

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
07 de diciembre de 2017 (07.12.2017) WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional  
WO 2017/207844 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:  
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/77 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2017/070363

(22) Fecha de presentación internacional:  
29 de mayo de 2017 (29.05.2017)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P 201630701 30 de mayo de 2016 (30.05.2016) ES

(71) Solicitante: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: FELPETO SANTERO, Carmen; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid (ES). GALÁN SICILIA, Beatriz; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid (ES). GARCÍA LÓPEZ, José Luis; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: PONS ARIÑO, Ángel; Glorieta de Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,

ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con (una) indicación(es) relativa(s) a material biológico depositado en virtud de lo dispuesto en la Regla 13bis, aparte de la descripción (Reglas 13bis.4(d)(i) y 48.2(a)(viii))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: PRODUCTION OF 11 $\alpha$ -HYDROXYLATED STEROIDS BY BIOTRANSFORMATION WITH RECOMBINANT BACTERIA

(54) Título: PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 $\alpha$  HIDROXILADOS MEDIANTE BIOTRANSFORMACIÓN CON BACTERIAS RECOMBINANTES

(57) Abstract: The present invention provides a method for producing 11 $\alpha$ -hydroxylated steroid compounds or derivatives thereof by fermentation of natural sterols or by biotransformation of various steroidal synthons with recombinant bacteria, preferably *Mycobacterium smegmatis* or *Corynebacterium glutamicum*. Said recombinant bacteria carry a plasmid comprising a synthetic operon containing the genes *cyp509C12* and *roCPR1* from *Rhizopus oryzae*, which code for cytochrome CYP509C12 with 11 $\alpha$ -hydroxylase activity, and the cytochrome reductase (RoCPR1) needed for activity of the cytochrome. Using the method described in the present invention, 11 $\alpha$ -OH-ADD or 11 $\alpha$ -OH-AD can be produced from natural sterols such as cholesterol or phytosterols, and 1 $\alpha$ -OH-PROG, 11 $\alpha$ -OH-DOC, 11 $\alpha$ -OH-TEST, 11 $\alpha$ -OH-DHEA, 11 $\alpha$ -OH-AD and/or 11 $\alpha$ -OH-ADD can be produced from the corresponding non-hydroxylated synthons, amongst others.

(57) Resumen: La presente invención proporciona un procedimiento para producir compuestos esteroideos 11 $\alpha$  hidroxilados o derivados de los mismos por fermentación de esteroides naturales o por biotransformación de distintas sintonas esteroideas con bacterias recombinantes, preferiblemente de *Mycobacterium smegmatis* o de *Corynebacterium glutamicum*. Dichas bacterias recombinantes portan un plásmido que comprende un operón sintético que contiene los genes *cyp509C12* y *roCPR1* de *Rhizopus oryzae*, que codifican el citocromo CYP509C12 con actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa y la citocromo reductasa (RoCPR1) necesaria para la actividad del citocromo. Mediante el método descrito en la presente invención se pueden producir, aunque sin limitarnos, 11 $\alpha$ -OH-ADD o 11 $\alpha$ -OH-AD a partir de esteroides naturales como colesterol o fitoesteroides, o 1 $\alpha$ -OH-PROG, 11 $\alpha$ -OH-DOC, 11 $\alpha$ -OH-TEST, 11 $\alpha$ -OH-DHEA, 11 $\alpha$ -OH-AD y/o 11 $\alpha$ -OH-ADD a partir de sus correspondientes sintonas no hidroxiladas.



WO 2017/207844 A1

**PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 $\alpha$  HIDROXILADOS MEDIANTE  
BIOTRANSFORMACIÓN CON BACTERIAS RECOMBINANTES**

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se encuadra dentro del campo de la industria química, farmacéutica y alimentaria, particularmente dentro de los procesos de producción de esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados y derivados de los mismos mediante biotransformaciones microbianas, tanto a partir de esteroides naturales como a partir de sintonas no hidroxiladas.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Los esteroides son lípidos terpénicos con una estructura definida, que contienen un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno o gonano con cuatro anillos fusionados (A-D); esta estructura básica se modifica por adición de diversos grupos funcionales, como carbonilos e hidroxilos (hidrófilos) o cadenas hidrocarbonadas (hidrófobas). La actividad fisiológica de los esteroides depende de su estructura, es decir, del tipo, número y posición de los grupos funcionales unidos al núcleo esteroide, así como de su isomería configuracional y estructural, es decir, estereoisomería y regioisomería, y del estado de oxidación de los anillos.

15

20

Los esteroides se encuentran muy difundidos en la naturaleza y están presentes en todo tipo de organismos. Así, se han identificado cientos de esteroides y compuestos relacionados que se producen en las plantas, como por ejemplo los fitoesteroides; en los insectos, como por ejemplo los ecdisteroides; en los vertebrados, como por ejemplo, el colesterol, los corticoesteroides o las hormonas esteroideas; y en eucariotas inferiores (levaduras y hongos), como por ejemplo el ergosterol.

25

Hoy en día los productos farmacéuticos de tipo esteroideo son de gran importancia para mantener nuestra calidad de vida, ya que muchos esteroides se utilizan como agentes anti-tumorales, anti-inflamatorios, anti-microbianos, anti-virales, anti-fúngicos, anti-estrogénicos, anti-convulsivos y antialérgicos. Además, otros se utilizan como agentes para la prevención y terapia de muchas otras enfermedades, tales como los cánceres hormona-dependientes de mama y de próstata, ciertas formas de cáncer de

35

colon, la obesidad, la diabetes, la artritis reumatoide, la hipertensión, el asma, el eczema, las inflamaciones, los trastornos metabólicos, enfermedades neurodegenerativas en ancianos, o enfermedades del sistema nervioso central, entre otras muchas. Se incluyen aquí andrógenos, esteroides anabólicos, estrógenos, y corticosteroides, entre otros.

Alrededor de 300 fármacos esteroideos han sido aprobados hasta la fecha para su uso en clínica, y este número tiende a crecer. Los medicamentos esteroideos se encuentran entre los productos médicos más comercializados y representan la segunda gran categoría de fármacos junto con los antibióticos. La producción anual de esteroides se estima en más de un millón de toneladas, con un mercado de miles de millones de euros.

Muchos esteroides utilizados como fármacos se sintetizan químicamente, pero desde hace mucho tiempo se conoce que la transformación microbiana de los esteroides es una herramienta poderosa para la generación de nuevos fármacos esteroideos, así como para la producción eficiente de productos intermedios (precursores) clave para la síntesis química de tales fármacos. Las bioconversiones permiten modificar los esteroides en posiciones de la molécula difícilmente disponibles o accesibles para los agentes químicos, y la funcionalización de la molécula puede ser realizada regio- y estereo-específicamente. Más aún, mediante la bioconversión se pueden completar varias reacciones en un solo paso. Estas y otras ventajas de las biotransformaciones han supuesto una amplia expansión de las tecnologías microbianas en el campo de los esteroides, de tal manera que las aplicaciones de los microorganismos para la modificación de esteroides se han revisado en numerosos artículos a lo largo de los últimos años (Donova y Egorova, 2012, Appl Microbiol Biotechnol., 94(6):1423-1447).

Los principales productos intermedios o precursores para la síntesis industrial de fármacos esteroideos son 4-androsten-3,17-diona (en adelante, AD) y 1,4-androstadien-3,17-diona (en adelante, ADD); sin embargo los esteroides hidroxilados a menudo expresan una mayor actividad biológica en comparación con sus análogos menos polares no hidroxilados. En particular, 11 $\alpha$ -hidroxi-progesterona (en adelante, 11 $\alpha$ -OH-PROG), 11 $\alpha$ -hidroxi-deoxicorticosterona (en adelante, 11 $\alpha$ -OH-DOC), 11 $\alpha$ -hidroxi-testosterona (en adelante, 11 $\alpha$ -OH-TEST), 11 $\alpha$ -hidroxi-4-androsten-3,17-diona (en adelante, 11 $\alpha$ -OH-AD) y 11 $\alpha$ -hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona (en adelante,

11 $\alpha$ -OH-ADD) son sintonas necesarias para la obtención de glucocorticoides que, además de usarse en terapia sustitutiva, poseen propiedades farmacológicas y se emplean como antialérgicos, antiinflamatorios, inmunosupresores y anticonceptivos.

- 5 Por lo tanto, la producción económica y eficiente de estos precursores o sintonas, preferiblemente 11 $\alpha$  hidroxiladas, es una necesidad imperante en la industria farmacéutica.

10 Para la obtención de las sintonas AD y ADD, una de las principales materias primas empleadas en la industria química de esteroides son las sapogeninas, tal como la diosgenina. Alternativamente también se utilizan como materiales de partida en la industria de los esteroides algunos esteroides naturales, como son los esteroides 3 $\beta$ -alcoholes, que contienen un doble enlace en la posición 5-6 y una cadena lateral alifática en C-17. Entre estos esteroides se encuentran el colesterol, el cual se conoce  
15 como el esteroide animal, o los fitoesteroides, los cuales son mezclas de esteroides derivados de plantas, principalmente de origen de soja, como por ejemplo sitosterol, estigmasterol, campesterol, y brasicasterol. Desde la década de los 1980, la transformación microbiana de fitoesterol viene siendo un foco de investigación en el campo de los esteroides.

20

Actualmente en la producción industrial de compuestos esteroideos 11 $\alpha$ -hidroxilados se emplean especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* o *Rhizopus*; en particular *A. ochraceus*, *R. oryzae* y *R. nigricans*. Estos hongos son capaces de hidroxilar varios compuestos esteroideos en posición 11 $\alpha$ , entre ellos AD o ADD; pero  
25 también modifican e hidroxilan en mayor o menor medida en otras posiciones de la molécula, lo que hace descender drásticamente los rendimientos de producción.

Hasta la fecha estos compuestos hidroxilados no se pueden sintetizar desde materias primas de bajo coste en un solo paso; la hidroxilación se hace a partir de una sintona  
30 (AD o ADD) o desde sus precursores directos.

En el caso concreto de *R. oryzae* se ha identificado la enzima responsable de realizar las 11 $\alpha$ -hidroxilaciones. Se trata de un citocromo P450 denominado Cyp509C12 (*European Nucleotide Archive* - EBI EIE80372.1) y la proteína citocromo reductasa  
35 denominada RoCPR1, que transfiere el NADPH necesario para la actividad hidroxilasa

(*European Nucleotide Archive* - EBI EIE89541.1) (Petric *et al.*, 2010, *J Biotechnol.*, 150(3):428-437; WO2011042143A1). La 11 $\alpha$ -hidroxilasa Cyp509C12 realiza la hidroxilación en posición 11 $\alpha$  y 6 $\beta$  de diversas sintonas de interés farmacológico y/o industrial, entre ellas progesterona (en adelante, PROG), deoxicorticosterona (en adelante, DOC), testosterona (en adelante, TEST), y deoxicortisol (en adelante, Reichstein's Substance S, RSS).

El citocromo 11 $\alpha$ -hidroxilasa (GenBank DD180525.1) y la proteína citocromo reductasa (GenBank AR838156.1) de *A. ochraceus* también han sido identificados (US7033807). Esta 11 $\alpha$ -hidroxilasa utiliza como sustrato diversas sintonas de interés farmacológico y/o industrial, entre ellas PROG, TEST, AD, ADD, aldona, canrenona, mexrenona y derivados de esta última.

Las proteínas citocromo CYP509C12 y citocromo reductasa RoCPR1 de *R. oryzae* han sido producidas de forma heteróloga en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y se han identificado los productos hidroxilados en posición 11 $\alpha$  y 6 $\beta$ , así como otros compuestos no identificados, a partir de PROG, DOC, TEST y RSS, (Petric *et al.*, 2010, *J Biotechnol.*, 150(3):428-437; WO2011042143A1). No obstante, en la actualidad no se emplean estas levaduras para la producción industrial debido a los bajos rendimientos para la hidroxilación de estas sintonas.

Por otro lado, el citocromo P450 11 $\alpha$ -hidroxilasa de *A. ochraceus* se ha expresado en células de insecto a partir de una genoteca de cDNA. Su actividad enzimática (medida en la fracción microsomal) ha sido obtenida en coexpresión con la citocromo reductasa (CPR) de *A. ochraceus* hallada por similitud con la ya identificada de *A. niger* o en coexpresión con una CPR humana (US7033807).

La bacteria *Corynebacterium glutamicum* es una actinobacteria ampliamente estudiada por su uso como productor industrial de aminoácidos, motivo por el cual existen hoy en día numerosas herramientas moleculares para su modificación. De hecho a partir de su descubrimiento, el espectro de producción de *C. glutamicum* ha sido ampliado en las últimas décadas a diferentes productos químicos, materiales y fueles mediante múltiples estrategias de ingeniería genética y metabólica. Además cabe destacar que, pese al gran parecido filogenético con el género *Mycobacterium*, esta bacteria no utiliza esteroides como fuente de carbono y energía, ya que carece de la mayoría de

los genes relacionados con su catabolismo. Su genoma está secuenciado y ha sido ampliamente estudiado, llegándose a convertir en un chasis bacteriano para las biotransformaciones industriales, con características que la convierten en una plataforma ideal para este tipo de biotransformaciones como son la multitud de herramientas moleculares para su manipulación, la robustez y el vigor metabólico.

*Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 es una actinobacteria capaz de metabolizar esteroides y utilizarlos como fuente de carbono y energía. En una patente anterior se desarrollaron mutantes de esta cepa para la producción de sintonas como AD y ADD a partir de fitosteroles. En estas cepas se bloqueó la ruta de degradación del colesterol o fitosteroles, por lo que no sigue la degradación del compuesto y se acumula ADD (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 Δ6039, CECT 8331) y AD (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 Δ6039Δ5941, CECT 8332) (WO2015128534).

Sin embargo, hasta el momento no se conoce ningún sistema natural ni recombinante capaz de producir esteroides 11α hidroxilados, derivados de los mismos o sus precursores (sintonas) 11α hidroxilados, de forma eficiente, ya que los organismos productores diseñados hasta la fecha (hongos y levaduras) tienen el inconveniente de que generan muchos productos secundarios que complican la purificación del derivado hidroxilado, lo que hace descender notablemente el rendimiento del proceso.

Se requiere, por tanto, el diseño de nuevos organismos que permitan hidroxilar en posición 11α compuestos con estructura esteroidea para obtener esteroides 11α hidroxilados o sintonas 11α hidroxiladas de forma eficiente, en un procedimiento de producción mejorado que resulte en mayores rendimientos del producto final. Además, idealmente estos organismos deberían permitir dicha producción tanto a partir de precursores no hidroxilados (sintonas) como a partir de esteroides naturales, generando así compuestos esteroideos 11α hidroxilados de elevada pureza.

## 30 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona bacterias recombinantes capaces de hidroxilar de forma eficiente compuestos con estructura esteroidea en posición 11α. Estas bacterias permiten, por tanto, llevar a cabo procesos de biotransformación microbiana en los que se generan eficientemente y de forma económica compuestos esteroideos 11α

hidroxilados y productos intermedios precursores de los mismos (sintonas) 11 $\alpha$  hidroxiladas. Estos precursores son, por ejemplo aunque sin limitarnos, 11 $\alpha$ -hidroxi-progesterona (11 $\alpha$ -OH-PROG), 11 $\alpha$ -hidroxi-deoxicorticosterona (11 $\alpha$ -OH-DOC), 11 $\alpha$ -hidroxi-testosterona (11 $\alpha$ -OH-TEST), 11 $\alpha$ -hidroxi-dehidroepiandrosterona (11 $\alpha$ -OH-DHEA), 11 $\alpha$ -hidroxi-4-androsten-3,17-diona (11 $\alpha$ -OH-AD) y 11 $\alpha$ -hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona (11 $\alpha$ -OH-ADD).

Hasta la fecha estos compuestos hidroxilados no se podían sintetizar directamente desde materias primas de bajo coste, como los esteroides naturales, en un solo paso, ya que la hidroxilación se realizaba a partir de una sintonia intermedia (AD, ADD, TEST, PROG, etc.) en un proceso llevado a cabo por sistemas CYP/CPR de hongos tales como *Rhizopus oryzae* o *Aspergillus ochraceus*. Una de las ventajas de la presente invención es que permite obtener esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados a partir de esteroides naturales en un único proceso de fermentación.

Además, cuando se emplean hongos o levaduras para la producción de estos compuestos se generan muchos productos secundarios que complican la purificación del derivado hidroxilado, lo que hace descender drásticamente el rendimiento del proceso. Sin embargo la presente invención representa una solución a este problema, ya que las bacterias recombinantes desarrolladas son capaces de hidroxilar en posición 11 $\alpha$  compuestos con estructura esteroidea, tanto a partir de sintonas como de esteroides naturales, generando compuestos esteroideos 11 $\alpha$  hidroxilados de elevada pureza con un alto rendimiento de producción gracias a una drástica reducción de los productos secundarios.

Para el desarrollo de las bacterias recombinantes de la invención se ha partido de células de actinobacterias, preferiblemente de *Corynebacterium glutamicum* R31 o *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, donde se han expresado de forma heteróloga, mediante un operón sintético, las secuencias de ADN que codifican las enzimas implicadas en la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa en el hongo *R. oryzae*. En concreto, dichas enzimas son un citocromo P450 (CYP509C12) y su correspondiente citocromo reductasa dependiente de NADPH (RoCPR1). Ambas enzimas han sido expresadas en dichas bacterias mediante el diseño y construcción de un operón que comprende el ADN codificante para dicho citocromo y dicha reductasa y en el que además se han

introducido ciertas modificaciones/mejoras para su expresión en bacterias, como son la optimización de codones, sitios de restricción, secuencias consenso, etc.

Adicionalmente, las cepas hospedadoras de *M. smegmatis* empleadas en la presente  
5 invención como células de partida son, preferiblemente, mutantes que producen  
sintonas AD y ADD a partir de colesterol y fitoesteroles. Así, en la presente invención  
se han desarrollado biocatalizadores bacterianos recombinantes capaces de hidroxilar  
esteroides en posición 11 $\alpha$  mediante un proceso de biotransformación en un solo  
paso, en el que se pueden emplear como material de partida tanto sintonas no  
10 hidroxiladas como esteroides naturales, lo que no se puede conseguir con hongos o  
levaduras.

Particularmente, la cepa modificada de *C. glutamicum* de la presente invención es  
capaz de producir las sintonas 11 $\alpha$ -hidroxiladas: 11 $\alpha$ -OH-PROG, 11 $\alpha$ -OH-DOC, 11 $\alpha$ -  
15 OH-TEST, 11 $\alpha$ -OH-DHEA, 11 $\alpha$ -OH-AD y 11 $\alpha$ -OH-ADD sustancialmente puras, a partir  
de sus correspondientes precursores (sintonas) no hidroxiladas PROG, DOC, TEST,  
DHEA, AD y ADD, respectivamente. La cepa modificada de *M. smegmatis* CECT 8331  
de la presente invención es capaz de producir la sintona 11 $\alpha$ -hidroxilada 11 $\alpha$ -OH-  
ADD sustancialmente pura, a partir de esteroides naturales. La cepa modificada de *M.*  
20 *smegmatis* CECT 8332 de la presente invención es capaz de producir la sintona  
11 $\alpha$ -hidroxilada 11 $\alpha$ -OH-AD sustancialmente pura, a partir de esteroides naturales.

Las ventajas derivadas de la presente invención, en concreto de la utilización de  
bacterias frente a organismos eucariotas, son por tanto:

- 25
- El hecho de transferir esta capacidad de 11 $\alpha$  hidroxilación de esteroides a una  
bacteria hace posible obtener el esteroide de interés industrial hidroxilado en  
posición 11 $\alpha$  con una mayor pureza y eficiencia gracias a una drástica  
reducción de los productos secundarios de reacción, como sin embargo no  
30 ocurre utilizando directamente hongos o levaduras, los cuales modifican  
sustratos esteroideos en diversas posiciones contaminando las muestras y  
dificultando su purificación. La 11 $\alpha$ -hidroxilación llevada a cabo por las  
bacterias de la invención facilita los procesos de recuperación del producto, al  
reducirse los subproductos; y mejora los rendimientos de producción al permitir  
35 la obtención de un producto con mayor grado de pureza.

- Permiten la obtención de derivados esteroideos 11 $\alpha$  hidroxilados, preferiblemente 11 $\alpha$ -OH-ADD y 11 $\alpha$ -OH-AD, a partir de esteroides naturales en un único proceso de fermentación, al contrario de lo que ocurre con hongos y levaduras donde el proceso se ha de dar en dos pasos (desde la materia prima a la sintona y de ésta a su derivado 11 $\alpha$  hidroxilado).

Por todo ello, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una construcción génica o genética que comprende una secuencia nucleotídica codificante para el citocromo CYP509C12 de *Rhizopus oryzae* y una secuencia nucleotídica codificante para la reductasa RoCPR1 de *R. oryzae*. De ahora en adelante se hará referencia a este aspecto como "construcción génica de la invención".

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la secuencia nucleotídica codificante para el citocromo CYP509C12 y la secuencia nucleotídica codificante para la reductasa RoCPR1 de *R. oryzae* se encuentran en forma de operón. Se entiende por "operón" una unidad genética funcional formada por un grupo o complejo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión por medio de los sustratos con los que interaccionan las proteínas codificadas por sus genes. En la presente invención también se hará referencia a este operón como "operón FUN".

La construcción génica de la invención puede comprender además otros elementos reguladores de la expresión génica, tales como por ejemplo aunque sin limitarnos, promotores, reguladores, operadores, terminadores, inductores etc. Un "promotor" es un elemento de control que es una región del ADN con una secuencia que es reconocida por la ARN polimerasa para comenzar la transcripción. Se encuentra inmediatamente antes de los genes estructurales codificantes para CYP509C12 y RoCPR1. El promotor al que se refiere la presente invención puede ser constitutivo o inducible, preferiblemente inducible. Ejemplos de promotores procariotas incluyen, por ejemplo, pero sin limitarnos, los promotores de los genes *trp*, *hps*, *recA*, *lacZ*, *lacI*, *tet*, *gal*, *trc*, o *tac* de *Escherichia coli*, o el promotor del gen de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis*.

Un "operador" es otro elemento de control que es una región del ADN con una secuencia que es reconocida por la proteína reguladora. El operador se sitúa entre la

región promotora y los genes estructurales. Un "regulador" es una secuencia de ADN que codifica para la proteína reguladora que reconoce la secuencia de la región del operador. El gen regulador está cerca de los genes estructurales del operón pero no está inmediatamente al lado. Un "inductor" es el sustrato o compuesto cuya presencia/ausencia induce la expresión del resto de los genes que conforman el operón. Puede actuar activando la expresión, denominándose "activador" o bien reprimiéndola, llamándose "represor".

La construcción génica de la presente invención comprende, preferiblemente, las secuencias nucleotídicas en forma de un operón inducible, entendiéndose por "operón inducible" el que en condiciones normales no se expresa y se activa en respuesta a un agente inductor que funciona como activador, de manera que en el momento en que el inductor se une al operador, se activa el promotor y comienza la transcripción de los genes estructurales. El modelo clásico de este tipo de operón es el operón lactosa. Otros ejemplos de operones inducibles son, aunque sin limitarnos, aquellos que codifican para enzimas que participan en el metabolismo de sustratos como operón maltosa, arabinosa, etc. En la presente invención el operón es preferiblemente inducible por IPTG.

En otra realización preferida, la construcción génica de la invención está comprendida en un vector de expresión. El término "vector de expresión" se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN sin que pierda la capacidad de autorreplicación. El término "vector de expresión" se refiere a un vector de clonación adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico se encuentra, generalmente, unido operativamente a secuencias control. En una realización más preferida, el vector se selecciona del grupo que consiste en: plásmidos, fagos, cósmidos, fagémidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), cromosomas artificiales de bacterias (BAC), cromosomas humanos artificiales (HAC), vectores virales, tales como adenovirus, retrovirus o cualquier otro tipo de molécula de DNA con capacidad para replicarse en el interior de una célula, preferiblemente procariota. En una realización aún más preferida, la construcción génica de la invención se encuentra comprendida en un plásmido. Ejemplos de plásmidos en los que se puede introducir la construcción génica de la invención son, aunque sin limitarnos, pGH, pMV261, pECXK- 99E, etc., preferiblemente pMV261 y pECXK- 99E.

Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diversas secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia aminoacídica. Los términos  
5 “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble  
10 hebra.

Las secuencias nucleotídicas comprendidas en la construcción génica de la invención pueden comprender, adicionalmente a la secuencia codificante, otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarse, secuencias no codificantes en los extremos 5' o 3',  
15 sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente también pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles, por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de él o permitir una mejor purificación del mismo.

20

En otra realización preferida de la construcción génica de la invención, el citocromo Cyp509C12 es el descrito en *European Nucleotide Archive* - EBI EIE80372.1 y la proteína citocromo reductasa RoCPR1 es la descrita en *European Nucleotide Archive* - EBI EIE89541.1.

25

En una realización más preferida, las secuencias nucleotídicas codificantes para el citocromo CYP509C12 y la reductasa RoCPR1 de *Rhizopus oryzae* se encuentran optimizadas para su expresión en bacterias, es decir, los codones de dichas secuencias nucleotídicas se encuentran optimizados. En una realización aún más  
30 preferida, la secuencia nucleotídica codificante para el citocromo CYP509C12 es la SEQ ID NO: 1. En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica codificante para la reductasa RoCPR1 es la SEQ ID NO: 2.

En otra realización preferida, la construcción génica de la invención además  
35 comprende una secuencia consenso para un sitio de unión al ribosoma o secuencia

*Shine Dalgarno* aguas arriba (“upstream”) de cada uno de los codones de inicio (ATG) de cada secuencia nucleotídica, para conseguir la traducción óptima del ARNm en bacterias. En una realización más preferida, esta secuencia consenso se localiza 6 pb (6 nucleótidos) aguas arriba de cada uno de los codones de inicio de cada secuencia nucleotídica. En una realización aún más preferida, esta secuencia consenso es la SEQ ID NO: 3.

En otra realización preferida, la construcción génica de la invención además comprende al menos dos sitios de restricción para facilitar diferentes opciones de clonación. Ejemplos de sitios de restricción que pueden ser introducidos en la construcción génica de la invención son, aunque sin limitarnos, *Bam*HI, *Pst*I, *Sac*I, *Nco*I, *Pvu*II, *Avr*II, *Mfe*I, *Nde*I, *Eco*RI y/o *Xba*I.

