleva el ADNc que codifica la adrenodoxina bovina madura (ADXm) se ha aislado del plásmido V13-ADX y después se ha sub-clonado en los sitios Sall-BglII del sitio de clonación múltiple del plásmido pTG10033 que está flanqueado por el promotor inducible GAL10/CYC1 y por el terminador ter PGK. El plásmido pTG10033, cuya carta está representada en la figura 18 y que corresponde al vector de expresión pTG10031 (figura 17), que contiene el promotor CYC1 y terPGK, en el cual el promotor CYC1 ha sido reemplazado por el promotor GAL10/CYC1 se ha preparado según el modo operatorio descrito más adelante.

El plásmido así obtenido, denominado pDP10034, lleva la casete de expresión ADX, es decir el gen que codifica ADXm bajo el control transcripcional de GAL10/CYC1 y terPGK. A continuación, el término "casete de expresión" será empleado para todo gen bajo la dependencia transcripcional de GAL10/CYC1 y terPGK.

Un fragmento HindIII de 3593 pb que lleva el marcador de selección URA3 y la casete de expresión ADR se ha aislado a partir del plásmido V13-ADR digerido por la enzima de restricción HindIII y después se ha insertado en

ES 2 339 833 T3

el sitio correspondiente del plásmido pDP10034 digerido por la enzima de restricción HindIII. El plásmido obtenido, denominado pDP10036, contiene las casetes de expresión ADX y ADR separadas una de la otra por el marcador URA3 (figura 9b).

5 - Preparación del plásmido pCD60:

El fragmento AflIII-AccI de 2770 pb que lleva la casete ADR se ha aislado por digestión parcial del plásmido pDP10036 con las enzimas de restricción AflIII y AccI, los extremos se han hecho romos por tratamiento con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I y se ha subclonado después de ligamiento de los extremos romos en el sitio SmaI del plásmido pBlue-Script KS+ (Stratagen). En el plásmido obtenido, denominado pCD60, la casete de expresión ADR está encuadrada de una y otra parte de un sitio NotI, situándose una parte a 209 pb corriente arriba del sitio de unión AflIII/SmaI y procedente del fragmento subclonado y la otra parte procedente del sitio de clonación múltiple (SCM1) de pBlue-Script KS+ (figura 9b).

15 γ) Construcción de los plásmidos pCD62-1 y pCD62-2

El fragmento NotI de 2558 pb, aislado a partir del plásmido pCD60 digerido por la enzima de restricción NotI, se ha subclonado a continuación en el sitio único NotI del plásmido pFL26CD. Según el sentido de la inserción del fragmento, se han obtenido dos plásmidos, denominados pCD62-1 y pCD62-2 (figura 9c).

En el plásmido pCD62-1, la casete de expresión ADR está orientada en el sentido de la transcripción del gen leu2 mientras que esta orientación está invertida en el plásmido pCD62-2.

El plásmido pCD62-1 ha sido retenido para las construcciones posteriores.

25 c) Integración cromosómica en la cepa de levadura FY1679 (Matalpha)

El plásmido pCD62-1 contiene regiones homólogas en un locus cromosómico de la cepa FY1679. Estas regiones corresponden respectivamente a los fragmentos BglII-ClaI de 1060 pb (A), EcoRI-NotI de 707 pb(B) y NotI-BglII de 602 pb (C) indicados en la figura 10.

La región correspondiente al fragmento ClaI-EcoRI de 486 pb del plásmido pCD62-1 ha sido suprimida en la cepa FY1679, lo que implica una auxotrofia de esta cepa frente a la leucina (cepa LEU2⁻) (R. S. Sikorski *et al.*, Genetics, 122, 19, 1989).

El plásmido pCD62-1 ha sido linealizado por digestión con la enzima de restricción XbaI cuyo sitio de corte está situado en el exterior de las regiones homólogas, después se ha introducido por transformación en la cepa FY1679 (Matalpha) utilizando el método del acetato de litio (D. Gietz *et al.*, ya citado).

La capacidad de reparación celular del ADN por la levadura ("gap repair") y la selección de recombinantes que tienen el fenotipo LEU2⁺ han permitido seleccionar en un primer tiempo dos tipos de recombinantes: el 1er tipo se obtiene después de recombinaciones homólogas al nivel de los fragmentos A y B, el 2º tipo se obtiene después de recombinaciones homólogas al nivel de los fragmentos A y C. Sólo este último tipo de recombinación ha permitido la integración de la casete de expresión ADR además de la restauración del fenotipo LEU2⁺.

Para seleccionar este 2º tipo de clon, se ha realizado un cribado por PCR utilizando el cebador SEQ ID N° 10 anterior y el cebador que tiene la secuencia nucleotídica siguiente:

5' TACATTAGGT CCTTTGTAGC 3' (SEQ ID N° 14)

de forma que se confirme a la vez la presencia y la localización correcta de la casete de expresión ADR en el genoma de la cepa FY1679 (Matalpha).

En este cribado, el cebador SEQ ID N° 14 se aparee exclusivamente con la secuencia codificadora de ADRm y el cebador SEQ ID N° 10 se aparee con una secuencia cromosómica (figura 10).

La reacción de amplificación se ha realizado utilizando como matriz el ADN genómico (20 ng) aislado de la cepa FY1679 (Matalpha) (C. Hoffman *et al.*, Gene, 57, 267, 1987), la Taq DNA polimerasa (1U, Boehringer), 50 pmol de cada cebador y 30 ciclos de PCR (10 s a 95°C, 1 min a 55°C, 3 min a 72°C) en las condiciones estándar descritas por el proveedor.

La amplificación ha llevado al aislamiento de un fragmento de 2,9 kb correspondiente al caso en que la casete de expresión ha sido integrada. En el caso contrario, ningún producto de amplificación ha sido detectado.

La cepa FY1679 (Matalpha) así seleccionada que contiene la casete de expresión ADR integrada ha sido denominada CDR01.

La expresión de ADR por esta cepa ha sido puesta en evidencia a partir de fracciones celulares citosólicas preparadas según el protocolo descrito en el ejemplo 1F, por inmunodetección de la proteína reconocida por los anticuerpos anti-ADR.

La funcionalidad de la ADR expresada por la cepa CDR01 ha sido confirmada en el ensayo de escisión enzimática de la cadena lateral del colesterol *in vitro* descrito en el ejemplo 3 y en el cual la ADR purificada (0,28 pmol) ha sido reemplazada por una fracción celular citosólica de la cepa CDR01 que contiene 100 µg de proteínas totales. Se ha observado una tasa de bioconversión del colesterol en pregnenolona de aproximadamente 25%, comparable a la obtenida con la ADR purificada.

C - Construcción de la cepa diploide EC01 que coexpresa la delta-7Red de *A. Thaliana* y la ADRm

La cepa diploide EC01 se ha obtenido por crecimiento de las cepas haploides CDR01 y ELR01 obtenidas anteriormente según el protocolo descrito por G. Sprague *et al.* (Methods in Enzymology, 194, 77, 1991):

Una primera selección sobre medio mínimo WO descrito precedentemente, enriquecido en uracilo, triptófano e histidina (20 mg/l de cada uno) pero desprovisto de leucina, ha permitido aislar los clones diploides LEU2⁺ (carácter de prototrofia que atestigua la presencia de la casete de expresión ADR). A continuación se han ensayado estos clones en cuanto a su resistencia a la nistatina a 5 µg/ml (carácter de resistencia que atestigua la presencia de la casete de expresión de la delta-7Red) sobre el medio sintético sólido SLI-agar descrito precedentemente.

Una cepa, denominada EC01, ha sido aislada así arbitrariamente entre los clones resistentes a la nistatina.

D - Construcción de la cepa EC01/pCD63 productora de pregnenolona y de pregnenolona 3-acetato

a) Construcción del plásmido de expresión pCD63

La construcción del plásmido pCD63 ha sido realizada como se describe en la figura 11.

El fragmento NotI de 4961 pb que contiene la casete de expresión ADX, el marcador de selección URA3 y la casete de expresión ADR se ha aislado a partir del plásmido pDP10036 preparado anteriormente y digerido con la enzima de restricción NotI y después clonado en el sitio NotI del sitio de clonación múltiple del plásmido pFL45L (N. Bonneaud *et al.*, Yeast, 7, 609, 1991). El vector así obtenido, denominado pDP10037 está representado en la figura 11.

Por una parte, el plásmido pDP10037 ha sido linealizado por digestión con la enzima Tth111I cuyo sitio de corte se sitúa en el gen que codifica ADRm.

Por otra parte, un fragmento PvuII-EcoRV de 3476 pb que contiene la casete de expresión P₄₅₀SCC y el extremo 5' del marcador URA3 ha sido purificado a partir del plásmido V13-SCC10 obtenido precedentemente y digerido con las enzimas de restricción PvuII y EcoRV.

Los dos ADN lineales respectivamente obtenidos tienen regiones homólogas que corresponden por una parte al extremo 5' del gen URA3 y a GAL10/CYC1, por otra parte a ter PGK como está representado en la figura 11a.

Estos dos fragmentos se han introducido a continuación en la cepa de levadura FY1679 (Mata) por co-transformación por el método del acetato de litio (D. Gietz *et al.*, ya citado).

La selección siguiente de recombinantes prototrofos para el uracilo y el triptófano (URA3⁺, TRP1⁺), ha permitido aislar clones en los que la rotura de la doble hebra generada por digestión por la enzima de restricción Tth111I ha sido reparada a consecuencia de la integración de la casete de expresión P₄₅₀SCC por recombinación homóloga.

La selección de los recombinantes (URA3⁺, TRP1⁺) se ha realizado sobre el medio mínimo WO enriquecido en leucina, histidina y leucina (20 mg/l de cada uno) pero desprovisto de uracilo y de triptófano. A partir de 50 clones reunidos, se ha extraído el ADN total por el método descrito por C. Hoffman *et al.*, (Gene, 57, 267, 1987), y después se ha introducido por electroporación en la cepa de *E. coli* XL1-Blue (Stratagen). Los clones transformados por el plásmido generado por "gap repair" se han seleccionado sobre el medio rico LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%) que contiene 50 mg/l de ampicilina. A partir de uno de los clones seleccionados, el plásmido, denominado pCD63, se ha extraído según el método descrito por J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. El plásmido pCD63 obtenido contiene las casetes de expresión ADX y P₄₅₀SCC separadas por el marcador de selección URA3, como se representa en la figura 11b.

b) Transformación de la cepa EC01 por el plásmido pCD63

El plásmido pCD63 se ha introducido en la cepa EC01 obtenida anteriormente por transformación por el método del acetato de litio (D. Gietz *et al.*, ya descrito). La levadura transformada se ha cultivado a continuación sobre el medio mínimo WO descrito precedentemente y desprovisto de uracilo, de triptófano, de adenina y de leucina pero suplementado con histidina (20 mg/l).

ES 2 339 833 T3

Se ha aislado así la cepa, denominada EC01/pCD63. Una muestra de la cepa, bajo la referencia EC01/pCD63, ha sido depositada en la CNCM el 10 de febrero de 1995 con el número I-1538.

c) *Producción in vivo de pregnenolona y de pregnenolona 3-acetato*

Se ha cultivado la cepa EC01/pCD63 a 28°C en aerobiosis (130 t/min) en un Erlenmeyer de 3 litros hasta que alcanza la fase estacionaria de crecimiento (DO600 = 12 a 13) en el medio selectivo SGI descrito en el ejemplo 1A y en el cual la concentración en glucosa es de 5 g/l. Se ha diluido a continuación el cultivo por adición de un volumen del medio completo YP descrito anteriormente, y después adición de etanol (0,5% v/v) como fuente de carbono. Cuando se ha alcanzado una nueva fase estacionaria de crecimiento (DO600 = 12 a 13), se añade al cultivo galactosa (20 g/l), en forma de solución concentrada (500 g/l), para inducir simultáneamente la expresión de los genes que codifican ADXm, ADRm, P₄₅₀SCC y delta-7 Red que están respectivamente bajo el control del promotor GAL10/CYC1.

La co-expresión de los cuatro genes ha sido puesta en evidencia por análisis de los esteroides acumulados respectivamente en las células y en el sobrenadante del cultivo según el siguiente modo operativo:

Se recogen muestras de 50 ml de cultivo después de 9 h y 24 h de inducción. Se centrifuga cada muestra (4000 g, 10 min, 4°C) para separar las células del medio de cultivo.

Por una parte, se lisan las células por pulverización mecánica en presencia de perlas de vidrio según el método indicado en el ejemplo 1F. A partir del lisado así obtenido, se extraen a continuación los esteroides intracelulares por adición de un volumen de hexano.

Por otra parte, los esteroides presentes en el medio de cultivo se extraen directamente por adición de un volumen de hexano.

La composición de los esteroides extraídos se analiza por CPG como se indica en el ejemplo 1, en comparación con los productos estándar.

Los resultados obtenidos después de 9 horas o después de 24 horas de inducción se muestran respectivamente en la figura 12a y en la figura 12b.

Después de 9 horas de inducción, la figura 12a muestra:

- en el lisado celular, la presencia de un compuesto mayoritario que tiene un tiempo de retención idéntico al del acetato de pregnenolona estándar (TR = 11,8 mn) mientras que solamente un pico muy débil está presente en el tiempo de retención de la pregnenolona (TR = 9,9 mn). Cantidades pequeñas de esteroides endógenos de la levadura reducidos en C-7 (ergosta 5-en 3-ol y ergosta 5,22 dien 3-ol) son identificadas respectivamente a TR = 18 mn y TR = 17 mn. La saponificación alcalina del lisado celular antes del análisis lleva a la presencia de un compuesto mayoritario que migra conjuntamente con la pregnenolona. Esto permite confirmar que el compuesto acumulado que tiene un TR de 11,8 mn corresponde al acetato de pregnenolona.
- en el medio de cultivo, la ausencia significativa de pregnenolona o de su acetato.

Después de 24 horas de inducción, la figura 12b muestra:

- en el lisado celular, la presencia de pequeñas cantidades de pregnenolona (TR = 10,2 mn) y de acetato de pregnenolona (TR = 12 mn) así como de esteroides endógenos de la levadura reducidos (TR = 17 mn y TR = 18 mn). El colesterol (TR = 16,2 min) es un estándar interno añadido antes de la extracción.
- en el medio de cultivo, la presencia mayoritaria de acetato de pregnenolona y de una cantidad menor de pregnenolona.

Experimentos realizados en paralelo con la cepa EC01 transformada por un plásmido control tal como pFL45L ya citado, no han mostrado ningún pico correspondiente a la pregnenolona libre o en forma acetato.

La identificación de los esteroides así realizada muestra que la cepa de levadura EC01/pCD63 ha acumulado la pregnenolona y el acetato de pregnenolona en ausencia de toda fuente de esteroides exógenos, después de inducción en presencia de galactosa con una producción mayor después de una inducción de 9 horas.

Estos resultados demuestran por una parte la movilización eficaz de los esteroides endógenos reducidos en la posición C-7 de la cepa EC01 y por otra parte la extrema eficacia de acoplamiento de la reacción de corte de la cadena lateral de los esteroides endógenos.

TABLA RECAPITULATIVA DE LAS CEPAS INTEGRADAS.

Cepas	Locus de integración	Gen integrado	Plásmido formante	Marcador plasmídico	Gen o genes sobre plásmido	Marcadores de selección
CDR01 (Mata)	intergénico LEU2-SPL1	ADRM	-	-	-	HIS3, URA3, TRP1
ELR01 (Mata)	ADE2	delta-7Red	-	-	-	ADE2, URA3, LEU2, HIS3, TRP1
EC01 (diploide)	intergénico LEU2-SPL1 + ADE2	ADRM delta-7Red	-	-	-	HIS3, URA3, TRP1
EC01/pCD63	intergénico LEU2-SPL1 + ADE2	ADRM delta-7Red	pCD63	URA3 TRP1	ADXm P450SCC	HIS3

ES 2 339 833 T3

Preparación del ejemplo 4: construcción del plásmido pTG10033

1. Derivado de pUC19 que tiene un nuevo sitio de clonación múltiple

5 El vector de clonación M13mp19 (C. Yanish-Peron *et al.*, Gene, 33, 103, 1985) ha sido mutagenizado utilizando el siguiente oligonucleótido

5' GCGCTCAGCG GCCGCTTTCC AGTCG 3' SEQ ID N° 15

10 para introducir un sitio NotI en la secuencia del gen lacI truncado y dar el plásmido M13TG724.

Un “polilenlazador” que contiene los sitios EcoRI, SnaBI y NotI se ha introducido a continuación en el sitio EcoRI del plásmido M13TG724 utilizando los siguientes oligonucleótidos

15 5' AATTGCGGCC GCGTACGTAT G 3' SEQ ID N° 16

y

20 5' AATTCATACG TACGCGGCCG C 3' SEQ ID N° 17

para dar el plásmido M13TG7244 en el cual se ha observado una modificación del inserto durante la fase de amplificación. El inserto del plásmido M13TG7244 tiene la secuencia nucleotídica siguiente

25 GAATTCATACGTACGCGGCCGCAATTGCGGCCGGTACGTATAATTCACTGGCCGT

en la que los sitios EcoRI, SnaBI y NotI están señalados y la secuencia lacZ de pUC19 está en cursiva.