En otra realización preferida, la construcción génica de la invención además comprende un codón que da lugar a una alanina situada en la segunda posición de cada una de las dos proteínas traducidas. De esta manera, se aumenta la traducción de las proteínas recombinantes en los ribosomas bacterianos. Codones que dan lugar a una alanina son GCU, GCC, GCA o GCG.

Un ejemplo de disposición estructural de la construcción génica de la invención se muestra en la Fig. 1.

La construcción génica de la invención se puede introducir en una célula bacteriana de tal manera que dicha construcción se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante, por ejemplo, un plásmido, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. La construcción génica de la invención puede comprender cualquier medio o elemento para asegurar su autorreplicación. De forma alternativa, la construcción génica de la invención puede ser una que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una célula bacteriana que comprende y expresa la construcción génica de la invención, de ahora en adelante “célula bacteriana de la invención” o “célula de la invención”.

La célula bacteriana de la invención expresa el citocromo CYP509C12 y la reductasa RoCPR1 de *Rhizopus oryzae* porque comprende la construcción génica de la invención, en forma autorreplicante o integrada en su cromosoma. El término “expresión” incluye cualquier etapa implicada en la producción de estas enzimas que  
5 incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación post-transcripcional, traducción, modificación post-traducciona, y secreción.

La célula bacteriana ha de ser transformada en una célula competente, preferiblemente electrocompetente, para la posterior introducción de la construcción  
10 génica de la invención. Métodos para producir células electrocompetentes son bien conocidos por los expertos en la materia. Preferiblemente, el método empleado en la presente invención es RbCl y choque térmico o el descrito en Parish y Stoker (1998, *Mycobacteria Protocols*. Totowa, N.J., Humana Press).

15 Son bien conocidos en la técnica diversos métodos para la transformación de células bacterianas con construcciones génicas. El método preferiblemente empleado en la presente invención para la introducción de la construcción génica de la invención en una célula bacteriana es la electroporación.

20 En otra realización preferida, la célula bacteriana de la invención es una célula de actinobacterias. En una realización más preferida, dicha célula es una célula de la especie *Corynebacterium glutamicum*, aún más preferiblemente *C. glutamicum* R31. En otra realización preferida, dicha célula es una célula de la especie *Mycobacterium smegmatis*, aún más preferiblemente *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155.

25

En una realización más preferida, la célula bacteriana de la invención de la especie *Mycobacterium smegmatis* además comprende inactivada funcionalmente o  
delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica el componente reductasa de la enzima 3-cetosteroide-9 $\alpha$ -hidroxilasa. En  
30 una realización aún más preferida, esta célula que comprende inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica el componente reductasa de la enzima 3-cetosteroide 9 $\alpha$ -hidroxilasa es la célula de *M. smegmatis* CECT 8331.

En otra realización preferida, esta célula de la invención de la especie *Mycobacterium smegmatis* que además comprende inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica el componente reductasa de la enzima 3-cetosteroide-9 $\alpha$ -hidroxilasa, además  
5 comprende inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica la enzima 3-cetosteroide- $\Delta$ 1-deshidrogenasa. En una realización aún más preferida, esta célula que comprende inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica el componente reductasa de la enzima 3-  
10 cetosteroide 9 $\alpha$ -hidroxilasa y que además comprende inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica la enzima 3-cetosteroide- $\Delta$ 1-deshidrogenasa es la célula de *M. smegmatis* CECT 8332.

15 Estas cepas CECT 8331 y CECT 8332, descritas en WO2015128534, tienen bloqueada la ruta de degradación del colesterol o fitosteroles, por lo que no sigue la degradación del compuesto y se acumula ADD (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155  $\Delta$ 6039, CECT 8331) y AD (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155  $\Delta$ 6039 $\Delta$ 5941, CECT 8332). Estas cepas se utilizan, preferiblemente, como células de partida en esta invención para el desarrollo  
20 de la célula bacteriana de la invención que comprende la construcción génica de la invención.

La bacteria salvaje *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 no puede utilizar las sustancias AD y ADD como fuente de carbono cuando dichas sustancias se añaden a un medio de cultivo, a  
25 pesar de ser intermediarios del catabolismo bacteriano del colesterol. De esta manera, la bacteria *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 es una bacteria ideal para la producción de las AD y ADD intermedias necesarias para la producción de sus correspondientes derivados hidroxilados, pues una vez secretadas al medio no podrán ser catabolizadas por el metabolismo de la bacteria.

30

El término "deleción de un gen" tal y como se emplea en la presente invención se refiere a la eliminación total o parcial de un gen mediante la eliminación total o parcial de la secuencia de ADN que caracteriza ese gen en el genoma de una bacteria.

El término "secuencia de nucleótidos funcionalmente inactivada" tal y como se emplea en la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que no es capaz de ejercer su funcionalidad, es decir, no es capaz de proporcionar una enzima funcional.

5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula bacteriana de la invención para la producción de esteroides  $11\alpha$  hidroxilados, compuestos esteroideos  $11\alpha$  hidroxilados o derivados de los mismos, o sintonas  $11\alpha$  hidroxiladas.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, los esteroides  $11\alpha$  hidroxilados o las sintonas  $11\alpha$  hidroxiladas se producen a partir de sintonas no

10 hidroxiladas. En una realización más preferida, las sintonas  $11\alpha$  hidroxiladas producidas son  $11\alpha$ -OH-PROG,  $11\alpha$ -OH-DOC,  $11\alpha$ -OH-TEST,  $11\alpha$ -OH-DHEA,  $11\alpha$ -OH-AD y/o  $11\alpha$ -OH-ADD y las sintonas no hidroxiladas a partir de las cuales se producen las primeras son PROG, DOC, TEST, DHEA, AD y/o ADD, respectivamente. En una realización aún más preferida, la célula productora de estas sintonas  $11\alpha$

15 hidroxiladas indicadas, preferiblemente de  $11\alpha$ -OH-PROG a partir de PROG, es la célula de la invención de la especie *C. glutamicum*.

En otra realización preferida, la sintona  $11\alpha$  hidroxilada producida es  $11\alpha$ -OH-ADD y se produce a partir de esteroides naturales. En una realización más preferida, la célula

20 bacteriana productora de esta sintona  $11\alpha$  hidroxilada indicada es la célula de la invención de la especie *M. smegmatis* que además comprende inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica el componente reductasa de la enzima 3-cetosteroides- $9\alpha$ -hidroxilasa, preferiblemente la cepa CECT 8331.

25 En otra realización preferida, la sintona  $11\alpha$  hidroxilada producida es  $11\alpha$ -OH-AD y se produce a partir de esteroides naturales. En una realización más preferida, la célula bacteriana productora de esta sintona  $11\alpha$  hidroxilada indicada es la célula de la invención de la especie *M. smegmatis* que además comprende inactivada

30 funcionalmente o delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica el componente reductasa de la enzima 3-cetosteroides- $9\alpha$ -hidroxilasa y al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica la enzima 3-cetosteroides- $\Delta$ 1-deshidrogenasa, preferiblemente la cepa CECT 8332.

35

Los “esteroles naturales” a los que se refiere la presente invención son, preferiblemente, colesterol o fitoesteroles, aunque otros esteroides 3- $\beta$  alcoholes podrían ser también empleados como material de partida. Ejemplos de fitoesteroles son, aunque sin limitarnos, sitoesterol, estigmasterol, campesterol o brasicasterol. Los  
5 esteroles naturales empleados en la presente invención pueden ser solamente colesterol o un fitoesterol, o bien una mezcla de fitoesteroles.

Los “esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados” obtenibles según la presente invención son aquellos compuestos con estructura esteroidea hidroxilados en posición 11 $\alpha$ , preferentemente  
10 aquellos que forman parte de las familias de Estrógenos, Andrógenos, Progestágenos y Glucocorticoides; por ejemplo, estrona, estradiol, testosterona o fluoximestrona, entre otros.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de biotransformación microbiana (bacteriana) de sustratos esteroideos en sus correspondientes derivados  
15 11 $\alpha$  hidroxilados o procedimiento para la producción de esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados o sintonas 11 $\alpha$  hidroxiladas que comprende las etapas de:

- a. poner en contacto un cultivo de la célula bacteriana de la invención con un  
20 sustrato esteroideo,
- b. incubar la mezcla del paso (a) en condiciones de fermentación, y
- c. separar del medio de cultivo los esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados o las sintonas 11 $\alpha$  hidroxiladas producidos tras la incubación del paso (b).

25 De ahora en adelante se hará referencia a este procedimiento como “procedimiento o método de la invención”.

El procedimiento de la invención se puede llevar a cabo tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial, aunque preferiblemente se lleva a cabo a nivel industrial en un  
30 biorreactor.

En una realización preferida del método de la invención, el medio de cultivo del paso (a) comprende una fuente de carbono adicional, más preferiblemente glicerol.

En otra realización preferida, el medio de cultivo del paso (a) comprende un tensioactivo. Dicho tensioactivo se selecciona, aunque sin limitarnos, de entre polisorbato 80 (Tween 80™) o polisorbato 20 (Tween 20™). El medio de cultivo del paso (a) puede comprender también tampón fosfato.

5

En otra realización preferida, el medio de cultivo del paso (a) comprende al menos un antibiótico. Dicho antibiótico se selecciona, aunque sin limitarnos, de entre kanamicina, gentamicina, o cualquiera de sus combinaciones.

En general, el cultivo del paso (a) puede realizarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en medio líquido o en medio sólido. Los medios y condiciones de cultivo para el crecimiento de células bacterianas son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. El medio de cultivo comprende todos los elementos y nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia de la célula bacteriana de la invención y para favorecer su actividad fermentadora. Así, dicho medio de cultivo podrá comprender, aunque sin limitarnos, fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa, sacarosa, glicerol o manitol), fuentes de vitaminas, aminoácidos, sales inorgánicas, etc.

Para que la célula bacteriana de la invención crezca adecuadamente en el medio de cultivo, éste debe reunir una serie de condiciones como son temperatura, agitación, grado de humedad, y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad (pH). Asimismo, el medio de cultivo debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

En cuanto a las condiciones de fermentación adecuadas para ser aplicadas en el paso (b) del procedimiento de la invención, preferiblemente dichas condiciones comprenden la agitación e incubación a una temperatura de entre 30 y 37°C. Más preferiblemente, la T<sup>a</sup> es de 30°C cuando la célula bacteriana de la invención es de la especie *C. glutamicum* y de 37°C cuando la célula bacteriana de la invención es de la especie *M. smegmatis*. La incubación se realiza preferiblemente durante un tiempo de entre 25 y 35 h, más preferiblemente durante 30 h cuando la célula bacteriana de la invención es de la especie *C. glutamicum*. Los cultivos de la célula bacteriana de la invención deben ser inducidos por el compuesto activador correspondiente si el promotor empleado en la construcción génica de la invención es inducible. Así, preferiblemente el cultivo bacteriano en el método de la invención es inducido con IPTG.

35

En otra realización preferida, el sustrato esteroideo del paso (a) se selecciona de la lista que consiste en: fitoesteroles, colesterol, PROG, DOC, TEST, DHEA, AD o ADD, o cualquiera de sus combinaciones.

5 En una realización más preferida del método de la invención, el sustrato esteroideo de partida del paso (a) son fitoesteroles y/o colesterol, la sintona 11 $\alpha$  hidroxilada producida es 11 $\alpha$ -OH-AD y la célula bacteriana empleada para la producción es la célula de la invención de la especie *M. smegmatis* que además comprende inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de  
10 nucleótidos endógena que codifica el componente reductasa de la enzima 3-cetosteroide 9 $\alpha$ -hidroxilasa y al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica la enzima 3-cetosteroide- $\Delta$ 1-deshidrogenasa, preferiblemente la cepa CECT 8332.

15 En otra realización preferida del método de la invención, el sustrato esteroideo de partida del paso (a) son fitoesteroles y/o colesterol, la sintona 11 $\alpha$ -hidroxilada producida es 11 $\alpha$ -OH-ADD y la célula bacteriana empleada para la producción es la célula de la invención de la especie *M. smegmatis* que además comprende inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de  
20 nucleótidos endógena que codifica el componente reductasa de la enzima 3-cetosteroide 9 $\alpha$ -hidroxilasa, preferiblemente la cepa CECT 8331.

En otra realización preferida del método de la invención, el sustrato esteroideo de partida del paso (a) es AD, ADD, PROG, DOC, DHEA y/o TEST, preferiblemente  
25 PROG, la sintona 11 $\alpha$  hidroxilada producida es 11 $\alpha$ -OH-PROG, 11 $\alpha$ -OH-DOC, 11 $\alpha$ -OH-TEST, 11 $\alpha$ -OH-DHEA, 11 $\alpha$ -OH-AD y/o 11 $\alpha$ -OH-ADD, preferiblemente 11 $\alpha$ -OH-PROG, y la célula bacteriana productora es la célula bacteriana de la invención, más preferiblemente la célula de la invención de la especie *C. glutamicum*.

30 El procedimiento de la invención puede comprender otras etapas o pasos adicionales, tales como un paso previo de preparación y esterilización de una mezcla de sintonas o de esteroides naturales o de ambos, preferiblemente en un polialcohol o aceite vegetal, con o sin la adición de sales minerales y/o un paso de preparar y crecer un cultivo de la célula bacteriana de la invención previamente a su exposición al sustrato esteroideo.

35

Los esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados o sintonas 11 $\alpha$  hidroxiladas producidas por el procedimiento de la invención se secretan, junto con otros metabolitos o compuestos, en el medio de cultivo, y éstos se pueden recuperar directamente del medio. Así, tras la incubación del paso (b) del método de la invención se puede separar el sedimento  
5 celular para obtener una disolución comprendiendo el/los esteroide/s 11 $\alpha$  hidroxilado/s o la/s sintona/s 11 $\alpha$  hidroxilada/s producida/s. Estos productos se obtienen con una elevada pureza y con un mayor rendimiento de producción que cuando se emplean hongos o levaduras en procesos de biotransformación similares.

Tras la incubación de la etapa (b) del procedimiento de la invención tiene lugar un  
10 paso de extracción en el cual se descartan los sedimentos y se seleccionan los sobrenadantes. Dichos sobrenadantes son posteriormente empleados para obtener los esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados o sintonas 11 $\alpha$  hidroxiladas presentes en los mismos.

Estos compuestos secretados al medio de cultivo por la célula bacteriana de la  
15 invención pueden recuperarse del medio empleando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, extracción, evaporación y/o precipitación.

Estos compuestos producidos por la célula bacteriana de la invención en cultivo  
20 pueden purificarse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, HPLC, HPLC-DAD, TLC, LC-MS, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatoenfoco, y exclusión molecular), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato amónico),  
25 SDS-PAGE, precipitación o extracción, con el fin de obtener los esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados o sintonas 11 $\alpha$  hidroxiladas sustancialmente puros.

Estos compuestos producidos por la célula bacteriana de la invención en cultivo  
pueden detectarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Estos  
30 procedimientos de detección pueden incluir, por ejemplo aunque sin limitarnos, cromatografía, RMN, espectrometría de masas, o similares.

La presente invención se refiere, por tanto, a cepas modificadas genéticamente de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 que contienen un operón sintético (FUN) que codifica el citocromo  
35 CYP509C12 y la citocromo reductasa RoCPR1 de *R. oryzae*, así como a los procesos

para producir 11 $\alpha$ -OH-AD y 11 $\alpha$ -OH-ADD a partir de esteroides naturales, como colesterol o fitoesteroides, utilizando dichas cepas modificadas.

La presente invención también se refiere a cepas modificadas genéticamente de *C. glutamicum* R31 que contienen un operón sintético (FUN) que codifica el citocromo CYP509C12 y la citocromo reductasa RoCPR1 de *R. oryzae*, así como a los procesos para producir 11 $\alpha$ -OH-PROG, 11 $\alpha$ -OH-DOC, 11 $\alpha$ -OH-DHEA y/o 11 $\alpha$ -OH-TEST, entre otras, de forma sustancialmente pura a partir de las sintonas correspondientes.

10 La invención se refiere al uso de la cepa recombinante *M. smegmatis* CECT 8331, la cual es una cepa mutante derivada de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica el componente reductasa de la enzima 3-cetosteroides 9 $\alpha$ -hidroxilasa inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente, que porta un plásmido que comprende el operón FUN, la cual es capaz de producir 11 $\alpha$ -OH-ADD de manera sustancialmente pura. La invención se refiere al uso de dicha cepa bacteriana para la producción de 11 $\alpha$ -OH-ADD en forma sustancialmente pura mediante fermentación de esteroides naturales.

20 La invención se refiere al uso de la cepa recombinante *M. smegmatis* CECT 8332, la cual es una cepa mutante derivada de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica el componente reductasa de la enzima 3-cetosteroides-9 $\alpha$ -hidroxilasa inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente, así como al menos una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima 3-cetosteroides- $\Delta$ 1-deshidrogenasa inactivada funcionalmente o delecionada total o parcialmente, que porta un plásmido que comprende el operón FUN, la cual es capaz de producir 11 $\alpha$ -OH-AD de manera sustancialmente pura. La invención se refiere al uso de dicha cepa bacteriana para la producción de 11 $\alpha$ -OH-AD en forma sustancialmente pura mediante fermentación de esteroides naturales.

30 La invención se refiere al uso de la cepa recombinante *C. glutamicum* R31 que porta un plásmido que comprende el operón FUN, la cual es capaz de producir esteroides hidroxilados en posición 11 $\alpha$  (11 $\alpha$ -OH-PROG, 11 $\alpha$ -OH-DOC, 11 $\alpha$ -OH-TEST, 11 $\alpha$ -OH-DHEA, 11 $\alpha$ -OH-AD y 11 $\alpha$ -OH-ADD) a partir de sus sintonas correspondientes (PROG, DOC, TEST, DHEA, AD y ADD, respectivamente) de manera sustancialmente pura. La invención se refiere al uso de dicha cepa bacteriana para la producción de 11 $\alpha$ -OH-

PROG, 11 $\alpha$ -OH-DOC, 11 $\alpha$ -OH-TEST, 11 $\alpha$ -OH-DHEA, 11 $\alpha$ -OH-AD y 11 $\alpha$ -OH-ADD en forma sustancialmente pura a partir de sus sintonas correspondientes: PROG, DOC, TEST, DHEA, AD y ADD, respectivamente.

- 5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y  
10 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Esquema del operón FUN.

- 15 FIG. 2. Biotransformación de PROG en 11 $\alpha$ -OH-PROG utilizando la cepa *C. glutamicum* R31 (pXKFUN). Se representa el consumo de PROG (línea gris punteada) y la aparición de 11 $\alpha$ -OH-PROG (línea negra continua).

- FIG. 3. Cromatogramas de LC-MS mostrando la producción de 11 $\alpha$ -OH-progesterona a partir de progesterona en la cepa *C. glutamicum* R31 (pECXK-99E) utilizada como control negativo (A) y la cepa *C. glutamicum* R31 (pXKFUN) (B). PROG, 11 $\alpha$ -OH-PROG y TEST, que ha sido utilizado como estándar interno (ISTD). Espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) presentes en la muestra (línea de arriba). Espectro de masas del ion 315 característico del compuesto PROG (línea del medio). Espectro de masas del ion 331.3 característico del compuesto 11 $\alpha$ -OH-PROG (línea de abajo).  
20  
25

- FIG. 4. Biotransformación de colesterol (CHO) en 11 $\alpha$ -OH-ADD utilizando la cepa *M. smegmatis* CECT 8331 (pMVFUN). Se muestra el consumo de CHO y la aparición  
30 de 11 $\alpha$ -OH-ADD y otros subproductos: ADD y 11 $\alpha$ -OH-AD.

FIG. 5. Biotransformación de fitosteroles (FITO) en 11 $\alpha$ -OH-ADD utilizando la cepa *M. smegmatis* CECT 8331 (pMVFUN). Se muestra el consumo de fitoesteroles y la aparición de 11 $\alpha$ -OH-ADD y otros subproductos: ADD.

FIG. 6. Biotransformación de colesterol (CHO) en 11 $\alpha$ -OH-AD utilizando la cepa *M. smegmatis* CECT 8332 (pMVFUN). Se muestra el consumo de CHO y la aparición de 11 $\alpha$ -OH-AD y otros subproductos: AD, 11 $\alpha$ -OH-ADD y 4-HBC (22OH-23,24-bisnorchol-4-en-3-ona).

5

FIG. 7. Biotransformación de fitosteroles (FITO) en 11 $\alpha$ -OH-AD utilizando la cepa *M. smegmatis* CECT 8332 (pMVFUN). Se muestra el consumo de FITO y la aparición de 11 $\alpha$ -OH-AD y otros subproductos: AD y 4-HBC (22OH-23,24-bisnorchol-4-en-3-ona).

10

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la efectividad de las células bacterianas recombinantes diseñadas en la producción de esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados o sus derivados, tanto a partir de sintonas como de esteroides naturales.

### EJEMPLO 1. Bacterias utilizadas y métodos de cultivo.

20

Las cepas bacterianas utilizadas en esta invención son:

1.- *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 (*ept-1*, mutante mc<sup>2</sup> eficiente para electroporación).

25

2.- *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155  $\Delta$ 6039 (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 con el gen MSMEG\_6039 deletado) (Cepa CECT8331).

3.- *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155  $\Delta$ 6039 $\Delta$ 5941 (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 con los genes MSMEG\_6039 y MSMEG\_5941 deletados) (Cepa CECT8332).

30

4.- *Corynebacterium glutamicum* R31 (MeLisR, AecR eficiente para electroporación).

5.- *Escherichia coli* DH10B (F-, *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), *f80* $\Delta$ *lacZDM15* $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara, leu*) 7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *nupG*,  $\lambda$ ) (Invitrogen).

35

Los plásmidos empleados en esta invención para el clonaje, mutación y expresión génica, junto con sus características más relevantes se muestran a continuación:

- 1.- Plásmido pMV261 (Vector de expresión en micobacterias, bajo el control del promotor  $P_{Hsp60}$ , KmR).
- 2.- Plásmido pECXK-99E (Vector bifuncional *E. coli*/*C. glutamicum*, que contiene el gen *lacI<sup>q</sup>*, KmR).

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en esta invención se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121 °C y 1 atm de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles *Millipore* de 0.2 µm de diámetro.

El medio rico utilizado para cultivar las células de *E. coli* fue el medio *Lysogenic Broth* (LB). Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB al que se añadió *Bacto Agar* (Pronadisa) al 1.5 % (p/v). En caso de ser necesario se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (100 µg ml<sup>-1</sup>), kanamicina (50 µg ml<sup>-1</sup>), cloranfenicol (20 µg ml<sup>-1</sup>). Las células de *E. coli* se cultivaron a 37 °C. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 250 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm (DO<sub>600</sub>) empleando un espectrofotómetro UVMini-1240 (Shimadzu).

Para el cultivo de micobacterias se utilizaron los medios ricos *Bacto Middlebrook 7H10 Agar* (7H10) (Difco) como medio sólido, y *Middlebrook 7H9 Broth* (7H9) (Difco) como medio líquido. Los medios 7H9 y 7H10 fueron suplidos con 0,2 % (v/v) de glicerol y 10 % (v/v) de *Middlebrook ADC Enrichment* (ADC) (Difco) (7H9/Gli/ADC y 7H10/Gli/ADC). En todos los cultivos en medio líquido se añadió 0,05 % (v/v) de Tween80 (Sigma) previamente autoclavado para evitar la agregación de las células (7H9/Gli/ADC/Tween). En caso de ser necesario se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones: kanamicina (20 µg ml<sup>-1</sup>) y gentamicina (5 µg ml<sup>-1</sup>). Las células de *M. smegmatis* se cultivaron a 37 °C. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 250 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm (DO<sub>600</sub>) empleando un espectrofotómetro UVMini-1240 (Shimadzu).

Para el cultivo de corinebacterias se utilizaron los medios ricos *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Difco) como medio sólido y *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Difco) como medio líquido. En caso de ser necesario se añadió kanamicina ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Las células de *C. glutamicum* se cultivaron a  $30^\circ\text{C}$ . Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 250 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ) empleando un espectrofotómetro UVMini-1240 (Shimadzu).

## **EJEMPLO 2. Métodos de transformación genética para la construcción de las cepas recombinantes.**

### **A.- TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *E. coli***

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación tras hacerlas competentes mediante el método de RbCl y choque térmico.

### **B.- TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *M. smegmatis***

#### **1.- Preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis*.**

La preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis* se llevó a cabo según un protocolo previamente descrito (Parish y Stoker, 1998, Mycobacteria Protocols. Totowa, N.J., Humana Press). Se parte de un preinóculo en fase estacionaria (aproximadamente 30 h) (10 ml en matraz de 100 ml) en medio 7H9/Gli/ADC/Tween. Se inocula medio fresco con  $\text{DO}_{600}$  0.01 (200 ml 7H9/Gli/ADC/Tween en matraz de 1l) y se incuba en agitación (200 rpm) a  $30^\circ\text{C}$  hasta una  $\text{DO}_{600}$  de 0.8-1 (18 h de cultivo aproximadamente). A continuación, el cultivo se mantiene 1,5 h en hielo y se centrifuga en 4 tubos cónicos de 50 ml a  $3000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 min. Una vez decantado el sobrenadante, se resuspenden las células volteando gentilmente en 200 ml de una solución 10 % (v/v) de glicerol y 0,05 % (v/v) de Tween-80 (Gli/Tween) enfriada en hielo. Seguidamente se centrifuga la suspensión de células, se retira el sobrenadante y se resuspenden de nuevo en 100 ml de la misma solución Gli/Tween. Tras un tercer paso de centrifugación se añaden 25 ml de Gli/Tween. Las células se resuspenden volteando y se dejan reposar para sedimentar los agregados. Posteriormente se toma la suspensión sin los agregados con una pipeta estéril. La suspensión se lleva a un tubo cónico limpio enfriado en hielo y se centrifuga.

Finalmente se retira el sobrenadante, las células se resuspenden en 1,5 ml de Gli/Tween frío y se reparten en alícuotas de 200 µl que se guardan a -80 °C hasta su uso.

5 2.- Transformación de células de *M. smegmatis* mediante electroporación.