30 Después de digestión del plásmido M13TG7244 por las enzimas de restricción EcoRI y SstI, se ha introducido un “polienlazador” que contiene los sitios MluI y AvrII utilizando los siguientes oligonucleótidos

5' CAACGCGTCC TAGG 3' SEQ ID N° 18 y

35 5' AATTCCTAGG ACGCGTTGAG CT 3' SEQ ID N° 19.

Después de digestión con la enzima PvuII, el fragmento PwII obtenido ha sido subclonado en pUC19 (C. Yanish-Perron *et al.* ya citado) para dar el plásmido pTG7457 (figura 13).

40

2. Sub-clonación del terminador PGK

Se ha digerido el pUC19 con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y se ha introducido un nuevo “polienlazador” BamHI SstI utilizando los oligonucleótidos siguientes

45

5' GATCCGCAGA TATCATCTAG ATCCCGGGTA GAT 3' SEQ ID N° 20,

50 5' AGAGCTCAAG ATCTACCCGG GATCTAGATG ATATCTGCG 3' SEQ ID N° 21,

5' CTTGAGCTCT ACGCAGCTGG TCGACACCTA GGAG 3' SEQ ID N° 22

y

55 5' AATTCTCCTA GGTGTCGACC AGCTGCGT 3' SEQ ID N° 23.

El plásmido pTG7453 se ha obtenido así (figura 14) y después se ha digerido a continuación por las enzimas de restricción BamHI y SstI. Los sitios del “polienlazador” entre BamHI y SstI se han introducido en un derivado del plásmido pTG7457 obtenido anterior y se han digerido por las enzimas de restricción BamHI y SstI. El nuevo plásmido obtenido contiene los sitios PvuII, HindIII, BamHI, EcoRI, XbaI, SmaI, BglII, SstI (=SacI), MluI, AvrII, EcoRI, SnaBI, NotI, SnaBI, PvuI.

60

Este nuevo plásmido se ha digerido por las enzimas de restricción BglII y HindIII y se ha insertado en éste un fragmento BglII-HindIII que contiene el promotor PGK (R. A. Hitzeman *et al.*, Nucleic Acids Res., 10, 7791, 1982; G. Loison *et al.*, Yeast, 5, 497, 1989) para dar el plásmido pTG10014 (figura 15).

65

3. Sub-clonación de promotores

a) el promotor *CYC1*

Los sitios del “polienlazador” entre BamHI y SstI del plásmido pTG7453 han sido introducidos en un derivado del plásmido pTG7457 como se ha indicado anteriormente. El nuevo plásmido obtenido ha sido escindido por la enzima de restricción SnaBI, y después se ha introducido el fragmento RsaI-DraI de 456bp del plásmido pEMBL8 (L. Dente *et al.*, Nucleic Acid Res., 11, 1645, 1983) que contiene el origen de replicación del fago f1 para dar el plásmido pTG7503.

El fragmento BamHI HindIII de 0,78 kb del plásmido pGBSCC-9, preparado en el ejemplo 6 de la solicitud de patente europea EP 0340378 y que contiene el promotor *CYC1* de *S. cerevisiae*, un “polienlazador” y el terminador lactasa de *K. lactis*, ha sido sub-clonado en el plásmido pTG7503 digerido con las enzimas de restricción HindIII y BamHI para dar el plásmido pTG10004 (figura 16).

Los sitios XhoI y MluI del promotor *CYC1* se han eliminado a continuación por mutagénesis dirigida del ADN de doble hebra del plásmido pTG10004 utilizando el siguiente oligonucleótido

5' GCGGATCTGC TCGAAGATTG CCTGCGCGTT GGGCTTGATC 3' SEQ ID N° 24.

El plásmido pTG10005 así obtenido se ha digerido a continuación por las enzimas de restricción SalI y XhoI y después se ha introducido un sitio MluI utilizando los siguientes oligonucleótidos

5' TCGACGGACG CGTGG 3' SEQ ID N° 25

y

5' TCGACCACGC GTCC 3' SEQ ID N° 26

para dar el plásmido pTG10006.

b) el promotor *GAL10/CYC1*

El plásmido pYeDP1/8-2 (C. Cullin *et al.*, Gene, 203, 1988) ha sido abierto con la enzima de restricción XhoI. Los extremos cohesivos creados se han llenado con ayuda del fragmento de Klenow de la ADN polimerasa y después se ha realizado de nuevo la ligadura del plásmido. El plásmido pTG10010 así obtenido en el cual el promotor *GAL10/CYC1* no contiene el sitio XhoI se utiliza como matriz para una amplificación por PCR.

4. Construcción del vector de expresión pTG10031

La parte restante de la secuencia codificadora de lacZ ha sido eliminada en el plásmido pTG7503 por mutagénesis dirigida utilizando el siguiente oligonucleótido

5' TGGCCGTCGT TTTACTCCTG CGCCTGATGC GGTAT 3' SEQ ID N° 27

para dar el plásmido pTG7549.

El promotor LacZ presente en el plásmido pTG7549 ha sido delecionado a continuación utilizando los siguientes oligonucleótidos

5' GGCCGCAAAA CCAAA 3' SEQ ID N° 28

5' AGCTTTTGGT TTTGC 3' SEQ ID N° 29

que se insertan en el plásmido previamente digerido por las enzimas de restricción NotI y HindIII y que restauran los dos sitios para dar el plásmido pTG7553.

Un fragmento BamHI MluI que contiene el promotor *CYC1* ha sido obtenido a partir del plásmido pTG10006 digerido por las enzimas de restricción BamHI y MluI y un fragmento MluI HindIII que contiene el promotor PGK ha sido aislado a partir del plásmido pTG10015 digerido por las enzimas de restricción MluI y HindIII. Estos dos fragmentos han sido ligados y el producto de la ligadura obtenido se ha insertado en el plásmido pTG7553 previamente digerido por las enzimas de restricción MluI y HindIII.

ES 2 339 833 T3

El siguiente oligonucleótido

5' GATCTATCGA TGCGGCCGCG 3'

SEQ ID N° 30

5 hibridado con el siguiente oligonucleótido

5' CGCGCGCGGC CGCATCGATA 3'

SEQ ID N° 31,

10 que constituye un “enlazador” BamHI MluI que contiene los sitios ClaI y NotI, se ha añadido y ligado para dar el vector de expresión pTG 10031 (figura 17).

15 El fragmento amplificado por PCR obtenido anteriormente a partir del plásmido pYeDP1/8-2 ha sido digerido con las enzimas de restricción ClaI y SalI y después ha sido introducido en el plásmido pTG10031 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción para dar el plásmido pTG10033 (figura 18).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ácido nucleico que contiene una secuencia que codifica una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa, que presenta una identidad de secuencia de aproximadamente 60% y más con la secuencia SEQ ID N° 1.

2. La secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico es un ADN o un ARN.

3. La secuencia de ADN según la reivindicación 1, en la que la secuencia codificadora codifica una proteína de *A. thaliana* que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa y que tiene la secuencia nucleotídica de la secuencia SEQ ID N° 1.

4. Una secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa y que es amplificable por la técnica de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos que codifican una secuencia de consenso que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 3:

Leu	Leu	Xaa	Xaa	Gly	Trp	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr
1				5				10					15	

en la que Xaa en la posición 7 es Trp o Tyr y Xaa en la posición 12 es His o Lys asociados a un cebador oligo dT.

5. Una proteína de *A. thaliana* que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa y que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2.

6. La proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa que tiene una secuencia de aminoácidos que presentan una identidad de secuencia de aproximadamente 60% y más con la secuencia SEQ ID N° 2.

7. La proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa tal como la obtenida por expresión en una célula hospedadora que contiene una secuencia de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

8. La proteína de *A. thaliana* que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa tal como la obtenida por expresión en una célula hospedadora que contiene una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2.

9. La proteína según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que la célula hospedadora es una levadura.

10. Un anticuerpo dirigido contra una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.

11. Un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

12. La célula hospedadora transformada por un vector según la reivindicación 11.

13. El procedimiento de clonación de un ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa en un microorganismo que comprende un método de cribado elegido entre:

- la resistencia del microorganismo a la nistatina o a un compuesto análogo cuya toxicidad depende de la presencia de esteroides que tienen una insaturación en la posición C-7,
- la hibridación del ácido nucleico con la secuencia nucleotídica de la secuencia SEQ ID N° 1.

14. La célula hospedadora transformada según la reivindicación 12, en la que la célula hospedadora es una levadura o un hongo filamentoso.

15. Un procedimiento de preparación de una proteína que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa, en el que se cultiva una célula hospedadora transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 14 y se aísla la proteína expresada.

16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el cual la célula hospedadora es una levadura transformada en la que la secuencia de ADN codificadora está puesta bajo el control de un promotor de levadura.

ES 2 339 833 T3

17. Un procedimiento de reducción *in vitro* de un esteroide insaturado en la posición C-7, en el que se incubaba el esteroide a reducir con la proteína obtenida según la reivindicación 15 o la reivindicación 16 y se aísla eventualmente el esteroide reducido obtenido.

18. Un procedimiento de reducción *in vivo* de un esteroide exógeno insaturado en la posición C-7, en el que se incubaba el esteroide con una célula hospedadora transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 14 y se aísla eventualmente el esteroide 10 reducido obtenido.

19. El procedimiento de reducción *in vivo* de un esteroide endógeno insaturado en la posición C-7, en el que se cultiva una cepa hospedadora transformada según la reivindicación 14 y se aísla eventualmente el esteroide reducido acumulado.

20. El procedimiento de reducción *in vitro* o *in vivo* según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que el esteroide reducido obtenido es un sustrato de la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P₄₅₀SCC).

21. El procedimiento de reducción *in vivo* según la reivindicación 20, en el que el esteroide endógeno a reducir es el ergosta 5,7 dien 3-ol, el ergosta 5,7,24(28) trien 3-ol o el ergosta 5,7,22 trien 3-ol o una mezcla de estos.

22. Un procedimiento de producción de pregnenolona, en el que se cultiva una célula hospedadora transformada según la reivindicación 14, se aísla eventualmente el esteroide o los esteroides endógenos reducidos en la posición C-7 acumulados, se incuban los esteroides reducidos en presencia de P₄₅₀SCC, y eventualmente de adrenodoxina reductasa (ADR) y de adrenodoxina (ADX), y se aísla eventualmente la pregnenolona obtenida.

23. El procedimiento según la reivindicación 22, en el que la célula hospedadora es una levadura.

24. Las células de levaduras transformadas que expresan una delta-5,7 esteroide-delta-7 reductasa.

25. La cepa de levadura transformada que coexpresa una proteína que tiene la actividad delta-5,7 esteroide-delta-7 reductasa, el P₄₅₀SCC, la ADR y la ADX y que acumula pregnenolona libre o esterificada.

26. La cepa de levadura según la reivindicación 25, en la que la proteína que tiene la actividad delta-5,7 esteroide-delta-7 reductasa es la proteína de *A. thaliana* delta-7Red.

27. La cepa de levadura según la reivindicación 26, denominada BC01/pCD63 depositada en la CNCM el 10 de febrero de 1995 con el número I-1538.

28. Un procedimiento de producción de pregnenolona, en el que se cultiva una levadura transformada por uno o varios vectores que permiten la coexpresión de una proteína que tiene la actividad delta-5,7 esteroide-delta-7 reductasa y de P₄₅₀SCC, y eventualmente de la ADR y de la ADX, y se aísla eventualmente la pregnenolona libre o esterificada.

29. Un procedimiento de producción de pregnenolona en el que se cultiva una levadura según la reivindicación 24.

30. El procedimiento según la reivindicación 29, en el que la proteína que tiene la actividad delta-5,7 esteroide-delta-7 reductasa es la proteína de *A. thaliana* delta-7Red.

31. El procedimiento según la reivindicación 30, en el que la cepa de levadura es la cepa ECOI/pCD63, depositada en la CNCM el 10 de febrero de 1995 con el número I-1538.

32. Un método de detección de la deficiencia en delta-5,1 esteroide-delta-7 reductasa que comprende la incubación de una muestra que contiene el ADN genómico humano con una sonda según una de las reivindicaciones 1 a 4, en condiciones de hibridación estándar y la puesta en evidencia de la fijación o de la ausencia de fijación de la sonda al ADN genómico, la ausencia de fijación o la reducción de ésta lo que indica una deficiencia congénita en delta-5,7 esteroide-delta-7 reductasa.

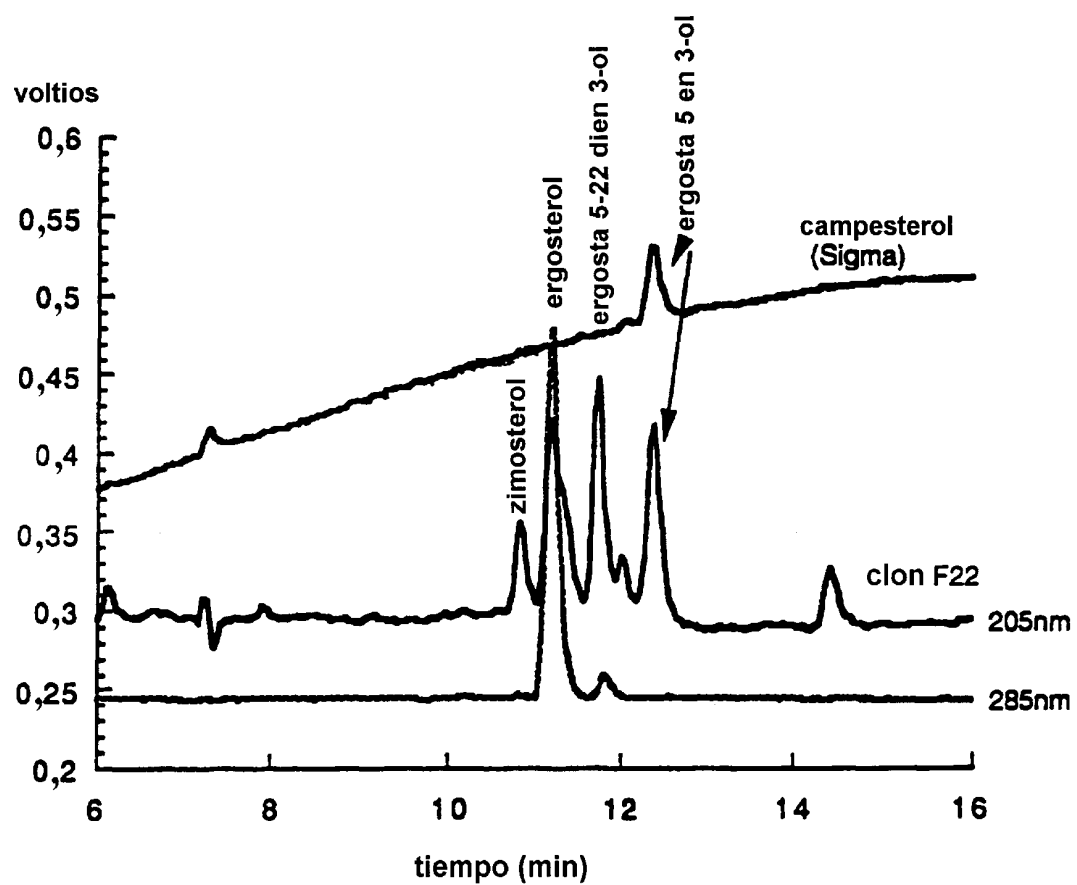


FIGURA 1a

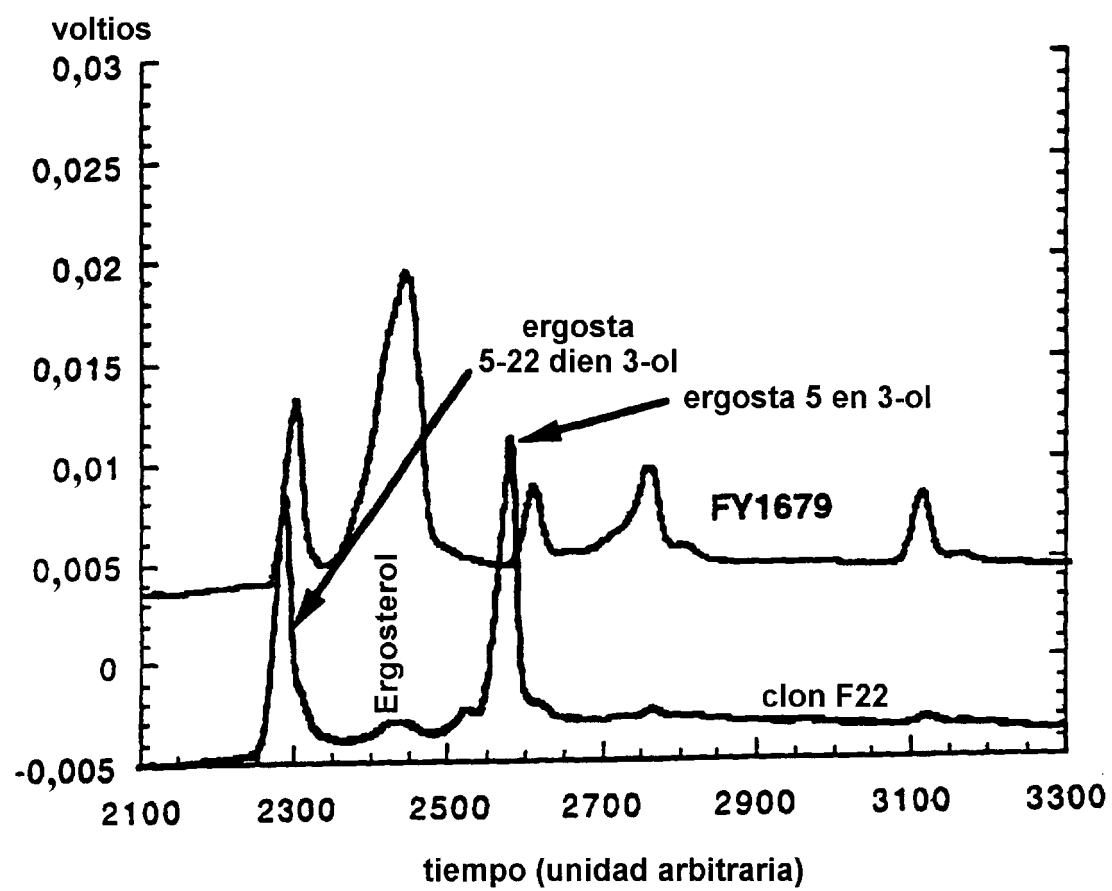


FIGURA 1b

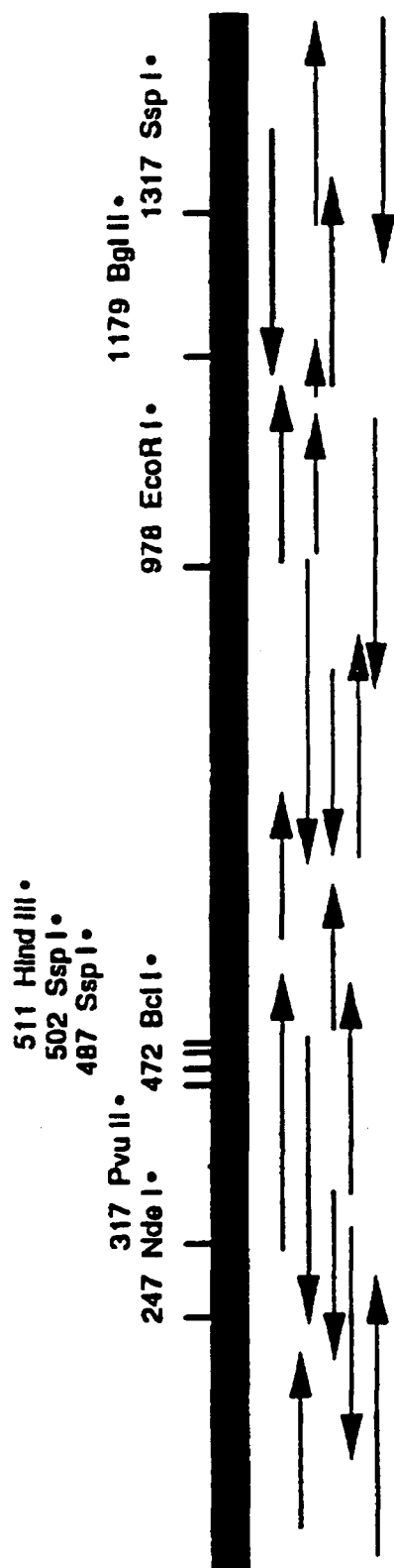


FIGURA 2

GTGTGAGTAA	TTTAGGTCAA	CACAGATCAG	AATCTGAGGC	TTTGGCCGAG	ACGAAGAGAA	60
AAGCAGAAGA AGAAA ATG GCG GAG ACT GTA CAT TCT CCG ATC GTT ACT TAC						111
Met Ala Glu Thr Val His Ser Pro Ile Val Thr Tyr						
1	5	10				
GCA TCG ATG TTA TCG CTT CTC GCC TTC TGT CCA CCT TTC GTC ATT CTC						159
Ala Ser Met Leu Ser Leu Leu Ala Phe Cys Pro Pro Phe Val Ile Leu						
15	20	25				
CTA TGG TAC ACA ATG GTT CAT CAG GAT GST TCT GTT ACT CAG ACC TTT						207
Leu Trp Tyr Thr Met Val His Gln Asp Gly Ser Val Thr Gln Thr Phe						
30	35	40				
GGC TTC TTT TGG GAG AAT GGA GTT CAA GGA CTT ATC AAC ATA TGG CCA						255
Gly Phe Phe Trp Glu Asn Gly Val Gln Gly Leu Ile Asn Ile Trp Pro						
45	50	55	60			
AGA CCC ACT TTG ATT GCT TGG AAA ATT ATA TTT TGC TAT GGA GCA TTT						303
Arg Pro Thr Leu Ile Ala Trp Lys Ile Ile Phe Cys Tyr Gly Ala Phe						
65	70	75				

FIGURA 3a

GAA GCT ATT CTT CAG CTG CTT CTG CCT GGT AAA AGA GTT GAG GGT CCA	351
Glu Ala Ile Leu Gln Leu Leu Leu Pro Gly Lys Arg Val Glu Gly Pro	
80	85
	90
ATA TCT CCA GCC GGA AAC CGA CCA GTT TAC AAG GCC AAT GGT CTG GCT	399
Ile Ser Pro Ala Gly Asn Arg Pro Val Tyr Lys Ala Asn Gly Leu Ala	
95	100
	105
GCT TAC TTT GTG ACA CTA GCA ACC CAT CTT GGT CTT TGG TGG TTT GGA	447
Ala Tyr Phe Val Thr Leu Ala Thr His Leu Gly Leu Trp Trp Phe Gly	
110	115
	120
ATC TTC AAC CCT GCA ATT GTC TAT GAT CAC TTG GGT GAA ATA TTT TCG	495
Ile Phe Asn Pro Ala Ile Val Tyr Asp His Leu Gly Glu Ile Phe Ser	
125	130
	135
GCA CTA ATA TTC GGA AGC TTC ATA TTT TGT GGT TTG TTG TAC ATA AAA	543
Ala Leu Ile Phe Gly Ser Phe Ile Phe Cys Val Leu Leu Tyr Ile Lys	
145	150
	155
GGC CAT GTT GCA CCT TCA TCA AGT GAC TCT GGT TCA TGT GGT AAC CTA	591
Gly His Val Ala Pro Ser Ser Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly Asn Leu	
160	165
	170

FIGURA 3b

ATA ATT GAC TTC TAT TGG GGC ATG GAG TTG TAC CCT CGA ATT GGT AAG	639
Ile Ile Asp Phe Tyr Trp Gly Met Glu Leu Tyr Pro Arg Ile Gly Lys	
175 180 185	
AGC TTT GAC ATC AAG GTG TTT ACT AAT TGC AGA TTC GGA ATG ATG TCT	687
Ser Phe Asp Ile Lys Val Phe Thr Asn Cys Arg Phe Gly Met Met Ser	
190 195 200	
TGG GCA GTT CTT GCA GTC ACG TAC TGC ATA AAA CAG TAT GAA ATA AAT	735
Trp Ala Val Leu Ala Val Thr Tyr Cys Ile Lys Gln Tyr Glu Ile Asn	
205 210 215 220	
GGC AAA GTA TCT GAT TCA ATG CTG GTG AAC ACC ATC CTG ATG CTG GTG	783
Gly Lys Val Ser Asp Ser Met Leu Val Asn Thr Ile Leu Met Leu Val	
225 230 235	
TAT GTC ACA AAA TTC TTC TGG TGG GAA GCT GGT TAT TGG AAC ACC ATG	831
Tyr Val Thr Lys Phe Phe Trp Trp Glu Ala Gly Tyr Trp Asn Thr Met	
240 245 250	
GAC ATT GCA CAT GAC CGA GCT GGA TTC TAT ATA TGC TGG GGT TGT CTA	879
Asp Ile Ala His Asp Arg Ala Gly Phe Tyr Ile Cys Trp Gly Cys Leu	
255 260 265	

FIGURA 3c

GTG TGG GTG CCT TCT GTC TAC ACT TCT CCA GGC ATG TAC CTT GTG AAC	927
Val Trp Val Pro Ser Val Tyr Thr Ser Pro Gly Met Tyr Leu Val Asn	
270 275 280	
CAC CCC GTC GAA CTC GGA ACT CAG TTG GCA ATA TAC ATT CTC GTT GCA	975
His Pro Val Glu Leu Gly Thr Gln Leu Ala Ile Tyr Ile Leu Val Ala	
285 290 295 300	
GGA ATT CTG TGC ATT TAC ATA AAG TAT GAC TGT GAT AGA CAA AGG CAA	1023
Gly Ile Leu Cys Ile Tyr Ile Lys Tyr Asp Cys Asp Arg Gln Arg Gln	
305 310 315	
GAG TTC AGG AGG ACA AAC GGG AAA TGT TTG GTT TGG GGA AGA GCC CCG	1071
Glu Phe Arg Arg Thr Asn Gly Lys Cys Leu Val Trp Gly Arg Ala Pro	
320 325 330	
TCA AAG ATT GTG GCG TCG TAT ACT ACA ACA TCT GGT GAA ACT AAA ACT	1119
Ser Lys Ile Val Ala Ser Tyr Thr Thr Thr Ser Gly Glu Thr Lys Thr	
335 340 345	
AGT CTT CTC TTA ACG TCT GGA TGG TGG GGA TTG GCT CGT CAT TTC CAT	1167
Ser Leu Leu Leu Thr Ser Gly Trp Trp Gly Leu Ala Arg His Phe His	
350 355 360	