A una alícuota de 200 µl de células electrocompetentes se le añade 1 µg del DNA con el que se van a transformar. Esta mezcla se deposita en una cubeta de electroporación (*Cell Projects*, 50 x 2 mm) y se incuba durante 10 min en hielo. A  
10 continuación se electropora en un electroporador *Gene Pulser* (Biorad) a 2.5 kV, 25 µF y 1000 Ω y se incuba la cubeta en hielo otros 10 min. Posteriormente, se añade 1 ml de medio 7H9/Gli/ADC/Tween a la cubeta y el líquido se pasa a un tubo cónico de 15 ml. Las células se incuban 4 h a 37 °C en agitación (250 rpm) antes de sembrarlas en medio sólido 7H10/Gli/ADC con los antibióticos necesarios.

15

C.- TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *C. glutamicum*

1.- Preparación de células electrocompetentes de *C. glutamicum*.

20 Para la preparación de las células se parte de un preinóculo en fase estacionaria (aproximadamente 30 h) (10 ml de medio en un matraz de 100 ml) en medio TSB. Se inocula el medio fresco con una DO<sub>600</sub> 0.01 (200 ml TSB en matraz de 1 l) y se incuba en agitación (200 rpm) a 30 °C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.2-1.5 (6 h de cultivo aproximadamente). A continuación, el cultivo se mantiene 30 min en hielo y se  
25 centrifuga en 4 tubos cónicos de 50 ml a 3000 x g a 4 °C durante 10 min. Una vez decantado el sobrenadante, se resuspenden las células volteando gentilmente en 200 ml de una solución 10 % (v/v) de glicerol enfriada en hielo. Seguidamente se centrifuga la suspensión de células, se retira el sobrenadante y se resuspenden de nuevo en 100 ml de la misma solución. Tras un tercer paso de centrifugación se añaden 25 ml de 10  
30 % (v/v) de glicerol. Las células se resuspenden volteándolas y se dejan reposar para sedimentar los agregados. Posteriormente se toma la suspensión sin los agregados con una pipeta estéril. La suspensión se lleva a un tubo cónico limpio enfriado en hielo y se centrifuga. Finalmente se retira el sobrenadante, las células se resuspenden en 2,0 ml de 10 % (v/v) de glicerol y se reparten en alícuotas de 50 µl que se guardan a  
35 -80 °C hasta su uso.

## 2.- Transformación de células de *C. glutamicum* mediante electroporación.

A una alícuota de 50  $\mu$ l de células electrocompetentes se añade 1  $\mu$ g del DNA con que se va a transformar. Esta mezcla se pasa a una cubeta de electroporación (*Cell Projects*, 50 x 2 mm) y se incuba durante 10 min en hielo. A continuación se electropora en un electroporador *Gene Pulser* (Biorad) a 2.5 kV, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ . Posteriormente se añade 1 ml de medio TSB a la cubeta y se pasa a un tubo cónico de 15 ml. Las células se incuban 1 h a 30 °C en agitación (200 rpm) antes de sembrarlas en medio sólido TSA con los antibióticos necesarios.

### **EJEMPLO 3. Diseño y construcción del operón FUN y de los plásmidos recombinantes que lo portan.**

Para llevar a cabo la producción heteróloga de la actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa en bacterias se diseñó el operón sintético denominado FUN, el cual contiene los genes *cyp509C12* y *roCPR1* de *R. oryzae*, que codifican el citocromo CYP509C12 con actividad 11 $\alpha$ -hidroxilasa y la proteína citocromo reductasa RoCPR1 necesaria para la actividad del mismo, respectivamente. El uso de codones se optimizó de forma manual para las bacterias *Mycobacterium* y *Rhodococcus*, conservando un porcentaje de identidad en nucleótidos del 82,80 % para el caso del citocromo y del 83,24 % para el caso de la CPR. Para conseguir la traducción óptima del ARNm se añadió una secuencia *Shine Dalgarno/RBS* (SEQ ID NO. 3: AAAGGGAG) 6 nucleótidos aguas arriba a partir de los respectivos codones de inicio de cada gen. Se añadieron además diversos sitios de restricción para facilitar diferentes opciones de clonación. Además se añadió una alanina como segundo aminoácido para aumentar la traducción de las proteínas. El operón diseñado se sintetizó mediante síntesis química y se clonó inicialmente en el plásmido pGH generando el plásmido recombinante pGH-FUN que se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH10B. El plásmido pGH-FUN se secuenció para verificar que la secuencia del operón clonado era correcta. El esquema del operón FUN puede verse en la figura 1.

El plásmido pGH-FUN se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI para liberar el fragmento que contiene el operón FUN y éste fue subclonado en el plásmido pMV261, con doble origen de replicación para *E. coli/Mycobacterium*; resultando el vector pMVFUN que

expresará los genes bajo control del promotor constitutivo  $P_{hps}$ . El plásmido pMVFUN se clonó inicialmente en *E. coli* DH10B donde se secuenció para comprobar que la construcción era correcta. Los plásmidos pMV261 y pMVFUN fueron posteriormente aislados de las cepas de *E. coli* portadoras y transformados en *M. smegmatis* mediante electroporación.

Por otro lado, el plásmido pGH-FUN se digirió con *SacI* y *XbaI* para liberar el fragmento que contiene el operón FUN y éste fue subclonado en el plásmido pECXK-99E, con doble origen de replicación para *E. coli/C. glutamicum* resultando el vector pXKFUN que expresará los genes bajo control del promotor *P<sub>trc</sub>*, inducible por IPTG. El plásmido pXKFUN se clonó inicialmente en *E. coli* DH10B donde se secuenció para comprobar que la construcción era correcta. Los plásmidos pECXK-99E y pXKFUN fueron posteriormente aislados de las cepas de *E. coli* portadoras y transformados en *C. glutamicum* mediante electroporación.

15

#### **EJEMPLO 4. Técnicas de análisis de los esteroides.**

##### **1.- Métodos de extracción**

20 A.- Extracción de los esteroides en sistemas de reacción con células en reposo.

La extracción de los esteroides a analizar a partir de sistemas de reacción con células en reposo se llevó a cabo recogiendo alícuotas (1 ml) de la reacción a las que se le añadieron los correspondientes patrones internos (testosterona) a la concentración de interés (250  $\mu$ M) antes de comenzar el proceso de extracción. Las muestras con el patrón interno se extraen en 10 ml de cloroformo y se homogenizan empleando un homogeneizador *Bullet Blender 50-DX-CE* a velocidad 12, durante 3 min. Tras la ruptura, las células se centrifugan 10 min a 4000 x g a 4 °C y posteriormente los tubos se congelan a -80°C durante 10-15 min para separar correctamente las dos fases. La fase orgánica se recoge, se pasa a tubos cónicos de 50 ml y se evapora a totalidad a 70 °C.

25  
30

B.- Extracción de los esteroides en sistemas de reacción con células en cultivo.

La extracción de esteroides a analizar por las diferentes técnicas cromatográficas en sistemas de reacción con células en cultivo se llevó a cabo recogiendo alícuotas (0,2 ml) de los diferentes cultivos a los que se le añadieron los correspondientes patrones internos a la concentración de interés, indicados en cada caso, antes de comenzar el proceso de extracción. Las muestras con el patrón interno se extraen en 0,5 ml de cloroformo y se homogenizan empleando un vórtex durante 30 s. Las muestras se congelan a -80°C durante 10-15 min para separar correctamente las dos fases. La fase orgánica se recoge, se pasa a tubos eppendorf de 2 ml y se evapora a totalidad a 70 °C.

10

## 2.- Métodos cromatográficos

### A.- CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC).

Las placas de TLC utilizadas (Silica gel 60 F254 20 x 20 cm, Merck) se recortan dejando 1 cm de margen en cada lado, 8 cm de carrera y 1 cm de separación entre muestra y muestra. Las diferentes muestras extraídas se resuspenden en acetonitrilo en un volumen de entre 10-20 µl dependiendo de la concentración esperada en cada caso. Para realizar la TLC, 10 µl de cada muestra se cargan sobre la placa de TLC y una mezcla de cloroformo:etanol (95:5) (Merck) se usa como fase móvil. Los diferentes esteroides de las biotransformaciones se revelan con una solución del 20 % (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

20

### B.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A DETECTOR DE FOTODIODOS EN SERIE (HPLC-DAD) Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS).

25

La detección y cuantificación de los productos generados en las reacciones de biotransformación esteroideas se realizó mediante HPLC-DAD-MS usando un equipo de cromatografía líquida (Surveyor Plus LC) equipada con inyector automático acoplado en serie a un detector DAD que permitió monitorizar la elución a DO<sub>245</sub> y con una trampa iónica (LXQ) equipada con una fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI) y una fuente de isoelectronebulización (IES), todo ello suministrado por Thermo Electron (San Jose, CA, EEUU). Los datos se procesaron con el software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EEUU). La separación se realiza

30

35

mediante una columna de fase reversa C18 y a un gradiente determinado en cada caso.

**EJEMPLO 5. Biotransformación de PROG en 11 $\alpha$ -OH-PROG utilizando la cepa *C. glutamicum* R31 (pXKFUN).**

Para los ensayos de biotransformación de progesterona (PROG) con células en reposo de *C. glutamicum* R31 (pXKFUN) se empleó tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), al que se le añadieron los esteroides a una concentración final de 0,5 mM, desde una solución de esteroide preparada a 5 mM en 10 % (v/v) de Tyloxapol, siendo por tanto la concentración final del mismo de 1 % (v/v). Se tomaron muestras para analizar la biotransformación de esteroides durante 72 h. Para la obtención de la biomasa empleada en la biotransformación se cultivó un volumen total de 200 ml de células de *C. glutamicum* crecidas en medio TSB durante 30 h a 30 °C y 250 rpm en matraz de 1 l desde una DO<sub>600</sub> de 0,1, empleando un preinóculo de 48 h crecido en medio TSB, a 30 °C y agitado a 250 rpm. En caso de ser necesario se añadieron kanamicina (25  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) y ácido  $\delta$ -aminolevulínico 0,5 mM. Los cultivos fueron inducidos con IPTG 1 mM cuando alcanzaban una DO<sub>600</sub> de 1,5. Dichas células fueron recogidas mediante centrifugación (10 min, 4000 x g) y lavadas dos veces con tampón fosfato 50 mM (pH 7.4).

- Identificación y cuantificación de PROG y 11 $\alpha$ -OH-PROG.

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Mediterranea Sea* C18 (150 mm  $\times$  4.6 mm de diámetro interno, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases móviles empleadas contenían agua y 0.1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico (B). El flujo empleado fue de 1 ml min<sup>-1</sup> y el gradiente lineal utilizado se muestra en la tabla 1.

Tiempo (min)	% A	%B
0	50	50
5	50	50
35	20	80
40	20	80

45	50	50
60	50	50

Tabla 1.

5

Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 50. Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización IES, temperatura del capilar (350 °C), cobertura de nebulización (60 °C), voltaje del capilar (9 V), amplificador (400 Vp), corriente de la fuente (100 µA).

10 Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza. El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de las soluciones madre de PROG y 11α-OH-PROG en concentraciones comprendidas entre 500.000 µM y 15.625 µM, a las que se añadió 250 µM de testosterona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las  
15 muestras a analizar (véase el ejemplo 4, apartado 1). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 500 µl de acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se inyectaron 25 µl para su análisis cromatográfico.

Los resultados de un experimento de biotransformación de PROG en 11α-OH-PROG  
20 pueden verse en las Figuras 2 y 3.

La cepa *C. glutamicum* R31 (pXKFUN) también es capaz de 11α hidroxilar otros esteroides distintos a la PROG y convertirlos en sus correspondientes derivados 11α hidroxilados. Así por ejemplo cuando a la cepa *C. glutamicum* R31 (pXKFUN) se le  
25 suministran como sustrato, en lugar de PROG, sustancias como DOC, TEST, AD o dehidroepiandrosterona (en adelante, DHEA), a una concentración de 0,5 mM, la cepa bacteriana es capaz de sintetizar 11α-OH-DOC, 11α-OH-TEST, 11α-OH-AD u 11α-OH-DHEA, respectivamente, con rendimientos de 41,5 ± 3,6%, 49,3 ± 0,5%, 38,0 ± 7,6% y 22,3 ± 8,7%, respectivamente.

30

**EJEMPLO 6. Biotransformación de CHO en 11α-OH-ADD utilizando la cepa *M. smegmatis* CECT 8331 (pMVFUN).**

Para los ensayos de biotransformación de colesterol con células en crecimiento de *M.*  
35 *smegmatis* CECT 8331 (pMVFUN) se empleó el medio 7H9 sin suplementos (sin

glicerol y sin ADC) al que se le añadió glicerol 18 mM y colesterol a la concentración final de 1 mM, contenidos en 3,6 % (v/v) de Tyloxapol. En caso de ser necesario se añadió kanamicina ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y ácido  $\delta$ -aminolevulínico 0,5 mM desde el momento de la inoculación. Un volumen total de 20 ml de cultivo de células de *M. smegmatis* fueron cultivadas a 37 °C y 250 rpm en matraz de 100 ml desde una  $\text{DO}_{600}$  de 0,1 empleando un preinóculo de 48 h crecido en medio 7H9/Gli/ADC/Tween, a 37 °C y agitado a 250 rpm. Se tomaron muestras para analizar la biotransformación de esteroides y se monitorizó el crecimiento durante 96 h.