FIGURA 3d

FIGURA 3e

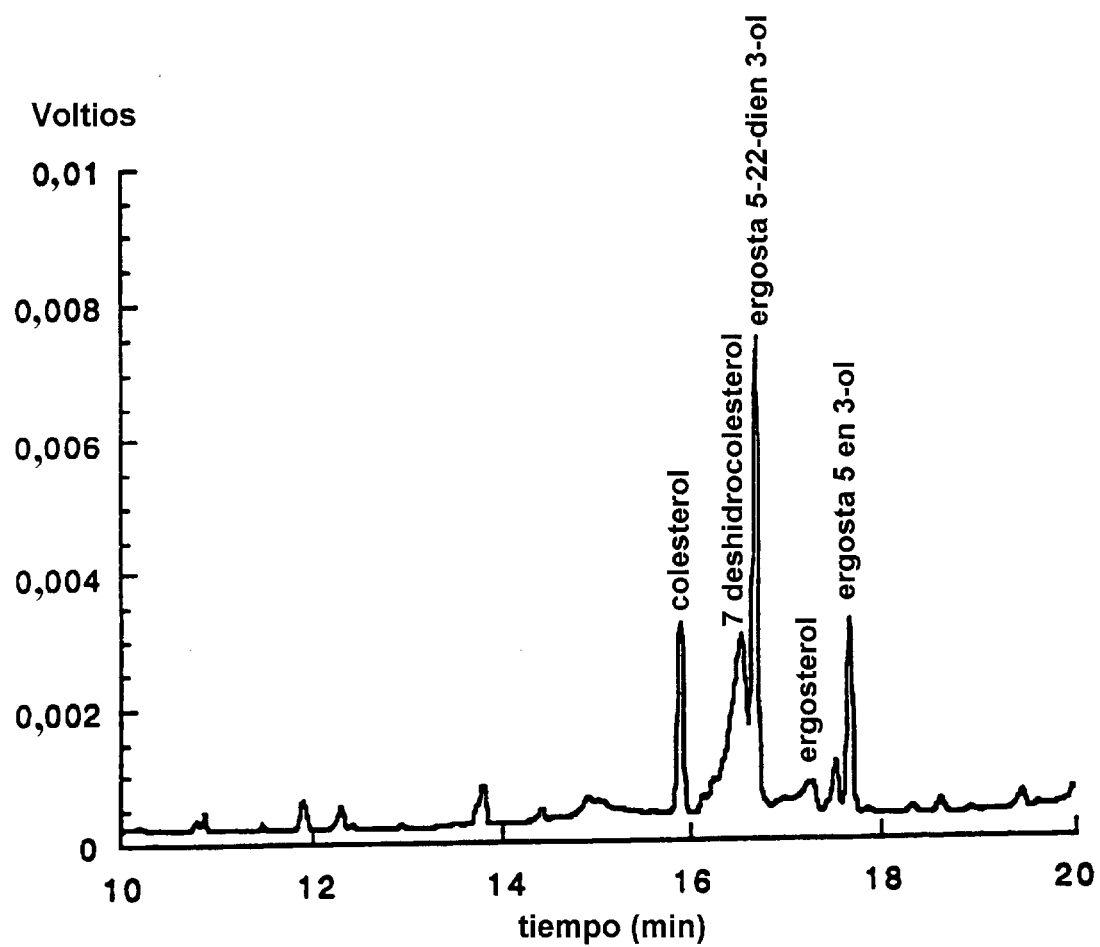


FIGURA 4

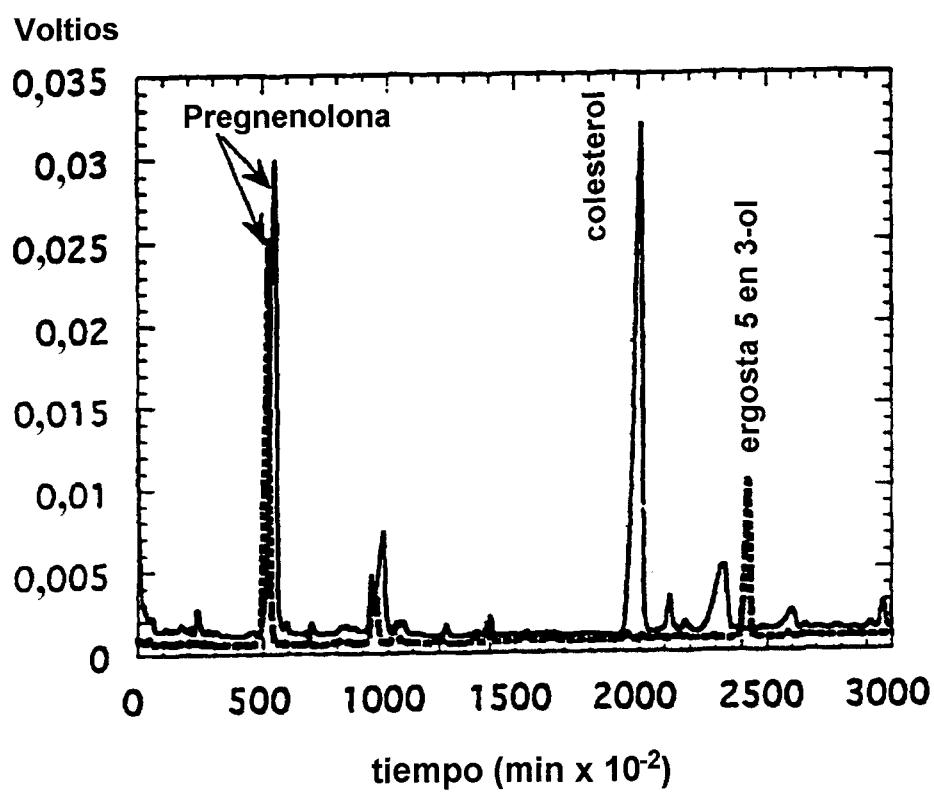


FIGURA 5a

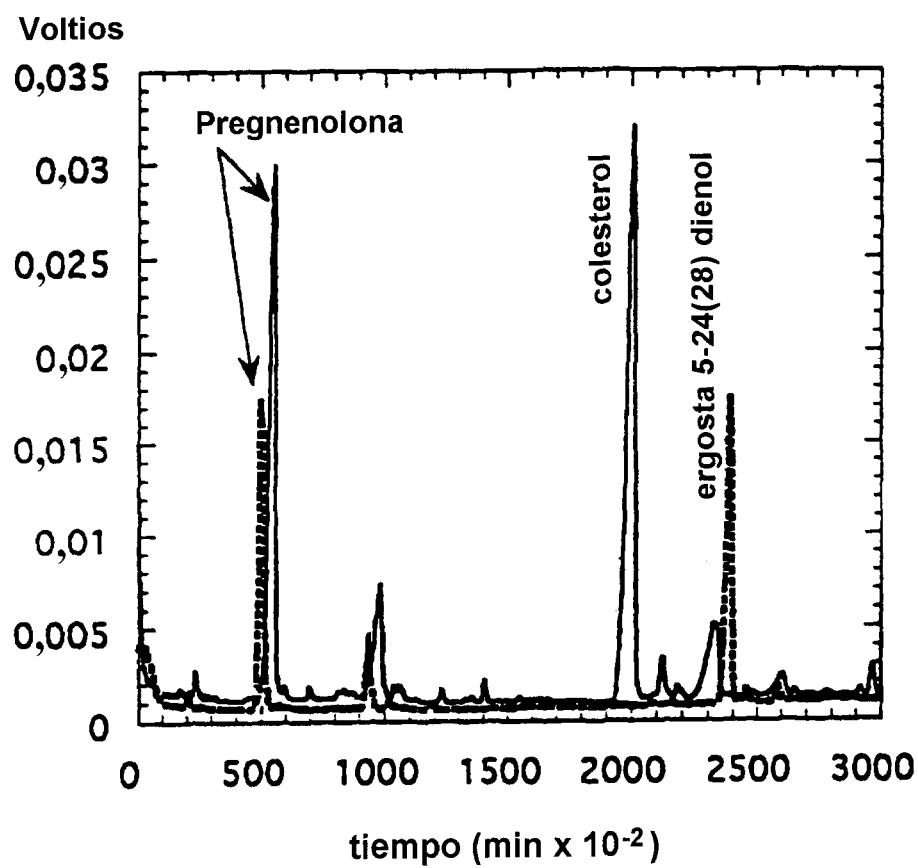


FIGURA 5b

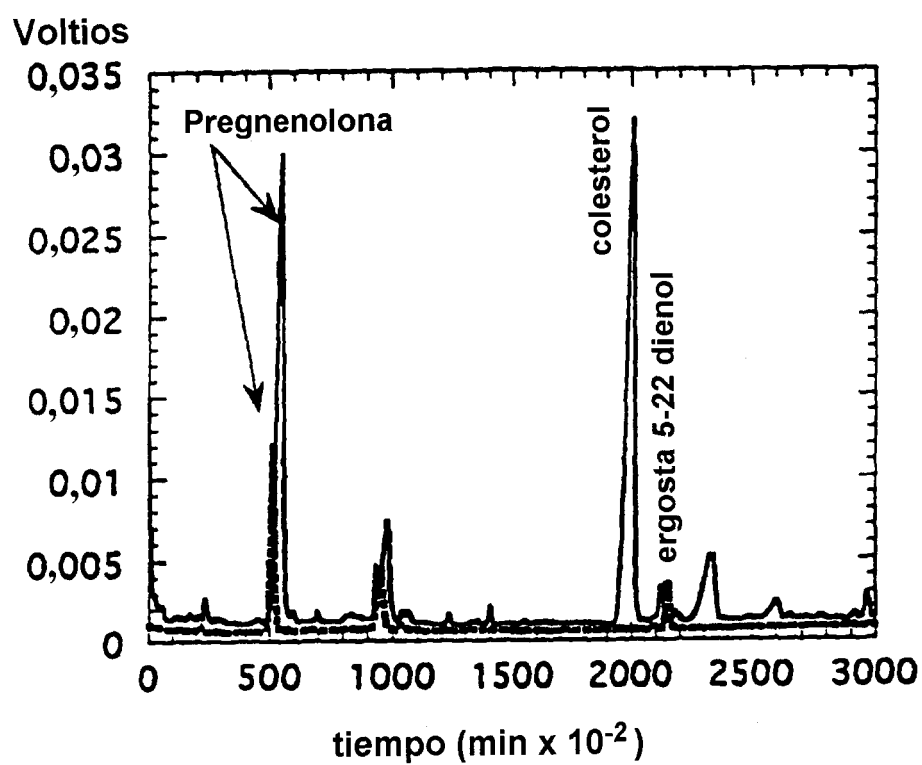


FIGURA 5c

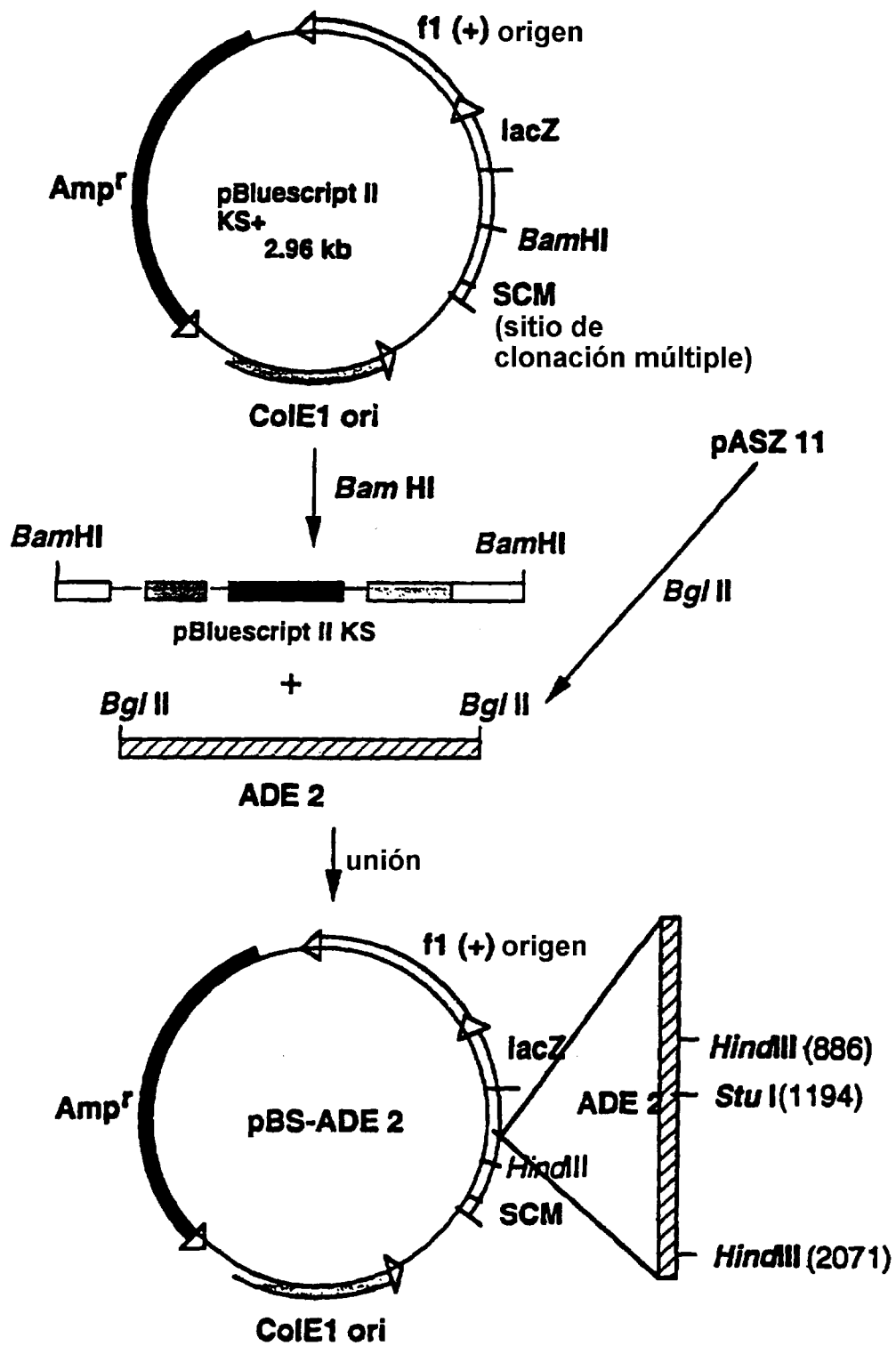


FIGURA 6a

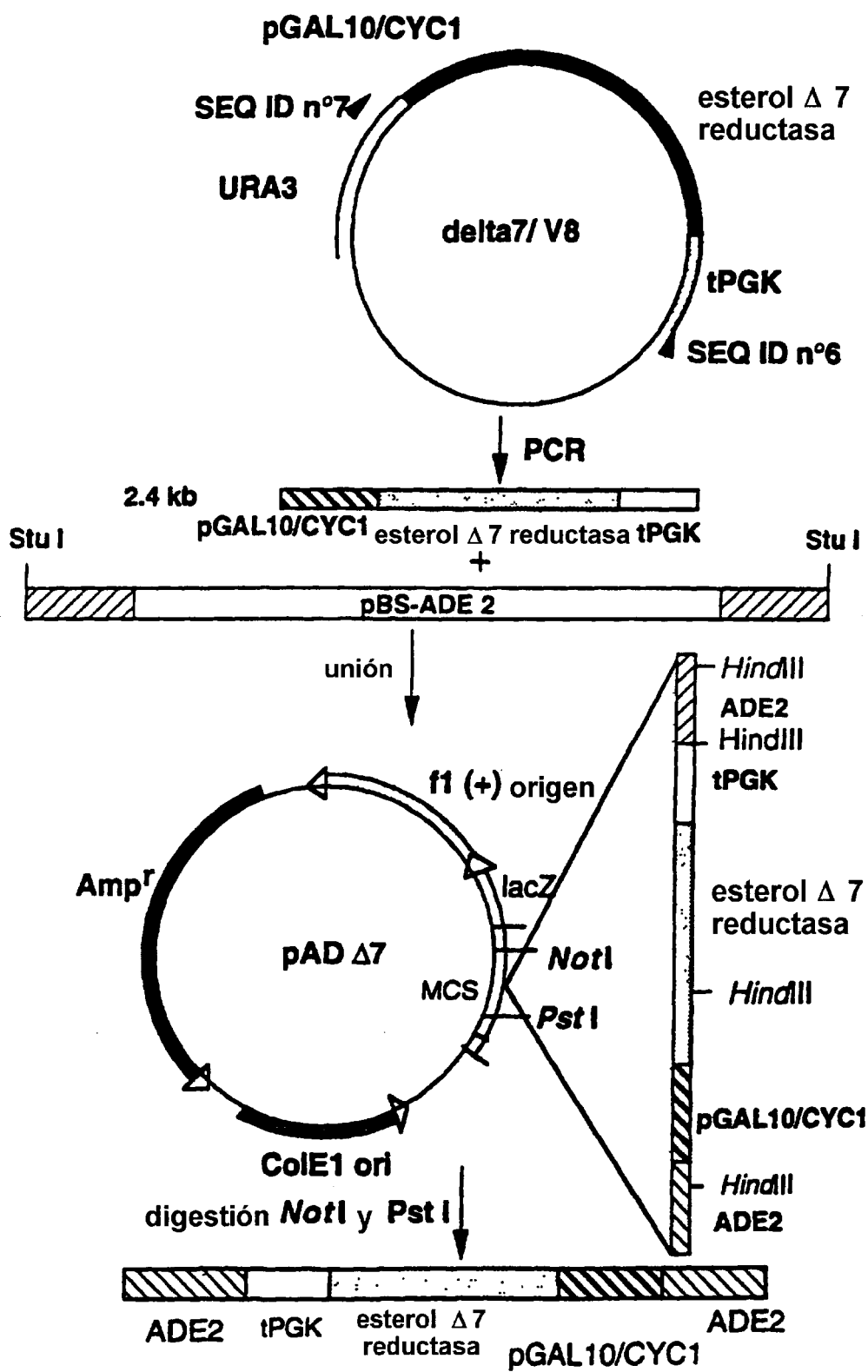


FIGURA 6b

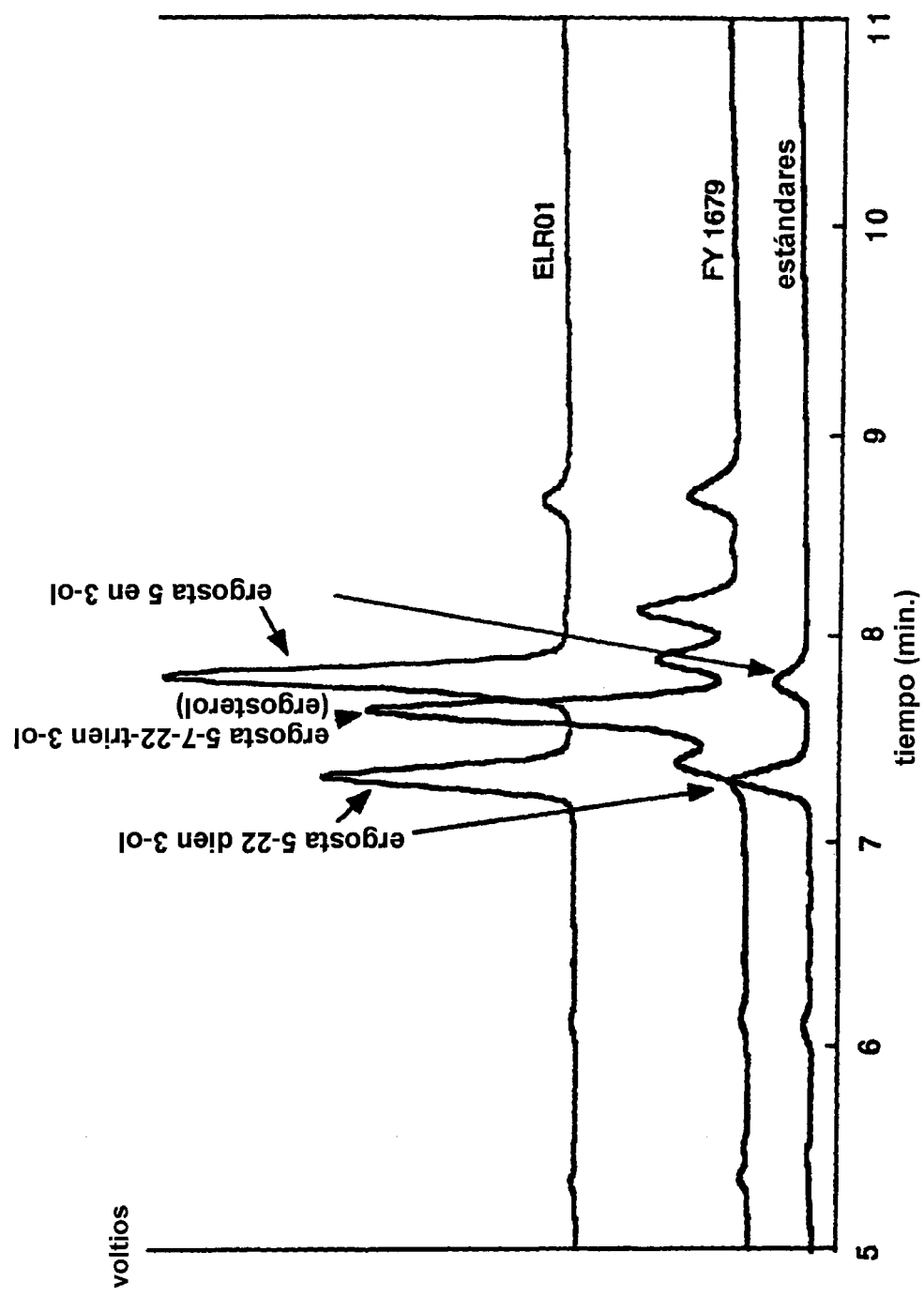


FIGURA 7

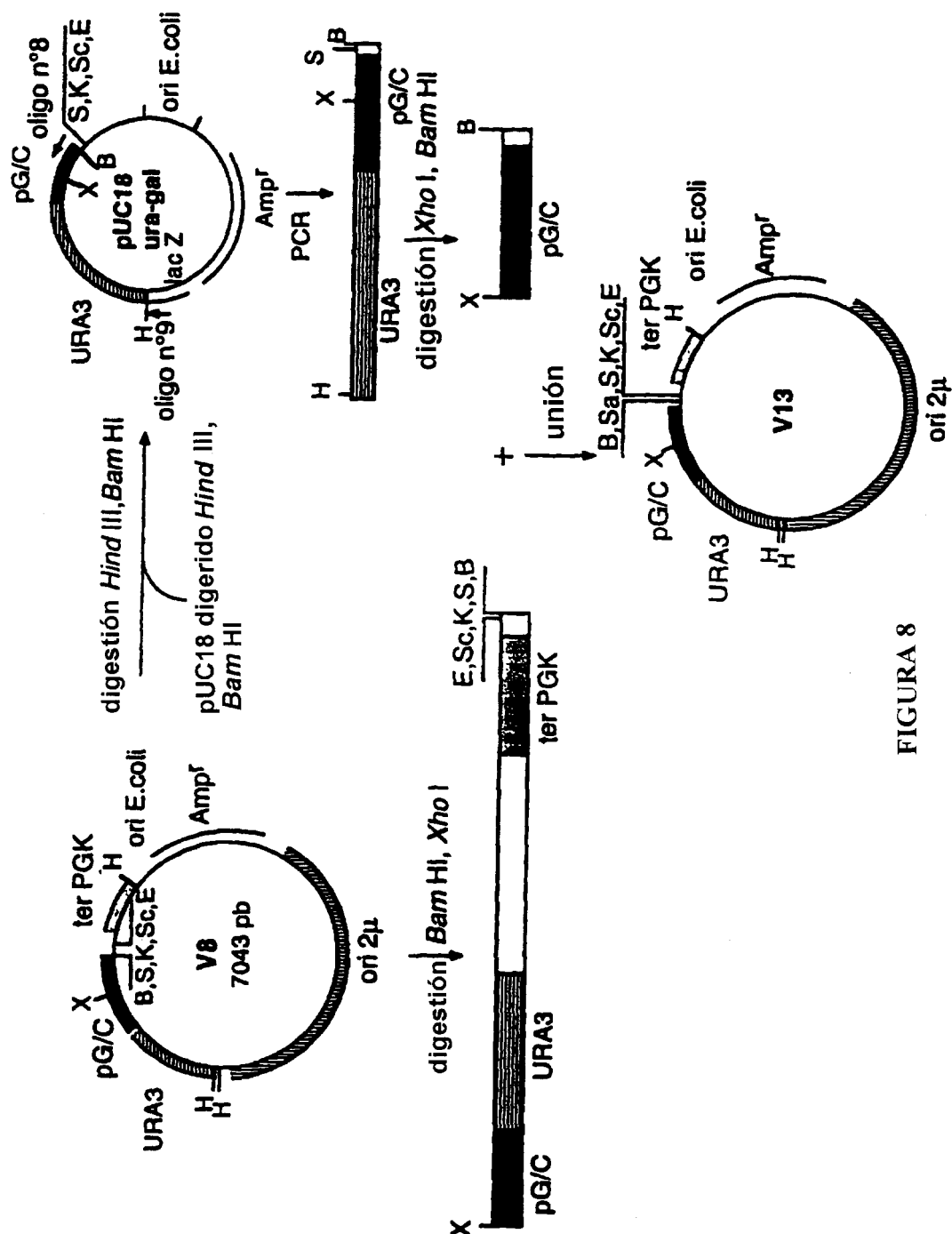


FIGURA 8

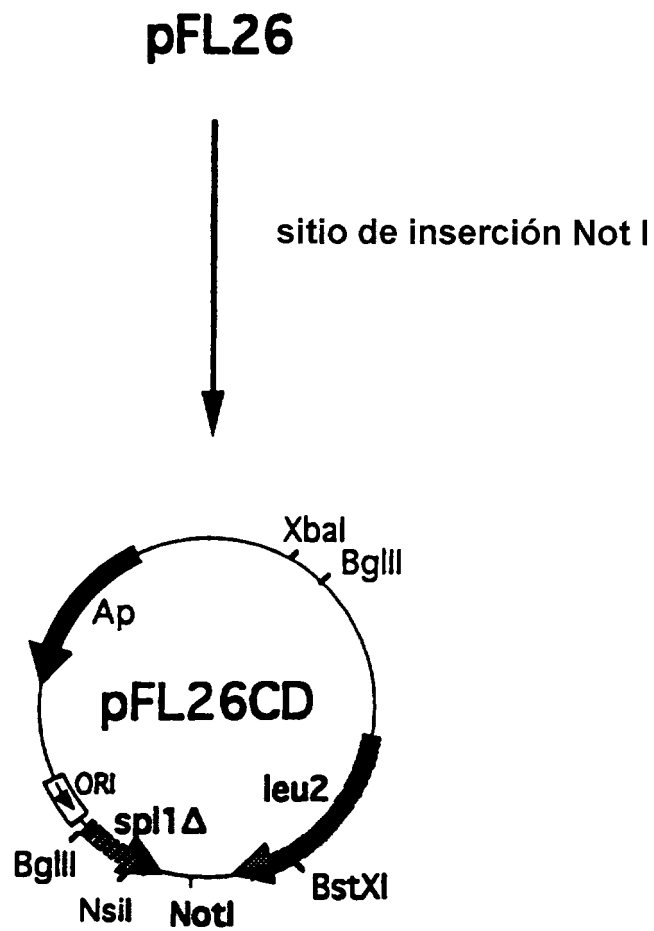


FIGURA 9a

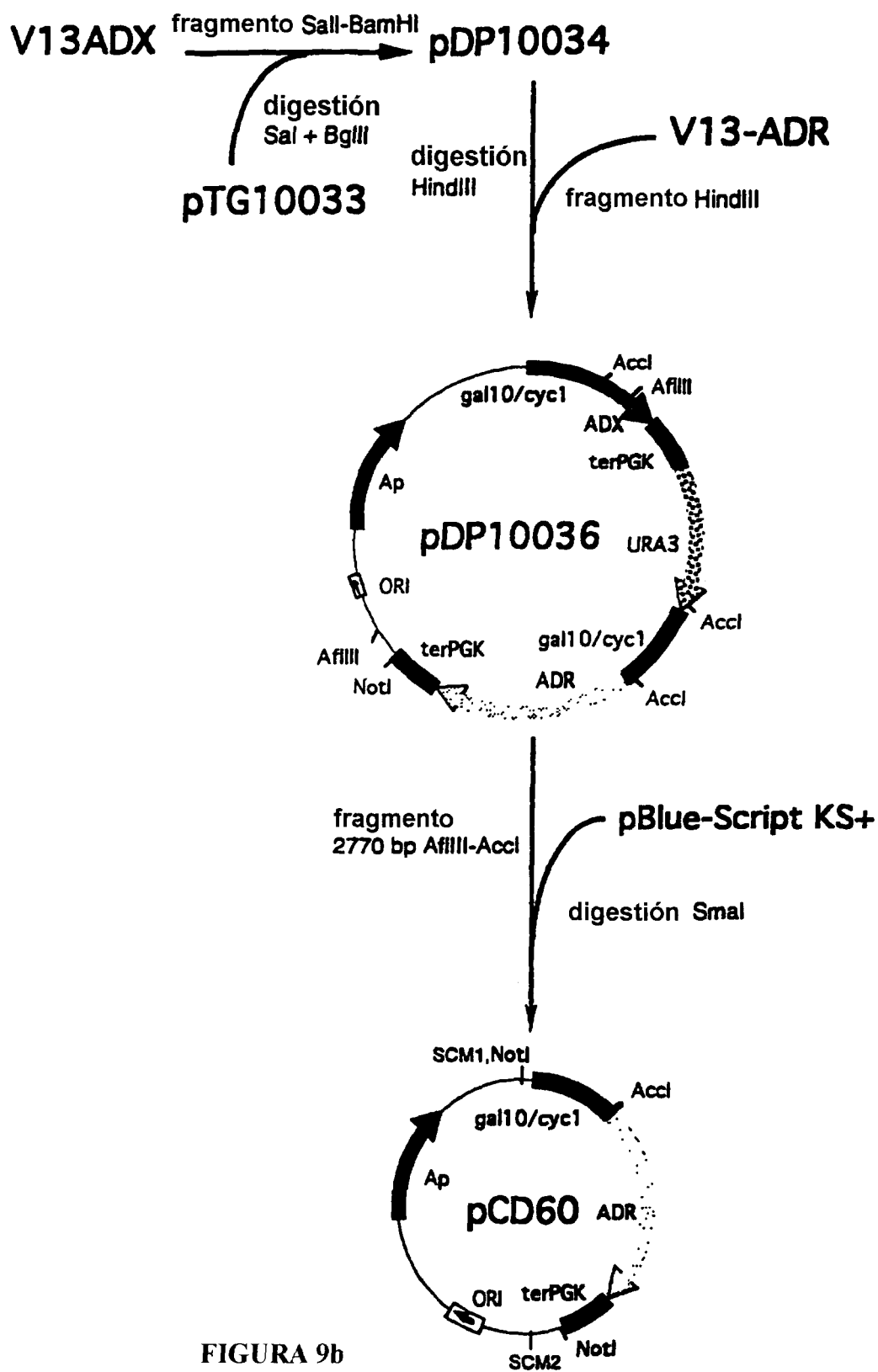


FIGURA 9b

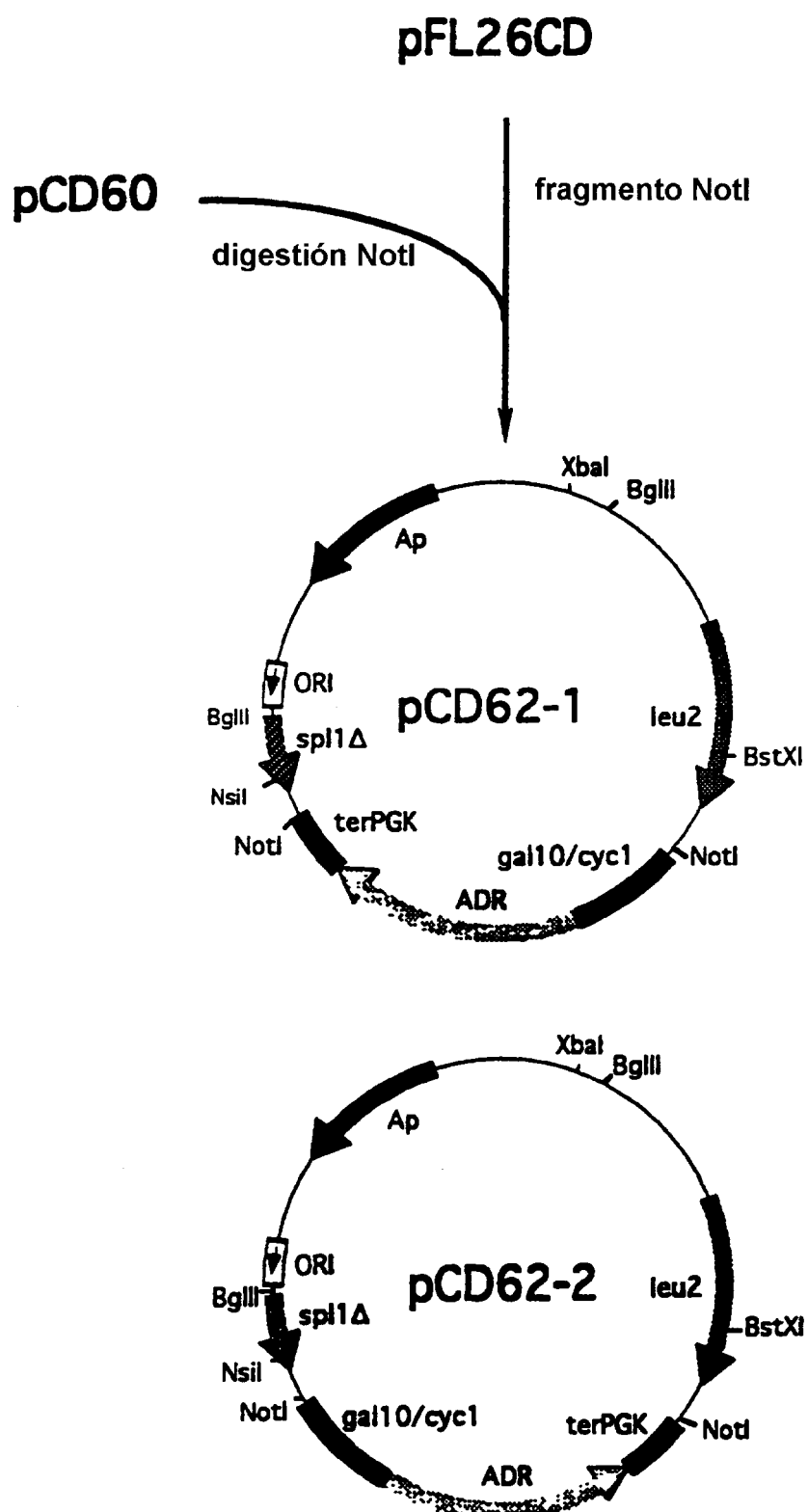


FIGURA 9c

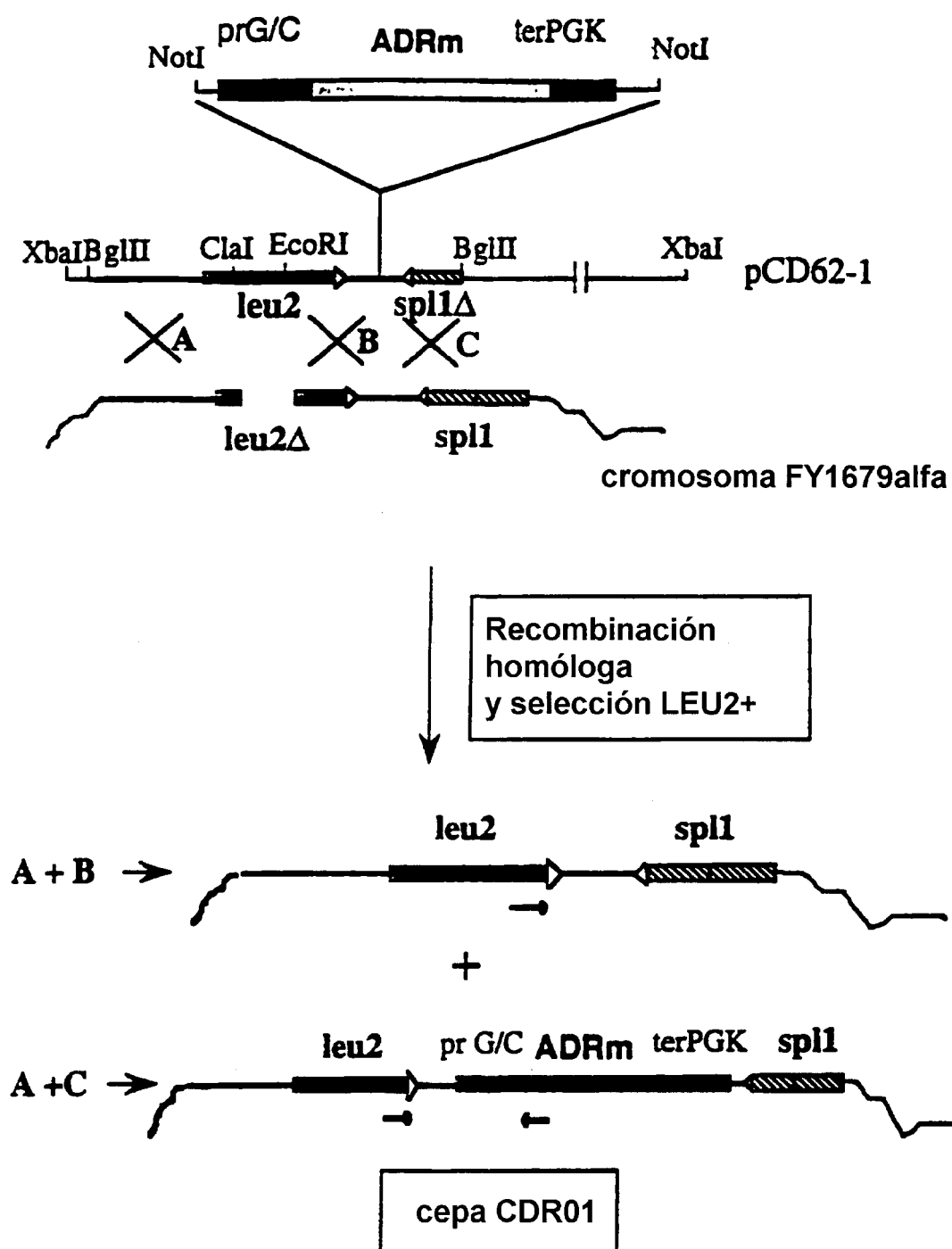


FIGURA 10

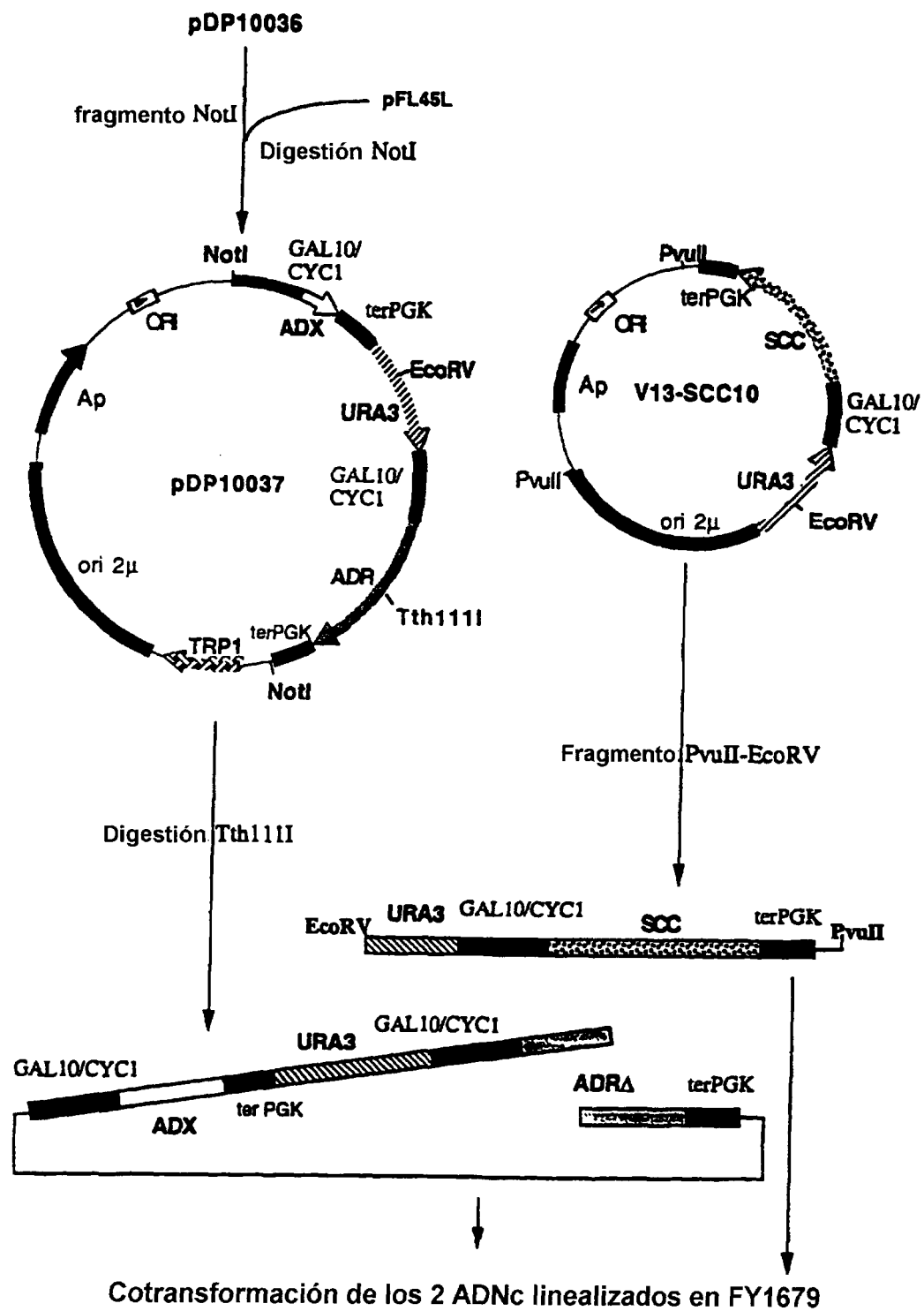


FIGURA 11a

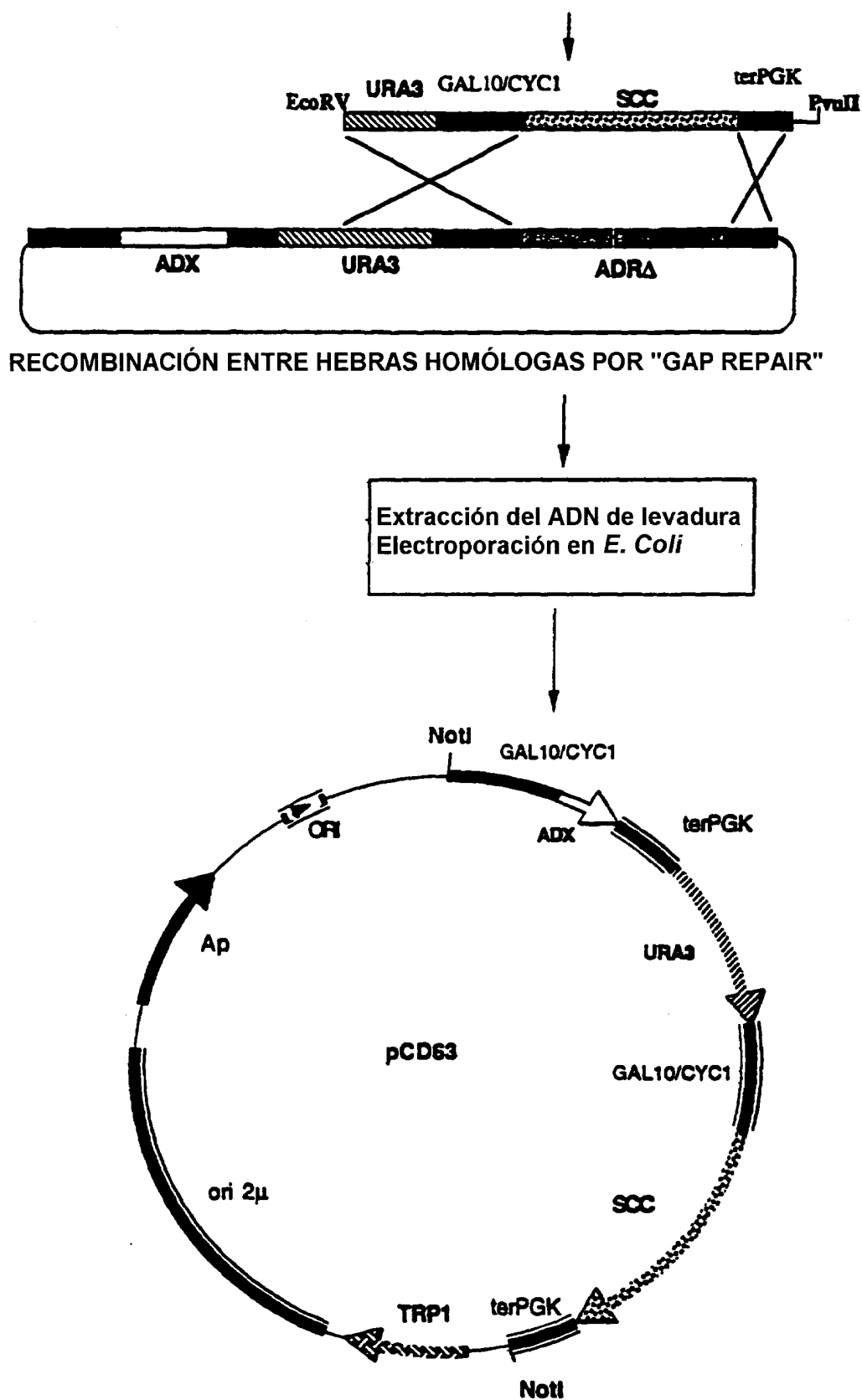


FIGURA 11b

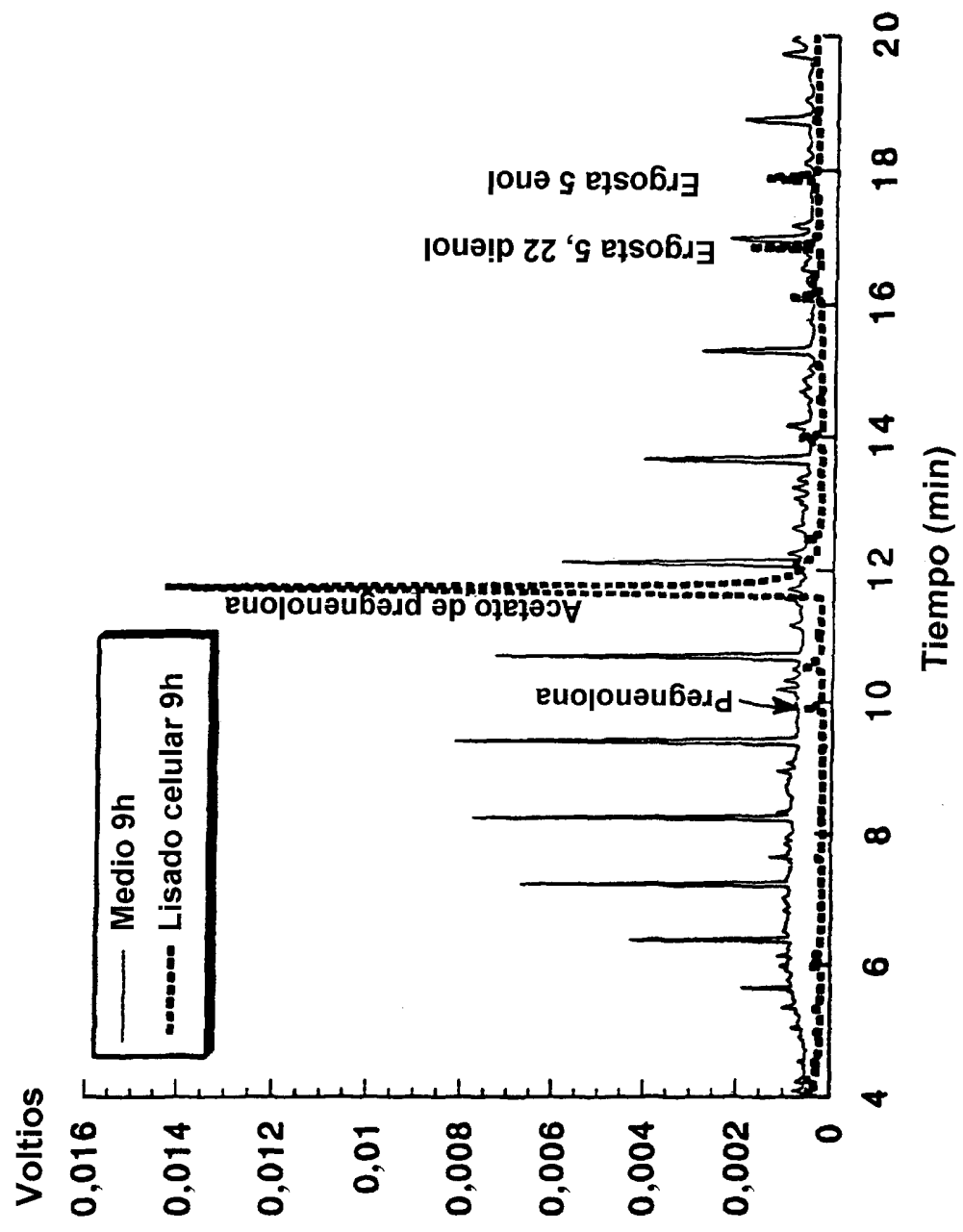


FIGURA 12a

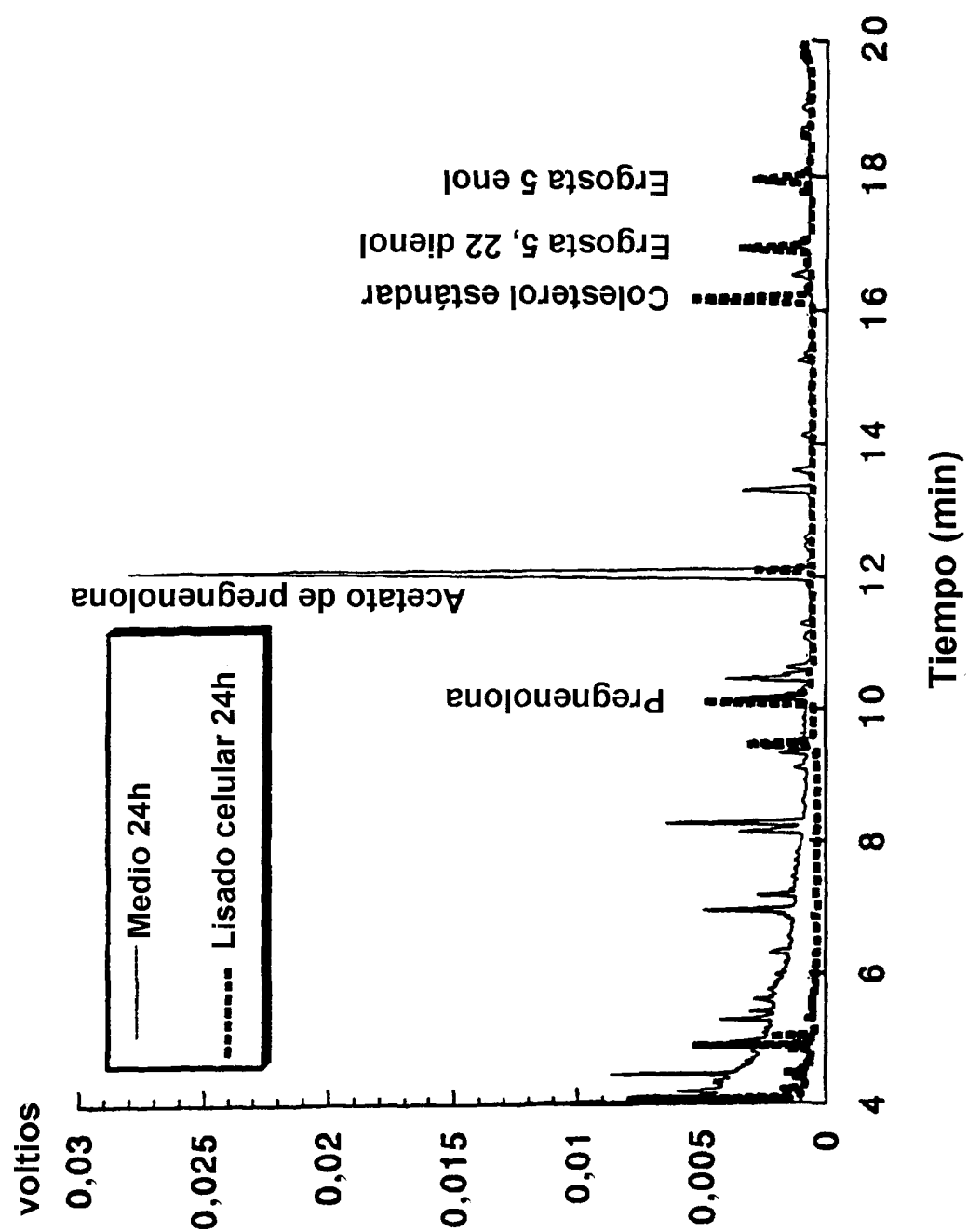


FIGURA 12b

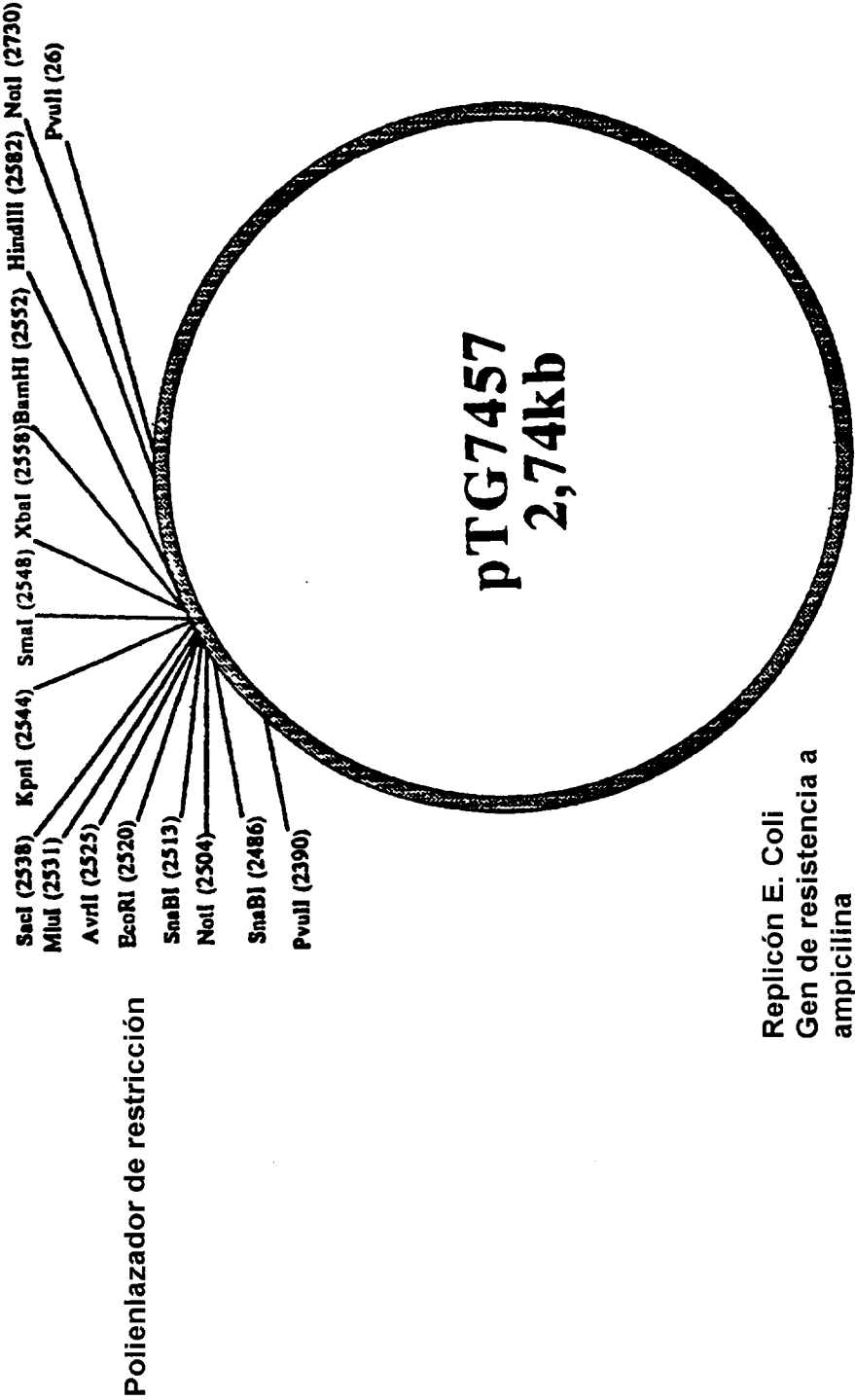


FIGURA 13