10 - Identificación y cuantificación de ADD y 11 $\alpha$ -OH-ADD empleando como sustrato CHO

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Tracer Excel* 120 ODSB C18 (150 mm  $\times$  4,6 mm de diámetro interno, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases móviles empleadas contenían agua y 0,1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0,1 % ácido fórmico (B), isopropanol y 0,1 % ácido fórmico (C). El flujo empleado fue de 1 ml  $\text{min}^{-1}$  y el gradiente lineal utilizado se muestra en la tabla 2.

Tiempo (min)	% A	% B	% C
0	50	50	0
5	50	50	0
15	20	71	9
20	4	87	9
40	0	85	15
41	0	85	15
42	50	50	0
52	50	50	0

Tabla 2.

30

Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 52. Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización APCI, temperatura del capilar 275 °C, temperatura de vaporización 425 °C, voltaje del capilar 39 V, voltaje de descarga de la corona 6.00 kV,

corriente de la fuente 6.00  $\mu\text{A}$  y 15 eV para la energía de disociación por colisión. Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones  
5 de la solución madre de CHO, en concentraciones comprendidas entre 1000.000  $\mu\text{M}$  y 15.625  $\mu\text{M}$ , a las que se añadió 500  $\mu\text{M}$  de testosterona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase el ejemplo 4, apartado 1). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 1500  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se  
10 inyectaron 25  $\mu\text{l}$  para su análisis cromatográfico.

Las cuantificaciones de 11 $\alpha$ -OH-ADD se realizaron mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento con respecto al sustrato (colesterol) como:

15

$$\Psi_{11\alpha\text{-OH-ADD/CHO}} = \frac{A\left(\frac{11\alpha\text{OH-ADD}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha\text{OH-AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha\text{OH-ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{CHO}}{ISTD}\right)\right]}$$

El resultado de un experimento puede verse en la figura 4.

20 **EJEMPLO 7. Biotransformación de FITO en 11 $\alpha$ -OH-ADD utilizando la cepa *M. smegmatis* CECT 8331 (pMVFUN).**

Para los ensayos de biotransformación de fitoesteroles con células en crecimiento de  
25 *M. smegmatis* CECT 8331 (pMVFUN) se empleó el medio 7H9 sin suplementos (sin glicerol y sin ADC) al que se le añadió glicerol 18 mM y los fitoesteroles a la concentración final de 1 mM, contenidos en 3,6 % (v/v) de Tyloxapol. En caso de ser necesario se añadió kanamicina (20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y ácido  $\delta$ -aminolevulínico 0,5 mM desde el momento de la inoculación. Un volumen total de 20 ml de cultivo de células de *M. smegmatis* fueron cultivadas a 37 °C y 250 rpm en matraz de 100 ml desde una  $\text{DO}_{600}$   
30 de 0,1 empleando un preinóculo de 48 h crecido en medio 7H9/Gli/ADC/Tween, a 37 °C y agitado a 250 rpm. Se tomaron muestras para analizar la biotransformación de esteroides y se monitorizó el crecimiento durante 96 h.

- Identificación y cuantificación de ADD y 11 $\alpha$ -OH-ADD empleando como sustrato FITO

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Tracer Excel* 120 ODSB C18 (150 mm  $\times$  4,6 mm de diámetro interno, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases móviles empleadas contenían agua y 0,1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0,1 % ácido fórmico (B), isopropanol y 0,1 % ácido fórmico (C). El flujo empleado fue de 1ml min<sup>-1</sup> y el gradiente lineal utilizado se muestra en la siguiente tabla 3:

10

Tiempo (min)	% A	% B	% C
0	50	50	0
5	50	50	0
15	20	71	9
20	0	91	9
40	0	70	30
41	0	85	15
42	50	50	0
52	50	50	0

15

20

Tabla 3.

Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 52. Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización APCI, temperatura del capilar 275 °C, temperatura de vaporización 425 °C, voltaje del capilar 39 V, voltaje de descarga de la corona 6.00 kV, corriente de la fuente 6.00  $\mu$ A y 15 eV para la energía de disociación por colisión. Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

30

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución madre de FITO, en concentraciones comprendidas entre 1000.000  $\mu$ M y 15.625  $\mu$ M, a las que se añadió 500  $\mu$ M de testosterona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar. Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 1500  $\mu$ l

35

de acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se inyectaron 25  $\mu$ l para su análisis cromatográfico.

Para la preparación del medio de cultivo, como para la recta de calibrado, se prepararon las soluciones de fitosteroles a una concentración de 1 mM empleando para el cálculo el peso molecular del  $\beta$ -sitosterol, el más abundante de los fitosteroles presentes en la mezcla. Sin embargo, para la cuantificación se realizó una corrección basándose en la abundancia relativa de sus componentes:  $\beta$ -sitosterol (83,61 %), campesterol (7,59 %) y estigmasterol (8,79%) y teniendo en cuenta peso molecular de cada uno de ellos se calculó la concentración de los mismos, por lo que en la concentración real en las muestras preparadas a concentración 1 mM (medio inicial de cultivo) era la siguiente: 0,84 mM de  $\beta$ -sitosterol, 0,08 mM de campesterol y 0,09 mM de estigmasterol. En la cuantificación, tanto para el cálculo del consumo como para el cálculo de los rendimientos, se expresa la concentración de fitosteroles como el sumatorio de las concentraciones sus componentes, e.g. para el tiempo inicial la concentración de fitosteroles sería 0,84 + 0,08 + 0,08 = 1 mM). Como puede observarse, aunque esta corrección se realizó, resulta despreciable. Las cuantificaciones de ADD y 11 $\alpha$ OH-ADD se realizaron mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento con respecto al sustrato (fitosteroles) como:

$$\Psi_{11\alpha\text{-OH-ADD}/\text{FITO}} = \frac{A\left(\frac{11\alpha\text{OH-ADD}}{\text{ISTD}}\right)}{\left[A\left(\frac{\text{AD}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{\text{ADD}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{11\alpha\text{OH-AD}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{11\alpha\text{OH-ADD}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{4\text{-HBC}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{1,4\text{-HBC}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{\text{FITO}}{\text{ISTD}}\right)\right]}$$

El resultado de un experimento puede verse en la figura 5.

25

**EJEMPLO 8. Biotransformación de CHO en 11 $\alpha$ -OH-AD utilizando la cepa *M. smegmatis* CECT 8332 (pMVFUN).**

Para los ensayos de biotransformación de colesterol con células en crecimiento de *M. smegmatis* CECT 8332 (pMVFUN) se empleó el medio 7H9 sin suplementos (sin glicerol y sin ADC) al que se le añadió glicerol 18 mM y colesterol a la concentración final de 1 mM, contenidos en 3,6 % (v/v) de Tyloxapol. En caso de ser necesario se añadió kanamicina (20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) y ácido  $\delta$ -aminolevulínico 0,5 mM desde el momento de la inoculación. Un volumen total de 20 ml de cultivo de células de *M. smegmatis*

30

fueron cultivadas a 37 °C y 250 rpm en matraz de 100 ml desde una  $DO_{600}$  de 0,1 empleando un preinóculo de 48 h crecido en medio 7H9/Gli/ADC/Tween, a 37 °C y agitado a 250 rpm. Se tomaron muestras para analizar la biotransformación de esteroides y se monitorizó el crecimiento durante 96 h.

5

La identificación y cuantificación de AD y 11 $\alpha$ -OH-AD se realizó empleando la metodología contenida en el ejemplo 6. La cuantificación 11 $\alpha$ -OH-AD, igualmente se realizó mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento con respecto al sustrato CHO como:

10

$$\Psi_{11\alpha\text{-OH-AD/CHO}} = \frac{A\left(\frac{11\alpha\text{OH-AD}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha\text{OH-AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha\text{OH-ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{CHO}{ISTD}\right)\right]}$$

El resultado de un experimento puede verse en la figura 6.

15

**EJEMPLO 9. Biotransformación de FITO en 11 $\alpha$ -OH-AD utilizando la cepa *M. smegmatis* CECT 8332 (pMVFUN).**

Para los ensayos de biotransformación de fitoesteroles con células en crecimiento de *M. smegmatis* CECT 8332 (pMVFUN) se empleó el medio 7H9 sin suplementos (sin glicerol y sin ADC) al que se le añadió glicerol 18 mM y los fitoesteroles a la concentración final de 1 mM, contenidos en 3,6 % (v/v) de Tyloxapol. En caso de ser necesario se añadió kanamicina (20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y ácido  $\delta$ -aminolevulínico 0,5 mM desde el momento de la inoculación. Un volumen total de 20 ml de cultivo de células de *M. smegmatis* fueron cultivadas a 37 °C y 250 rpm en matraz de 100 ml desde una  $DO_{600}$  de 0,1 empleando un preinóculo de 48 h crecido en medio 7H9/Gli/ADC/Tween, a 37 °C y agitado a 250 rpm. Se tomaron muestras para analizar la biotransformación de esteroides y se monitorizó el crecimiento durante 96 h.

La identificación y cuantificación de AD y 11 $\alpha$ -OH-AD se realizó empleando la metodología contenida en el ejemplo 7. La cuantificación 11 $\alpha$ -OH-AD, igualmente se realizó mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento con respecto al sustrato (FITO) como:

30

$$\Psi_{11\alpha\text{-OH-AD}/\text{FITO}} = \frac{A\left(\frac{11\alpha\text{OH-AD}}{\text{ISTD}}\right)}{\left[A\left(\frac{\text{AD}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{\text{ADD}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{11\alpha\text{OH-AD}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{11\alpha\text{OH-ADD}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{4\text{-HBC}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{1,4\text{-HBC}}{\text{ISTD}}\right) + A\left(\frac{\text{FITO}}{\text{ISTD}}\right)\right]}$$

El resultado de un experimento puede verse en la figura 7.

**REIVINDICACIONES**

1. Construcción génica que comprende una secuencia nucleotídica codificante para el citocromo CYP509C12 de *Rhizopus oryzae* y una secuencia nucleotídica codificante para la reductasa RoCPR1 de *Rhizopus oryzae*.  
5
2. Construcción génica según la reivindicación 1, donde la secuencia nucleotídica codificante para el citocromo CYP509C12 es la SEQ ID NO: 1.
- 10 3. Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la secuencia nucleotídica codificante para la reductasa RoCPR1 es la SEQ ID NO: 2.
4. Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende una secuencia consenso Shine Dalgarno aguas arriba de cada uno de los codones de inicio de cada secuencia nucleotídica.  
15
5. Construcción génica según la reivindicación 4, donde la secuencia consenso se localiza 6 pb aguas arriba de cada uno de los codones de inicio de cada secuencia nucleotídica.  
20
6. Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende al menos dos sitios de restricción.
7. Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que además comprende un codón que da lugar a una alanina situada en la segunda posición de cada una de las dos proteínas traducidas.  
25
8. Célula bacteriana que comprende la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 9. Célula bacteriana según la reivindicación 8, que es una célula de actinobacterias.
10. Célula bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, que es una célula de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

11. Célula bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, que es una célula de la especie *Mycobacterium smegmatis*.
12. Célula bacteriana según la reivindicación 11, que además comprende inactivada  
5 funcionalmente o delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica el componente reductasa de la enzima 3-cetosteroide-9 $\alpha$ -hidroxilasa.
13. Célula bacteriana según la reivindicación 12, que además comprende inactivada  
10 funcionalmente o delecionada total o parcialmente al menos una secuencia de nucleótidos endógena que codifica la enzima 3-cetosteroide- $\Delta$ 1-deshidrogenasa.
14. Célula bacteriana según la reivindicación 12, que es una célula de *M. smegmatis*  
CECT 8331.  
15
15. Célula bacteriana según la reivindicación 13, que es una célula de *M. smegmatis*  
CECT 8332.
16. Uso de la célula bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 para la  
20 producción de esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados o sintonas 11 $\alpha$  hidroxiladas.
17. Uso de la célula bacteriana según la reivindicación 16, donde los esteroides 11 $\alpha$   
hidroxilados o las sintonas 11 $\alpha$  hidroxiladas se producen a partir de sintonas no  
hidroxiladas.  
25
18. Uso de la célula bacteriana según la reivindicación 17, donde las sintonas 11 $\alpha$   
hidroxiladas son 11 $\alpha$ -OH-PROG, 11 $\alpha$ -OH-DOC, 11 $\alpha$ -OH-TEST, 11 $\alpha$ -OH-DHEA,  
11 $\alpha$ -OH-AD y/o 11 $\alpha$ -OH-ADD y las sintonas no hidroxiladas son PROG, DOC,  
TEST, DHEA, AD y/o ADD.  
30
19. Uso de la célula bacteriana según la reivindicación 18, donde la célula es la célula  
según la reivindicación 10.