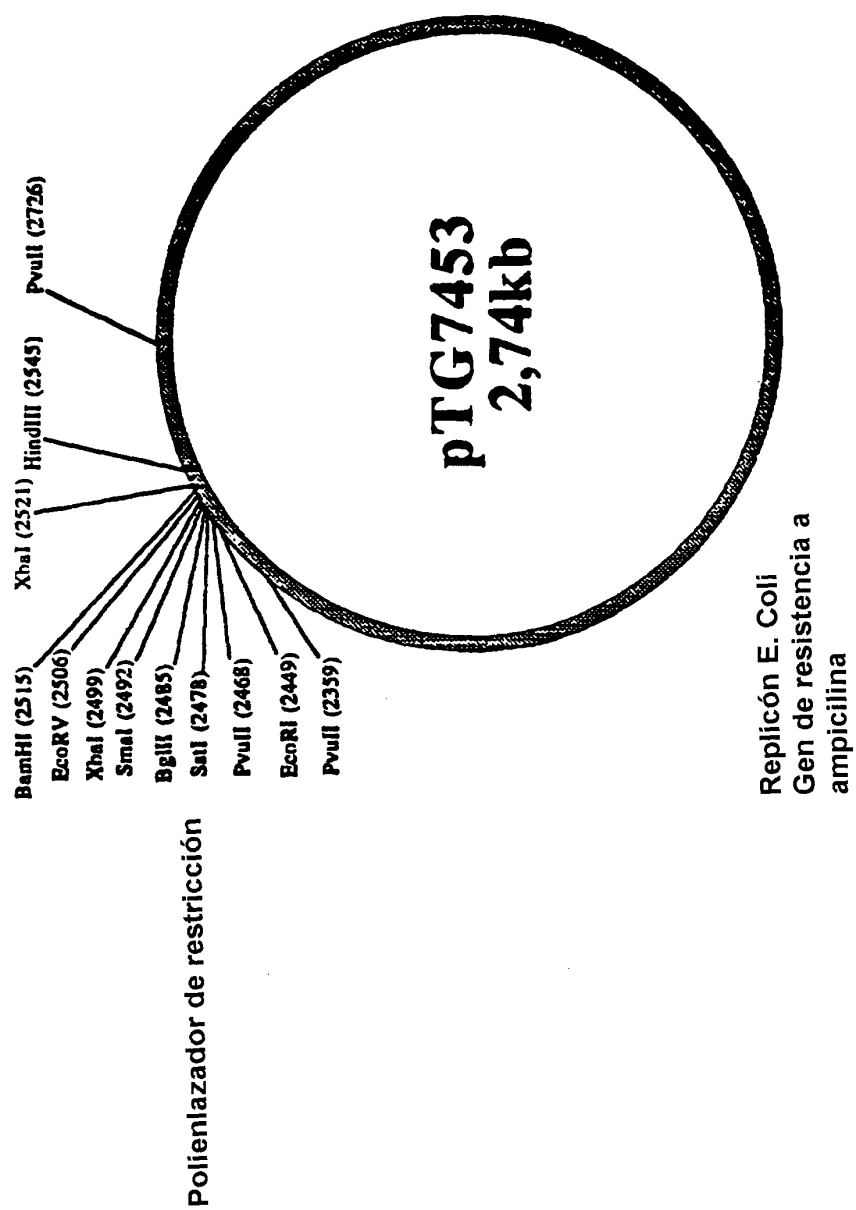
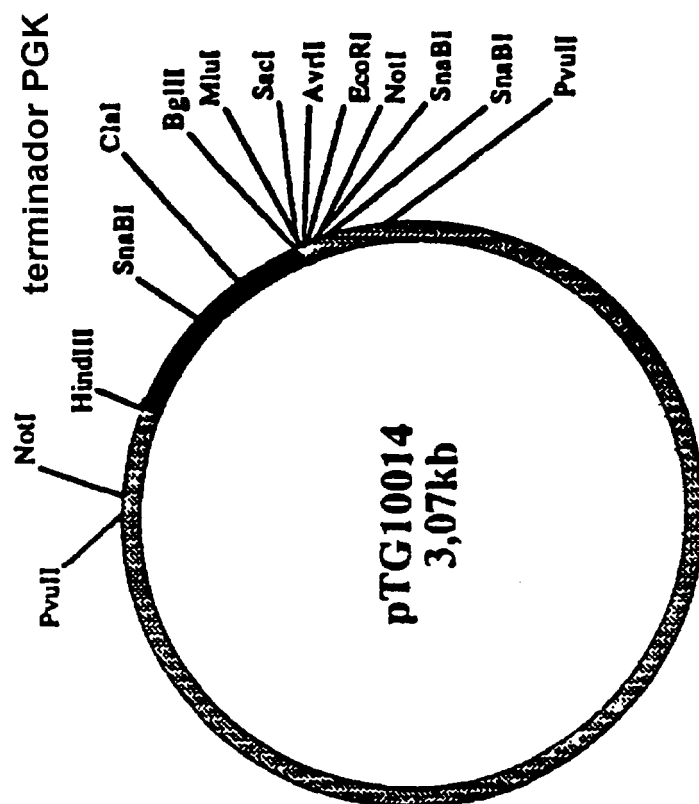


FIGURA 14



Replicón E. coli
Gen de resistencia
a ampicilina

FIGURA 15

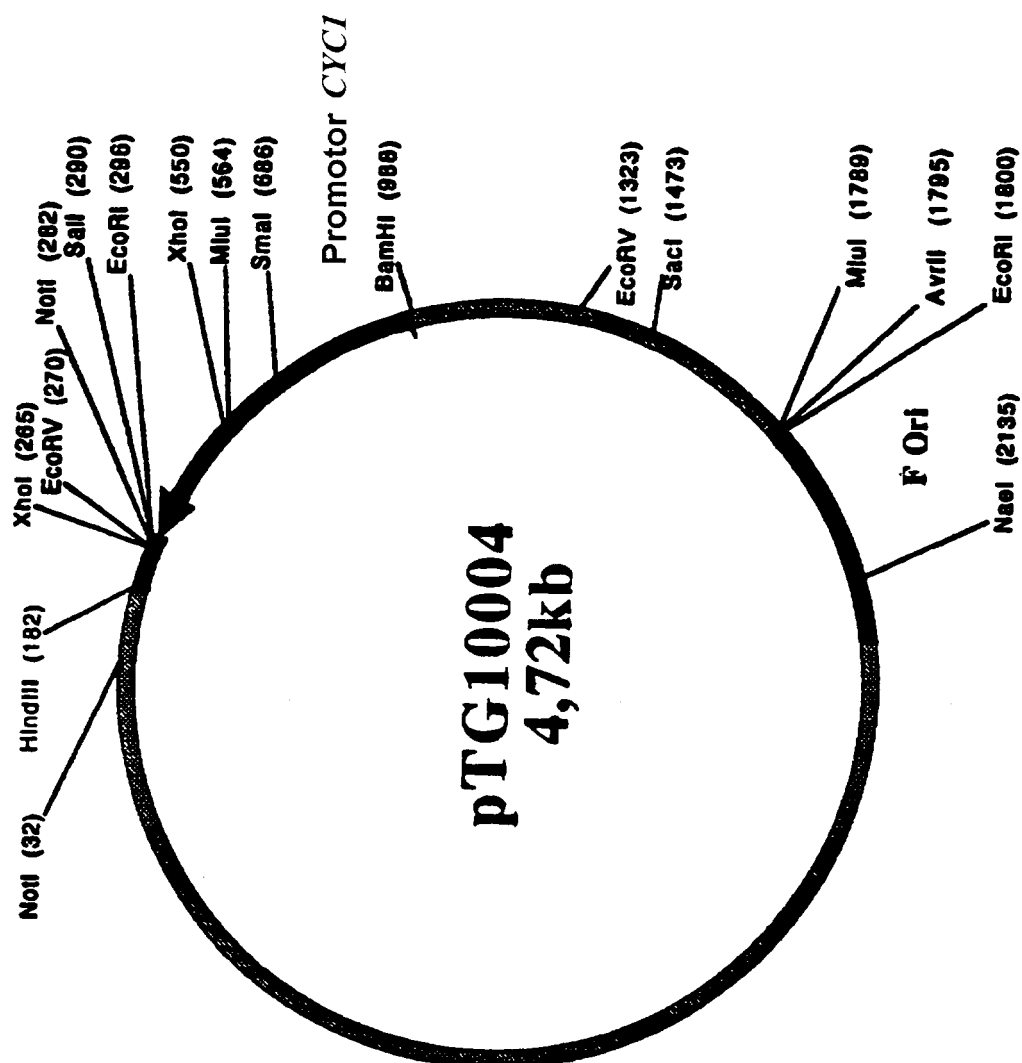


FIGURA 16

Replicón E. coli
Gen de resistencia
a ampicilina

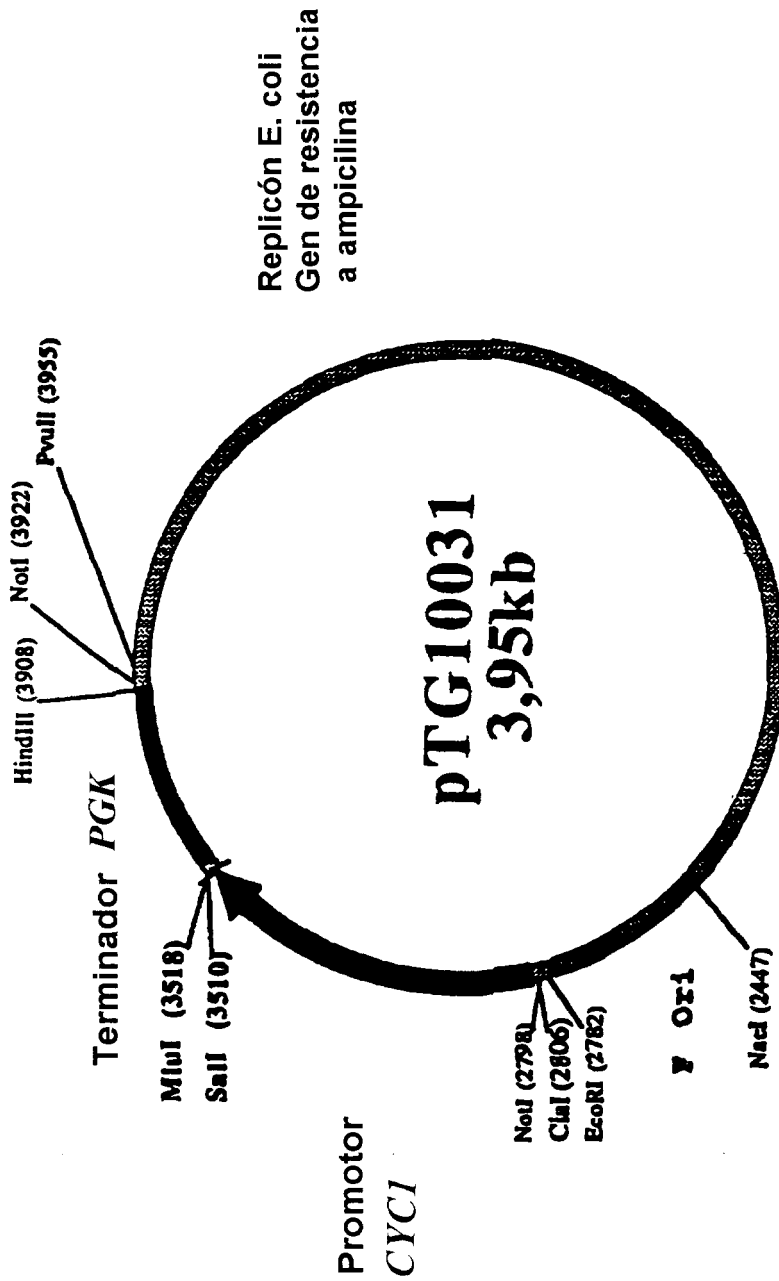


FIGURA 17

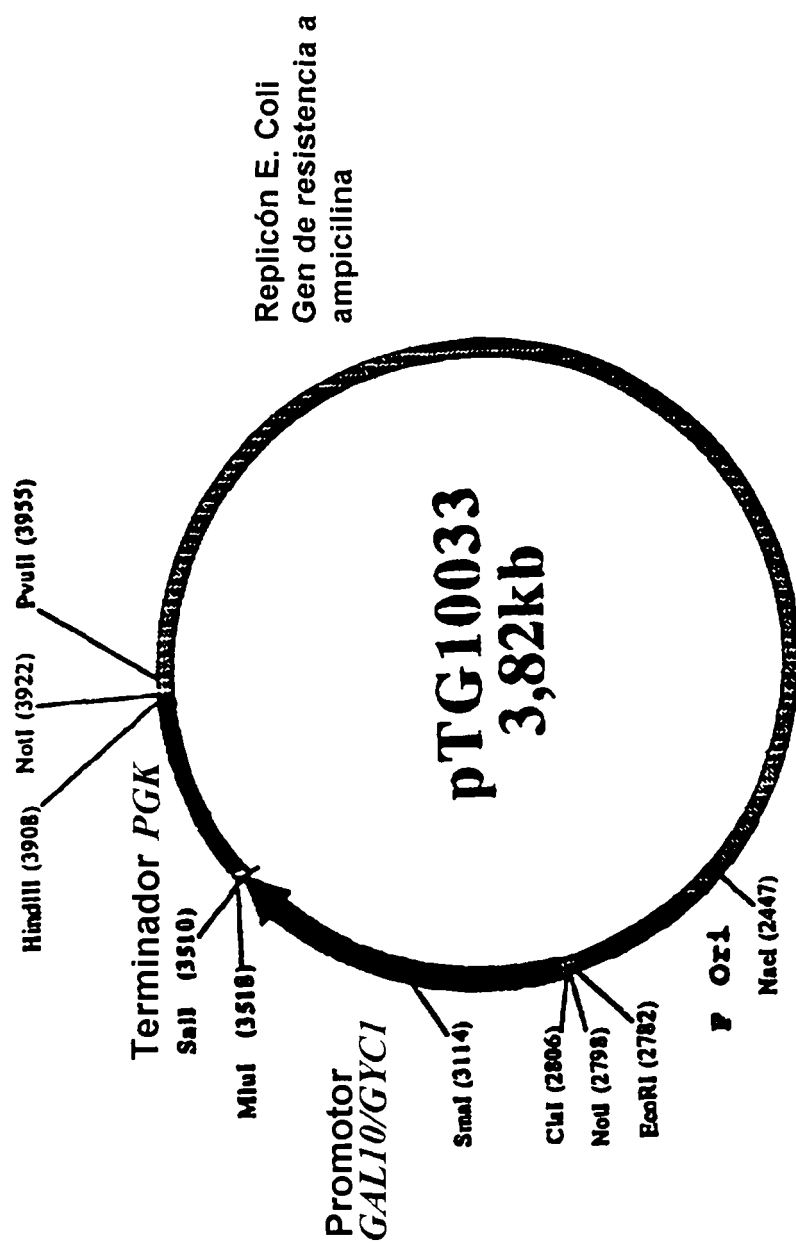


FIGURA 18

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIONES GENERALES:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: ROUSSEL UCLAF

(B) CALLE: 102, Route de Noisy

(C) CIUDAD: ROMAINVILLE

(E) PAÍS: FRANCIA

(F) CÓDIGO POSTAL: 93230

(G) TELÉFONO: 49.91.49.91

(H) TELEFAX: 49.91.46.10

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Secuencia de ADN que codifica una proteína de *A. thaliana* que tiene una actividad delta-5,7 esterol-delta-7 reductasa, proteína delta-7Red, procedimiento de producción, cepas de levaduras transformadas, aplicaciones.