20. Uso de la célula bacteriana según la reivindicación 16, donde la sintona 11 $\alpha$  hidroxilada es 11 $\alpha$ -OH-ADD producida a partir de esteroides naturales y la célula bacteriana es la célula según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 14.
- 5 21. Uso de la célula bacteriana según la reivindicación 16, donde la sintona 11 $\alpha$  hidroxilada es 11 $\alpha$ -OH-AD producida a partir de esteroides naturales y la célula bacteriana es la célula según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 15.
22. Uso de la célula bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21,  
10 donde los esteroides naturales son colesterol o fitoesteroides.
23. Procedimiento para la producción de esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados o sintonas 11 $\alpha$  hidroxiladas que comprende las etapas de:
- 15 a. poner en contacto un cultivo de la célula bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 con un sustrato esteroideo,  
b. incubar la mezcla del paso (a) en condiciones de fermentación, y  
c. separar del medio de cultivo los esteroides 11 $\alpha$  hidroxilados o las sintonas 11 $\alpha$  hidroxiladas producidos tras la incubación del paso (b).
- 20
24. Procedimiento según la reivindicación 23, donde el medio de cultivo comprende glicerol.
25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, donde el sustrato esteroideo se selecciona de la lista que consiste en: fitoesteroides, colesterol, PROG, DOC, TEST, DHEA, AD o ADD, o cualquiera de sus combinaciones.
- 25
26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, donde el sustrato esteroideo son fitoesteroides o colesterol, la sintona 11 $\alpha$  hidroxilada es 11 $\alpha$ -OH-AD  
30 y la célula bacteriana es la célula según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 15.
27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, donde el sustrato esteroideo son fitoesteroides o colesterol, la sintona 11 $\alpha$  hidroxilada es 11 $\alpha$ -OH-ADD y la célula bacteriana es la célula según cualquiera de las reivindicaciones 12  
35 o 14.

28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, donde el sustrato esteroideo es AD, ADD, PROG, DOC, DHEA y/o TEST, la sintona  $11\alpha$  hidroxilada es  $11\alpha$ -OH-PROG,  $11\alpha$ -OH-DOC,  $11\alpha$ -OH-TEST,  $11\alpha$ -OH-DHEA,  $11\alpha$ -OH-AD y/o  $11\alpha$ -OH-ADD y la célula bacteriana es la célula según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15.

29. Procedimiento según la reivindicación 28, donde la célula bacteriana es la célula según la reivindicación 10.

FIG. 1

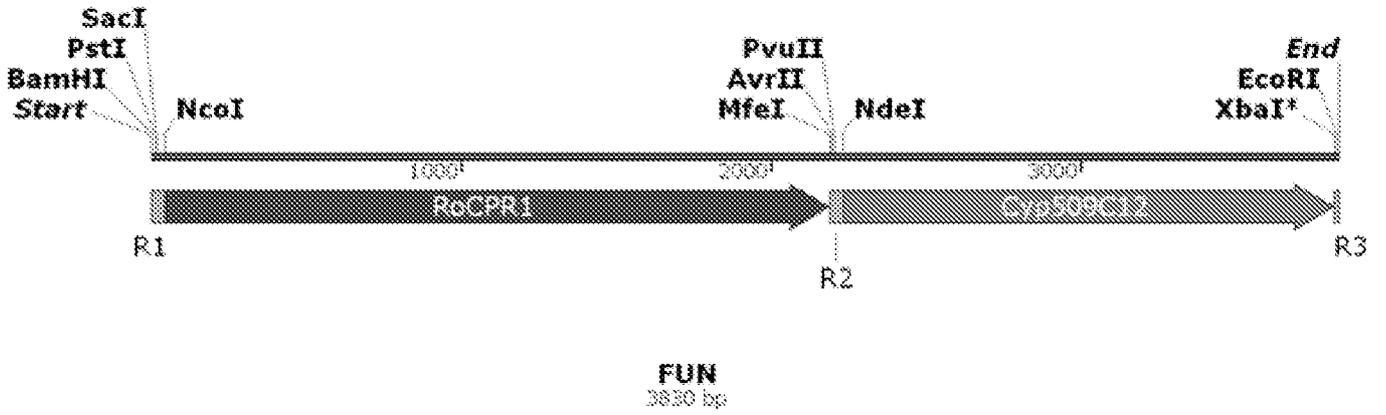


FIG. 2

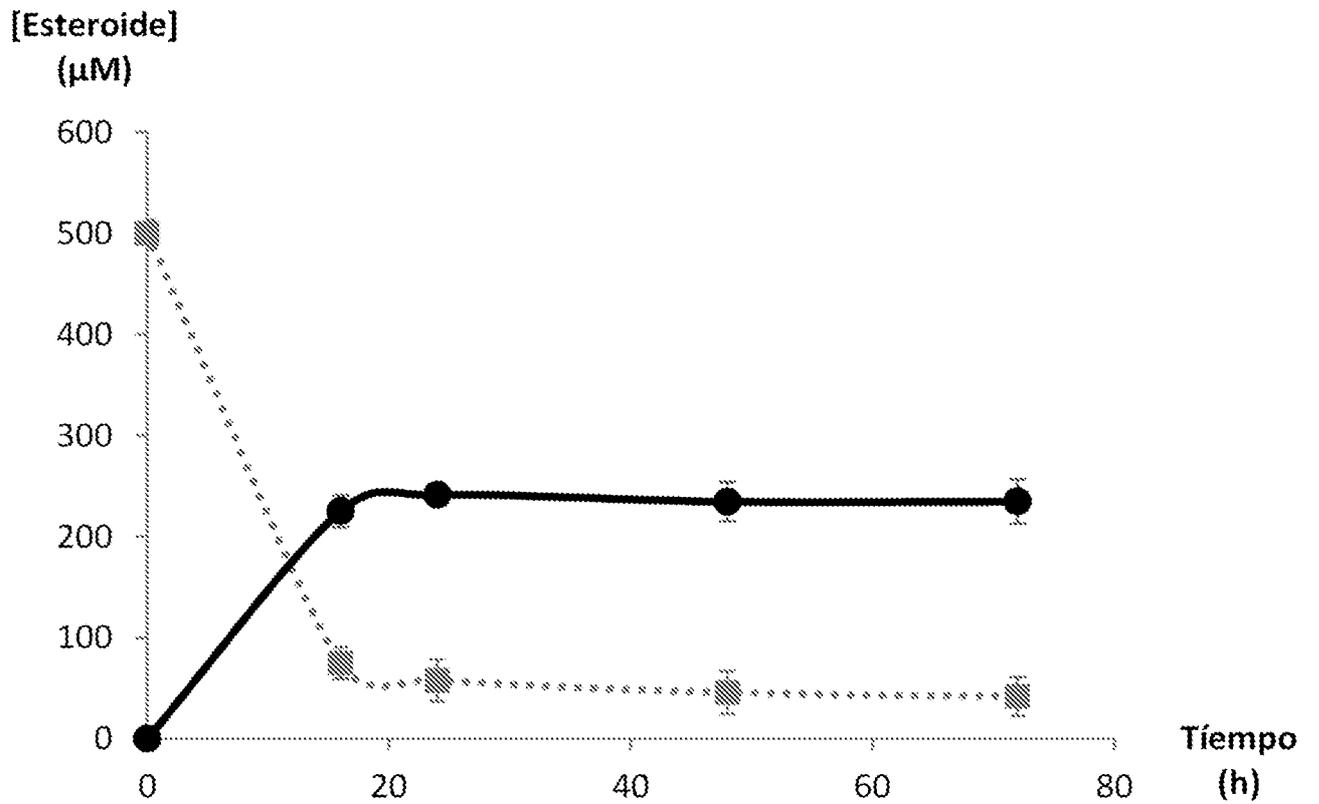


FIG. 3

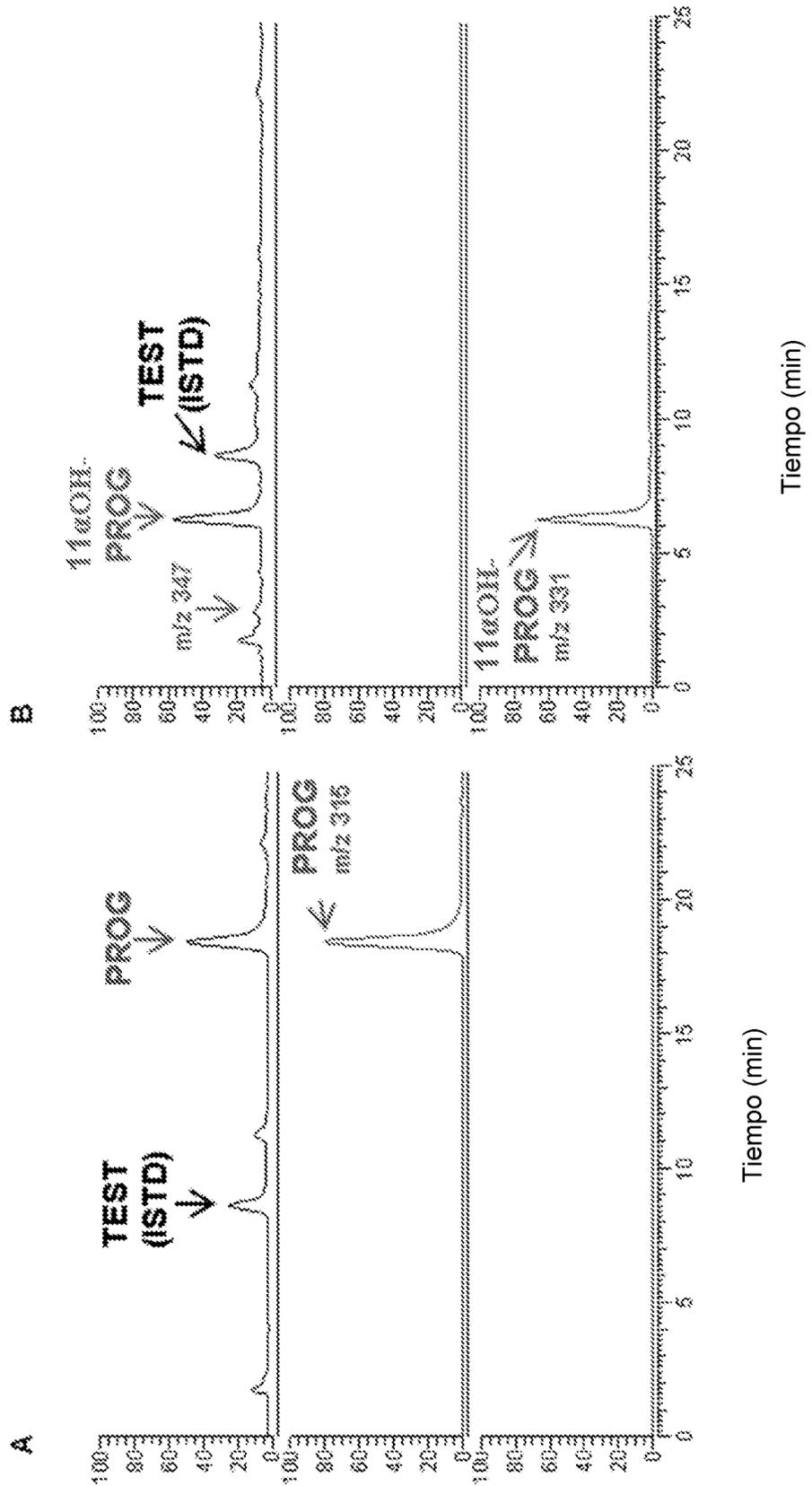


FIG. 4

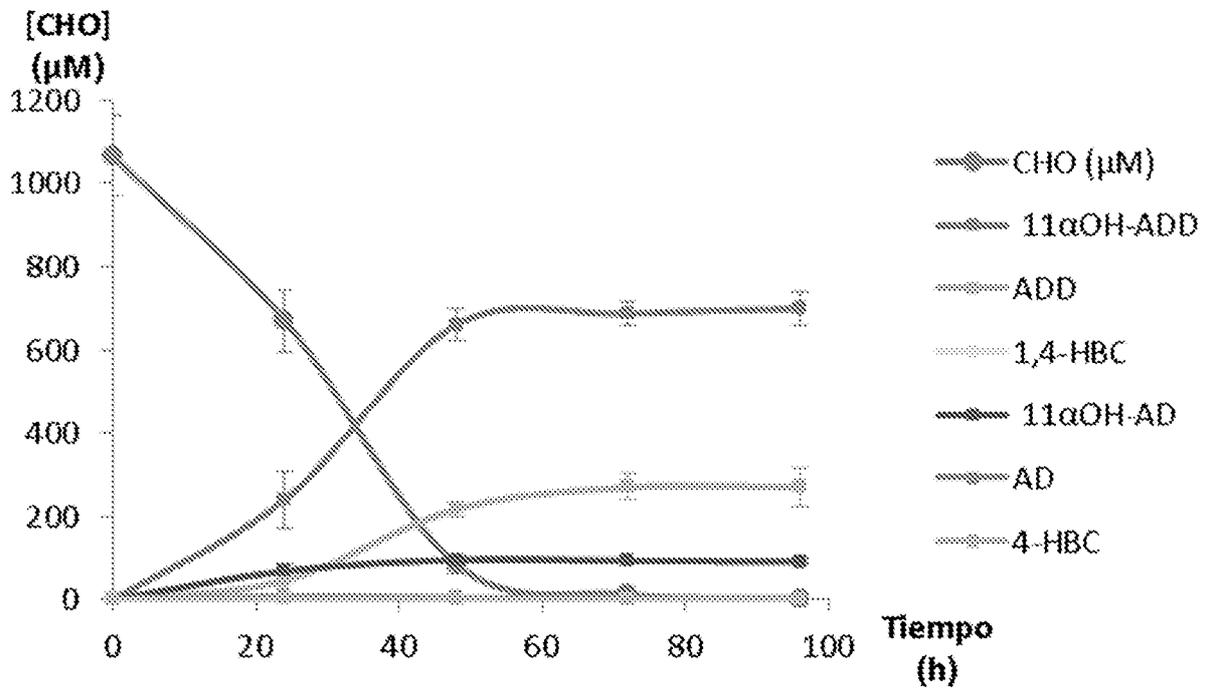


FIG. 5

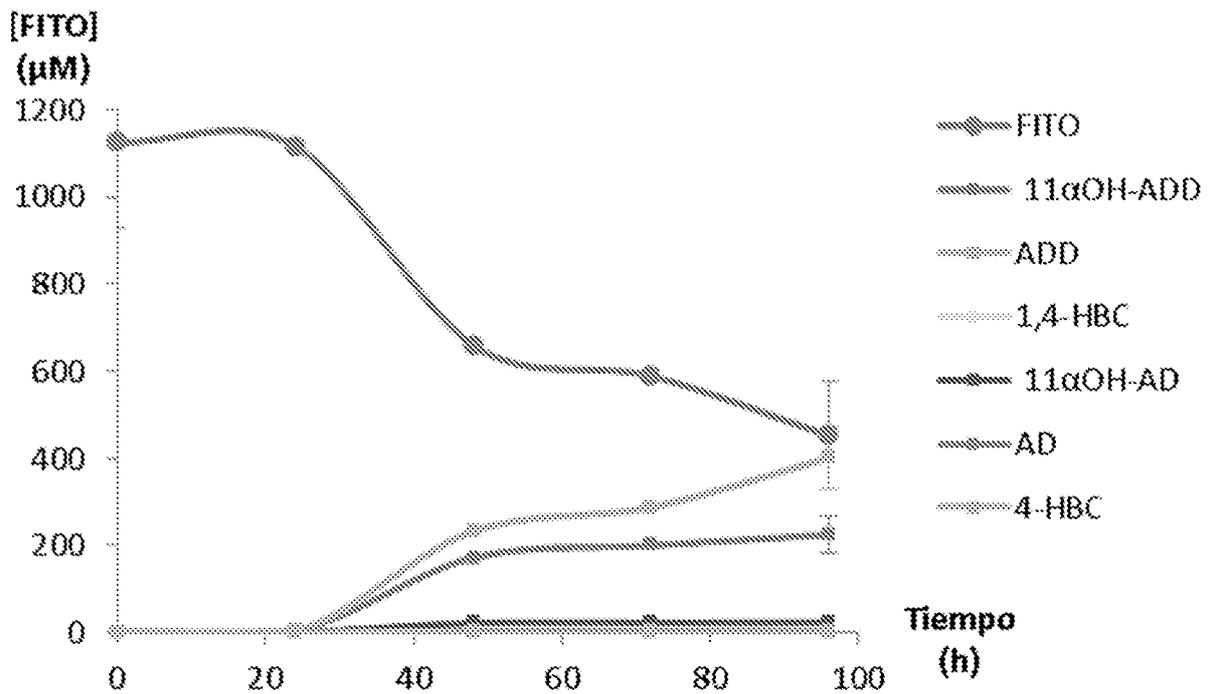


FIG. 6

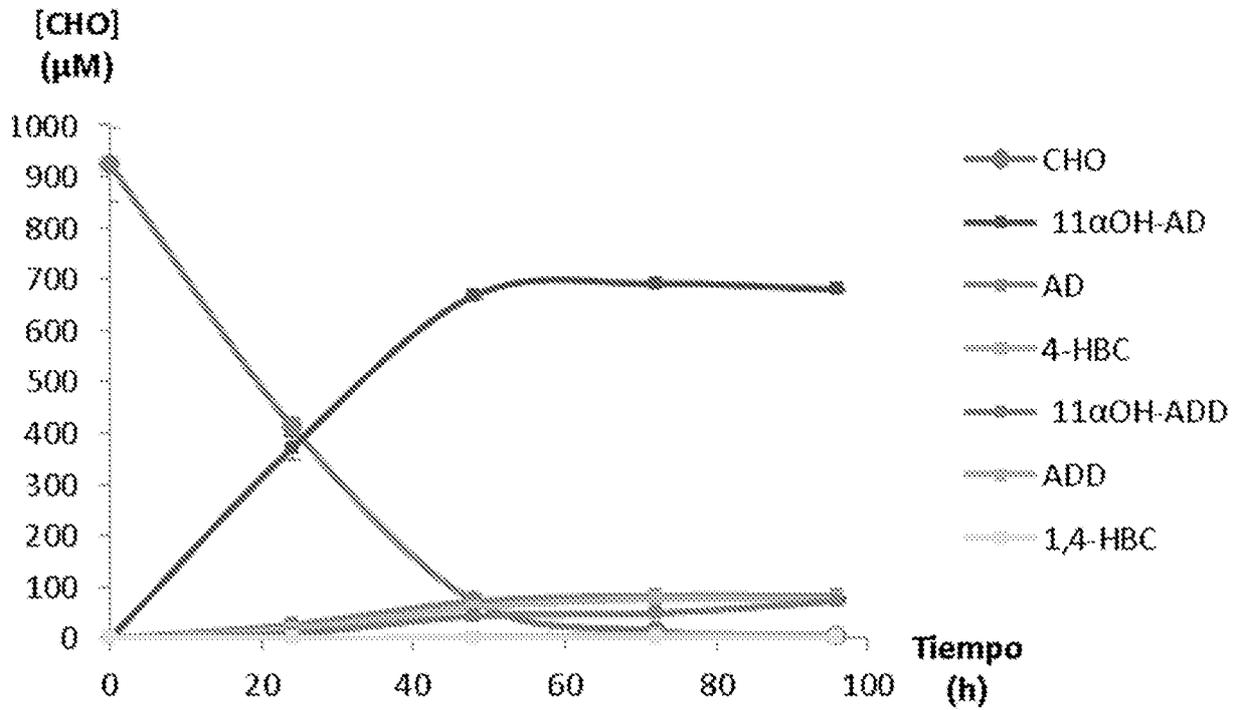
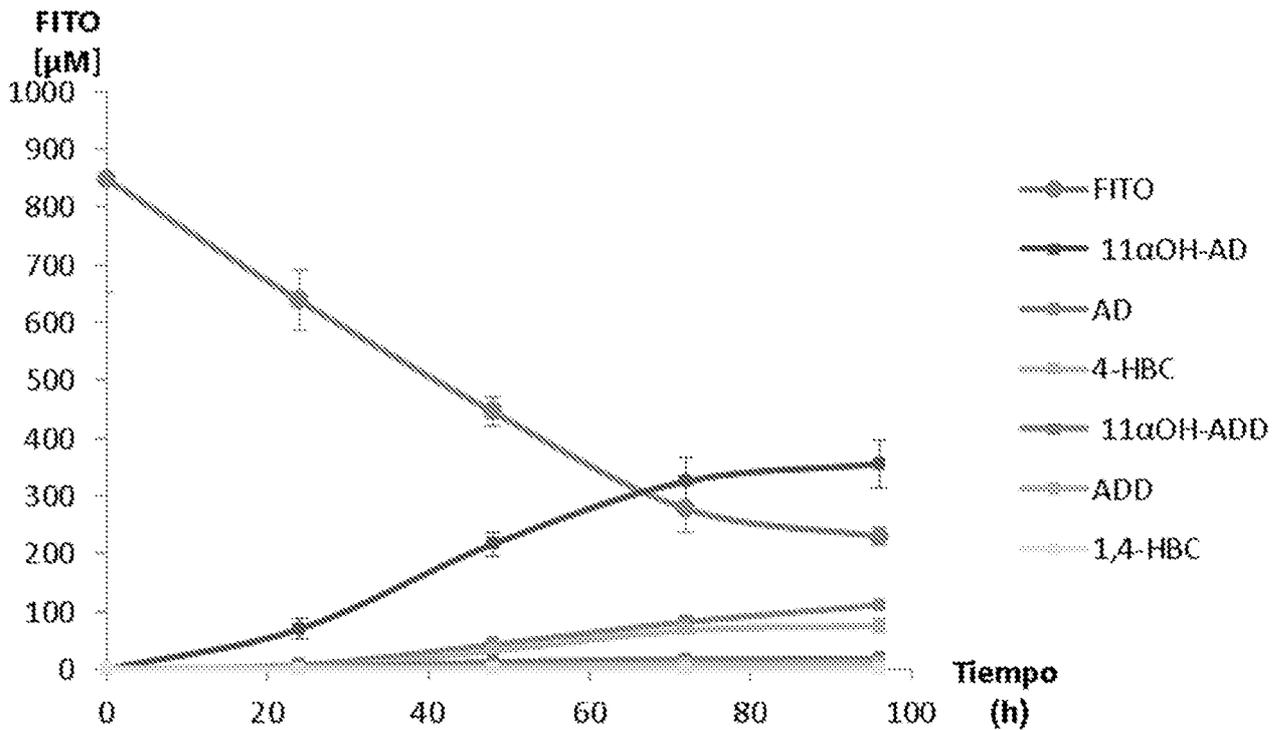


FIG. 7



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2017/070363

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12Q1/68* (2006.01)  
*C12N15/77* (2006.01)  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12Q, C12N

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

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011042143 A1 (UNIVERZA V LJUBLJANI [SI/SI]) 14/04/2011, page 2, line 16 – page 3, line 46; claims 1-14.	1-7
A	ES 2224257 T3 (BTG INTERNATIONAL LIMITED) 01/03/2005, page 3, line 65 – page 5, line 41.	1-15
A	WO 0246386 A2 (PHARMACIA CORPORATION [US/US]) 13/06/2002, page 2, line 4 – page 4, line 21.	1-29

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

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  
27/07/2017

Date of mailing of the international search report  
(28/07/2017)

Name and mailing address of the ISA/  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer  
M. García Grávalos  
  
Telephone No. 91 3493404

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2017/070363

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2011042143 A1	14.04.2011	AT545706T T EP2308983 A1 EP2308983 B1	15.03.2012 13.04.2011 15.02.2012
-----	-----	-----	-----
ES2224257T T3	01.03.2005	US2003215915 A1 US9255256 B2 US6566108 B1 JP2008043338 A JP2001522221 A JP4117852B B2 WO9802554 A2 WO9802554 A3 EP0914446 A2 EP0914446 B1 DK0914446T T3 DE69729097T T2 CA2259619 A1 CA2259619 C AU3551897 A AU730155B B2 AT266730T T	20.11.2003 09.02.2016 20.05.2003 28.02.2008 13.11.2001 16.07.2008 22.01.1998 19.03.1998 12.05.1999 12.05.2004 06.09.2004 19.05.2005 22.01.1998 27.01.2009 09.02.1998 01.03.2001 15.05.2004
-----	-----	-----	-----
WO0246386 A2	13.06.2002	PE05352002 A1 US2005003473 A1 US7238507 B2 US2003148420 A1 US7033807 B2 MXPA03003809 A MX245674 B JP2005512502 A CN1531590 A CA2427615 A1 BR0115245 A AU4176802 A AR031169 A1 EP1352054 A2	05.06.2002 06.01.2005 03.07.2007 07.08.2003 25.04.2006 28.07.2003 07.05.2007 12.05.2005 22.09.2004 13.06.2002 10.05.2005 18.06.2002 10.09.2003 15.10.2003
-----	-----	-----	-----

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES2017/070363

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q1/68** (2006.01)

**C12N15/77** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 2011042143 A1 (UNIVERZA V LJUBLJANI [SI/SI]) 14/04/2011, página 2, línea 16 – página 3, línea 46; reivindicaciones 1-14.	1-7
A	ES 2224257 T3 (BTG INTERNATIONAL LIMITED) 01/03/2005, página 3, línea 65 – página 5, línea 41.	1-15
A	WO 0246386 A2 (PHARMACIA CORPORATION [US/US]) 13/06/2002, página 2, línea 4 – página 4, línea 21.	1-29

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
**27/07/2017**

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**28 de julio de 2017 (28/07/2017)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. García Grávalos

Nº de teléfono 91 3493404

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2017/070363

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2011042143 A1	14.04.2011	AT545706T T	15.03.2012
		EP2308983 A1	13.04.2011
		EP2308983 B1	15.02.2012
-----	-----	-----	-----
ES2224257T T3	01.03.2005	US2003215915 A1	20.11.2003
		US9255256 B2	09.02.2016
		US6566108 B1	20.05.2003
		JP2008043338 A	28.02.2008
		JP2001522221 A	13.11.2001
		JP4117852B B2	16.07.2008
		WO9802554 A2	22.01.1998
		WO9802554 A3	19.03.1998
		EP0914446 A2	12.05.1999
		EP0914446 B1	12.05.2004
		DK0914446T T3	06.09.2004
		DE69729097T T2	19.05.2005
		CA2259619 A1	22.01.1998
		CA2259619 C	27.01.2009
		AU3551897 A	09.02.1998
AU730155B B2	01.03.2001		
AT266730T T	15.05.2004		
-----	-----	-----	-----
WO0246386 A2	13.06.2002	PE05352002 A1	05.06.2002
		US2005003473 A1	06.01.2005
		US7238507 B2	03.07.2007
		US2003148420 A1	07.08.2003
		US7033807 B2	25.04.2006
		MXPA03003809 A	28.07.2003
		MX245674 B	07.05.2007
		JP2005512502 A	12.05.2005
		CN1531590 A	22.09.2004
		CA2427615 A1	13.06.2002
		BR0115245 A	10.05.2005
		AU4176802 A	18.06.2002
		AR031169 A1	10.09.2003
EP1352054 A2	15.10.2003		
-----	-----	-----	-----