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 31

(iv) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:

(A) TIPO DE SOPORTE: Disquete

(B) ORDENADOR: PC compatible con IBM

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

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release n° 1.0, versión n° 1.30 (OEB)

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: FR 9501723

(B) FECHA DE DEPÓSITO: 15-FEB-1995

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: FR 9506517

(B) FECHA DE DEPÓSITO: 01-JUN-1995

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

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1496 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) ORIGEN:

(A) ORGANISMO: *Arabidopsis thaliana*

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) EMPLAZAMIENTO: 76..1365

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

ES 2 339 833 T3

	GTGTGAGTAA TTTAGGTCAA CACAGATCAG AATCTGAGGC TTTGGCCGAG ACGAAGAGAA	60
5	AAGCAGAAGA AGAAA ATG GCG GAG ACT GTA CAT TCT CCG ATC GTT ACT TAC Met Ala Glu Thr Val His Ser Pro Ile Val Thr Tyr 1 5 10	111
10	GCA TCG ATG TTA TCG CTT CTC GCC TTC TGT CCA CCT TTC GTC ATT CTC Ala Ser Met Leu Ser Leu Leu Ala Phe Cys Pro Pro Phe Val Ile Leu 15 20 25	159
15	CTA TGG TAC ACA ATG GTT CAT CAG GAT GGT TCT GTT ACT CAG ACC TTT Leu Trp Tyr Thr Met Val His Gln Asp Gly Ser Val Thr Gln Thr Phe 30 35 40	207
20	GGC TTC TTT TGG GAG AAT GGA GTT CAA GGA CTT ATC AAC ATA TGG CCA Gly Phe Phe Trp Glu Asn Gly Val Gln Gly Leu Ile Asn Ile Trp Pro 45 50 55 60	255
25	AGA CCC ACT TTG ATT GCT TGG AAA ATT ATA TTT TGC TAT GGA GCA TTT Arg Pro Thr Leu Ile Ala Trp Lys Ile Ile Phe Cys Tyr Gly Ala Phe 65 70 75	303
30	GAA GCT ATT CTT CAG CTG CTT CTG CCT GGT AAA AGA GTT GAG GGT CCA Glu Ala Ile Leu Gln Leu Leu Leu Pro Gly Lys Arg Val Glu Gly Pro 80 85 90	351
35	ATA TCT CCA GCC GGA AAC CGA CCA GTT TAC AAG GCC AAT GGT CTG GCT Ile Ser Pro Ala Gly Asn Arg Pro Val Tyr Lys Ala Asn Gly Leu Ala 95 100 105	399
40	GCT TAC TTT CTG ACA CTA GCA ACC CAT CTT GGT CTT TGG TGG TTT GGA Ala Tyr Phe Val Thr Leu Ala Thr His Leu Gly Leu Trp Trp Phe Gly 110 115 120	447
45	ATC TTC AAC CCT GCA ATT GTC TAT GAT CAC TTG GGT GAA ATA TTT TCG Ile Phe Asn Pro Ala Ile Val Tyr Asp His Leu Gly Glu Ile Phe Ser 125 130 135 140	495

ES 2 339 833 T3

	GCA CTA ATA TTC GGA AGC TTC ATA TTT TGT GTT TTG TTG TAC ATA AAA	543
	Ala Leu Ile Phe Gly Ser Phe Ile Phe Cys Val Leu Leu Tyr Ile Lys	
5	145 150 155	
	GGC CAT GTT GCA CCT TCA TCA AGT GAC TCT GGT TCA TGT GGT AAC CTA	591
	Gly His Val Ala Pro Ser Ser Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly Asn Leu	
10	160 165 170	
	ATA ATT GAC TTC TAT TGG GGC ATG GAG TTG TAC CCT CGA ATT GGT AAG	639
	Ile Ile Asp Phe Tyr Trp Gly Met Glu Leu Tyr Pro Arg Ile Gly Lys	
15	175 180 185	
	AGC TTT GAC ATC AAG GTG TTT ACT AAT TGC AGA TTC GGA ATG ATG TCT	687
	Ser Phe Asp Ile Lys Val Phe Thr Asn Cys Arg Phe Gly Met Met Ser	
20	190 195 200	
	TGG GCA GTT CTT GCA GTC ACG TAC TGC ATA AAA CAG TAT GAA ATA AAT	735
	Trp Ala Val Leu Ala Val Thr Tyr Cys Ile Lys Gln Tyr Glu Ile Asn	
25	205 210 215 220	
	GGC AAA GTA TCT GAT TCA ATG CTG GTG AAC ACC ATC CTG ATG CTG GTG	783
	Gly Lys Val Ser Asp Ser Met Leu Val Asn Thr Ile Leu Met Leu Val	
30	225 230 235	
	TAT GTC ACA AAA TTC TTC TGG TGG GAA GCT GGT TAT TGG AAC ACC ATG	831
	Tyr Val Thr Lys Phe Phe Trp Trp Glu Ala Gly Tyr Trp Asn Thr Met	
35	240 245 250	
	GAC ATT GCA CAT GAC CGA GCT GGA TTC TAT ATA TGC TGG GGT TGT CTA	879
	Asp Ile Ala His Asp Arg Ala Gly Phe Tyr Ile Cys Trp Gly Cys Leu	
40	255 260 265	
	GTG TGG GTG CCT TCT GTC TAC ACT TCT CCA GGC ATG TAC CTT GTG AAC	927
	Val Trp Val Pro Ser Val Tyr Thr Ser Pro Gly Met Tyr Leu Val Asn	
45	270 275 280	
	CAC CCC GTC GAA CTC GGA ACT CAG TTG GCA ATA TAC ATT CTC GTT GCA	975
	His Pro Val Glu Leu Gly Thr Gln Leu Ala Ile Tyr Ile Leu Val Ala	
50	285 290 295 300	
	GGA ATT CTG TGC ATT TAC ATA AAG TAT GAC TGT GAT AGA CAA AGG CAA	1023
	Gly Ile Leu Cys Ile Tyr Ile Lys Tyr Asp Cys Asp Arg Gln Arg Gln	
55	305 310 315	

ES 2 339 833 T3

5	GAG TTC AGG AGG ACA AAC GGG AAA TGT TTG GTT TGG GGA AGA GCC CCG Glu Phe Arg Arg Thr Asn Gly Lys Cys Leu Val Trp Gly Arg Ala Pro 320 325 330	1071
10	TCA AAG ATT GTG GCG TCG TAT ACT ACA ACA TCT GGT GAA ACT AAA ACT Ser Lys Ile Val Ala Ser Tyr Thr Thr Thr Ser Gly Glu Thr Lys Thr 335 340 345	1119
15	AGT CTT CTC TTA ACG TCT GGA TGG TGG GGA TTG GCT CGT CAT TTC CAT Ser Leu Leu Leu Thr Ser Gly Trp Trp Gly Leu Ala Arg His Phe His 350 355 360	1167
20	TAT GTT CCT GAG ATC TTA AGT GCT TTC TTC TGG ACC GTA CCG GCT CTC Tyr Val Pro Glu Ile Leu Ser Ala Phe Phe Trp Thr Val Pro Ala Leu 365 370 375 380	1215
25	TTC GAT AAC TTC TTG GCA TAC TTC TAC GTC CTC ACC CTT CTT CTC TTT Phe Asp Asn Phe Leu Ala Tyr Phe Tyr Val Leu Thr Leu Leu Leu Phe 385 390 395	1263
30	GAT CGA GCC AAG AGA GAC GAT GAC CGA TGC CGA TCA AAG TAT GGG AAA Asp Arg Ala Lys Arg Asp Asp Asp Arg Cys Arg Ser Lys Tyr Gly Lys 400 405 410	1311
35	TAT TGG AAG CTG TAT TGT GAG AAA GTC AAA TAC AGG ATC ATT CCG GGA Tyr Trp Lys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Lys Tyr Arg Ile Ile Pro Gly 415 420 425	1359
40	ATT TAT TGATTGTAAC GAAGTCTGTT GTTCTCATTT TCTACTTATT ACGTTAATTC Ile Tyr 430	1415
45	GAACGTTGGA ATCATCAAAA GACCGAGCCA AAACAAAAAT GCAAATTGAT GCGATAGACA 1TCTTTTGCT GAAAAAAAAA A	1475 1496

50 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 55 (A) LONGITUD: 430 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

65

ES 2 339 833 T3

	Met	Ala	Glu	Thr	Val	His	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Tyr	Ala	Ser	Met	Leu	
	1					5				10					15		
5	Ser	Leu	Leu	Ala	Phe	Cys	Pro	Pro	Phe	Val	Ile	Leu	Leu	Trp	Tyr	Thr	
				20					25					30			
10	Met	Val	His	Gln	Asp	Gly	Ser	Val	Thr	Gln	Thr	Phe	Gly	Phe	Phe	Trp	
				35				40					45				
15	Glu	Asn	Gly	Val	Gln	Gly	Leu	Ile	Asn	Ile	Trp	Pro	Arg	Pro	Thr	Leu	
		50					55				60						
20	Ile	Ala	Trp	Lys	Ile	Ile	Phe	Cys	Tyr	Gly	Ala	Phe	Glu	Ala	Ile	Leu	
	65					70					75				80		
25	Gln	Leu	Leu	Leu	Pro	Gly	Lys	Arg	Val	Glu	Gly	Pro	Ile	Ser	Pro	Ala	
					85					90				95			
30	Gly	Asn	Arg	Pro	Val	Tyr	Lys	Ala	Asn	Gly	Leu	Ala	Ala	Tyr	Phe	Val	
				100					105					110			
35	Thr	Leu	Ala	Thr	His	Leu	Gly	Leu	Trp	Trp	Phe	Gly	Ile	Phe	Asn	Pro	
		115					120					125					
40	Ala	Ile	Val	Tyr	Asp	His	Leu	Gly	Glu	Ile	Phe	Ser	Ala	Leu	Ile	Phe	
	130					135						140					
45	Gly	Ser	Phe	Ile	Phe	Cys	Val	Leu	Leu	Tyr	Ile	Lys	Gly	His	Val	Ala	
	145					150					155				160		
50	Pro	Ser	Ser	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Cys	Gly	Asn	Leu	Ile	Ile	Asp	Phe	
					165				170					175			
55	Tyr	Trp	Gly	Met	Glu	Leu	Tyr	Pro	Arg	Ile	Gly	Lys	Ser	Phe	Asp	Ile	
				180					185					190			
60	Lys	Val	Phe	Thr	Asn	Cys	Arg	Phe	Gly	Met	Met	Ser	Trp	Ala	Val	Leu	
		195					200						205				
65	Ala	Val	Thr	Tyr	Cys	Ile	Lys	Gln	Tyr	Glu	Ile	Asn	Gly	Lys	Val	Ser	
	210						215					220					
	Asp	Ser	Met	Leu	Val	Asn	Thr	Ile	Leu	Met	Leu	Val	Tyr	Val	Thr	Lys	
	225					230					235				240		

ES 2 339 833 T3

Phe Phe Trp Trp Glu Ala Gly Tyr Trp Asn Thr Met Asp Ile Ala His
245 250 255

Asp Arg Ala Gly Phe Tyr Ile Cys Trp Gly Cys Leu Val Trp Val Pro
260 265 270

Ser Val Tyr Thr Ser Pro Gly Met Tyr Leu Val Asn His Pro Val Glu
275 280 285

Leu Gly Thr Gln Leu Ala Ile Tyr Ile Leu Val Ala Gly Ile Leu Cys
290 295 300

Ile Tyr Ile Lys Tyr Asp Cys Asp Arg Gln Arg Gln Glu Phe Arg Arg
305 310 315 320

Thr Asn Gly Lys Cys Leu Val Trp Gly Arg Ala Pro Ser Lys Ile Val
325 330 335

Ala Ser Tyr Thr Thr Thr Ser Gly Glu Thr Lys Thr Ser Leu Leu Leu
340 345 350

Thr Ser Gly Trp Trp Gly Leu Ala Arg His Phe His Tyr Val Pro Glu
355 360 365

Ile Leu Ser Ala Phe Phe Trp Thr Val Pro Ala Leu Phe Asp Asn Phe
370 375 380

Leu Ala Tyr Phe Tyr Val Leu Thr Leu Leu Leu Phe Asp Arg Ala Lys
385 390 395 400

Arg Asp Asp Asp Arg Cys Arg Ser Lys Tyr Gly Lys Tyr Trp Lys Leu
405 410 415

Tyr Cys Glu Lys Val Lys Tyr Arg Ile Ile Pro Gly Ile Tyr
420 425 430

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(B) EMPLAZAMIENTO:7

(D) OTRAS INFORMACIONES: /nota = “residuo 7 = Trp o Tyr”

ES 2 339 833 T3

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(B) EMPLAZAMIENTO: 12

(D) OTRAS INFORMACIONES: /nota = “residuo 12 = His o Lys”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

Leu Leu Xaa Xaa Gly Trp Xaa Gly Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Tyr
1 5 10 15

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = “OLIGONUCLEÓTIDO”

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) EMPLAZAMIENTO: 10..29

(D) OTRAS INFORMACIONES: /nota = “SECUENCIA ID No 1 DE 76 A 95”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

CGCGGATCCA TGGCGGAGAC TGTACATTC

29

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = “OLIGONUCLEÓTIDO”

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (10..28)

(D) OTRAS INFORMACIONES: /nota = “SECUENCIA ID No 1 COMPLEMENTARIA DE 1350 A 1368”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

CAGGGTACCT CAATAAATTC CCGGAATG

28

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

ES 2 339 833 T3

	(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla	
	(D) CONFIGURACIÓN: lineal	
5	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico	
	(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"	
	(ix) CARACTERÍSTICAS:	
	(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica	
10	(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..23)	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:	
15	GATTACGCCA AGCTTTTCGA AAC	23
	(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 7:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
20	(A) LONGITUD: 29 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla	
25	(D) CONFIGURACIÓN: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico	
	(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"	
30	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:	
	AGATCTTGAG AAGATGCGGC CAGCAAAAC	29
	(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 8:	
35	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 46 pares de bases	
40	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla	
	(D) CONFIGURACIÓN: lineal	
45	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico	
	(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:	
50	GGGGATCCGT GGTCGACGTA ATTTAGTGTG TGTATTTGTG TTTGCG	46
	(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 9:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
55	(A) LONGITUD: 17 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla	
60	(D) CONFIGURACIÓN: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico	
	(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"	
65	(ix) CARACTERÍSTICAS:	
	(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica	

ES 2 339 833 T3

(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..17)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

5 GTAAAACGAC GGCCAGT 17

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 25 pares de bases
(B) TIPO: nucleótido
(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla
15 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

TTGAAGGTTT AACATCAATT GATTG 25

25 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
30 (B) TIPO: nucleótido
(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- 40 (A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica
(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..38)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

45 GTGTGGCGGC CGCCTCCTTG TCAATATTAA TGTTAAAG 38

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 34 pares de bases
(B) TIPO: nucleótido
(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla
55 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

CAAGGAGGCG GCCGCCACAC AAAAAGTTAG GTGT 34

65 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 339 833 T3

- (A) LONGITUD: 25 pares de bases
(B) TIPO: nucleótido
(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla
5 (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"
- 10 (ix) CARACTERÍSTICAS:
(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica
(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..25)
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:
- TCTGCTTCCC TAGAACCTTC TTATG 25
- 20 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 14:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
25 (B) TIPO: nucleótido
(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
35 (A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica
(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..20)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:
- 40 TACATTAGGT CCTTTGTAGC 20
- (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 15:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
45 (A) LONGITUD: 25 pares de bases
(B) TIPO: nucleótido
(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla
50 (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:
- GCGCTCAGCG GCCGCTTTCC AGTCG 25
- 60 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 16:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 21 pares de bases
65 (B) TIPO: nucleótido
(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

ES 2 339 833 T3

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

AATTGCGGCC GCGTACGTAT G

21

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..21)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

AATTCATACG TACGCGGCCG C

21

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

CAACGCGTCC TAGG

14

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..22)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

AATTCCTAGG ACGCGTTGAG CT

22

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 20:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
 - (B) TIPO: nucleótido
 - 10 (C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla
 - (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico
- 15 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

GATCCGCAGA TATCATCTAG ATCCCGGGTA GAT

33

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 25 (A) LONGITUD: 39 pares de bases
 - (B) TIPO: nucleótido
 - (C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla
 - (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
- 35 (A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica
 - (B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..39)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

40 AGAGCTCAAG ATCTACCCGG GATCTAGATG ATATCTGCG

39

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 22:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 34 pares de bases
 - (B) TIPO: nucleótido
 - 50 (C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla
 - (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico
- 55 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

60 CTTGAGCTCT ACGCAGCTGG TCGACACCTA GGAG

34

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 65 (A) LONGITUD: 28 pares de bases
 - (B) TIPO: nucleótido
 - (C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

ES 2 339 833 T3

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..28)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

AATTCTCCTA GGTGTCGACC AGCTGCGT

28

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

GCGGATCTGC TCGAAGATTG CCTGCGCGTT GGGCTTGATC

40

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

TCGACGGACG CGTGG

15

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..14)

ES 2 339 833 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

TCGACCACGC GTCC

14

5 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

10

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

20

TGGCCGTCGT TTTACTCCTG CGCCTGATGC GGTAT

35

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 28:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

30

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

35

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:

GGCCGCAAAA CAAA

15

40 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

45

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(ix) CARACTERÍSTICAS:

55

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..15)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 29:

60

AGCTTTTGGT TTTGC

15

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 30:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

ES 2 339 833 T3

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 30:

10

GATCTATCGA TGCGGCCGCG

20

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 31:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

20

(C) NÚMERO DE CADENAS: Sencilla

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otro ácido nucleico

25

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO"

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

30

(B) EMPLAZAMIENTO: complemento (1..20)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 31:

CGCGCGCGGC CGCATCGATA

20

35

40

45

50

55

60

65