



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2723868 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12P 33/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.01.15
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.07.26
(86)	European Application Nr.	12728522.9
(86)	European Filing Date	2012.06.18
(87)	The European Application's Publication Date	2014.04.30
(30)	Priority	2011.06.21, FR, 1155462
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(73)	Proprietor	SANOFI, 54, rue La Boétie, 75008 Paris, FR-Frankrike
(72)	Inventor	BROCARD-MASSON, Corinne, c/o SanofiPatent Department54 rue La Boétie, 75008 Paris, FR-Frankrike BONNIN, Isabelle, c/o SanofiPatent Department54 rue La Boétie, 75008 Paris, FR-Frankrike DUMAS, Bruno, c/o SanofiPatent Department54 rue La Boétie, 75008 Paris, FR-Frankrike
(74)	Agent or Attorney	Tandberg Innovation AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	PROCESS FOR PREPARING GENETICALLY TRANSFORMED YEASTS CAPABLE OF PRODUCING A MOLECULE OF INTEREST AT A HIGH TITRE
(56)	References Cited:	MENDOZA-VEGA O ET AL: "Industrial production of heterologous proteins by fed-batch cultures of the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 15, no. 4, 1 December 1994 (1994-12-01), pages 369-410, XP023708234, ISSN: 0168-6445, DOI: 10.1111/J.1574-6976.1994.TB00146.X [retrieved on 1994-12-01], BRUNO DUMAS ET AL: "Hydrocortisone made in yeast: Metabolic engineering turns a unicellular microorganism into a drug-synthesizing factory", BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 1, no. 3, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 299-307, XP055020914, ISSN: 1860-6768, DOI: 10.1002/biot.200500046, NEVOIGT E: "Progress in metabolic engineering of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 72, no. 3, 1 September 2008 (2008-09-

01), pages 379-412, XP008100901, ISSN: 1092-2172, DOI: 10.1128/MMBR.00025-07, US-A- 6
136 576, FANG FANG ET AL: "A vector set for systematic metabolic engineering in
Saccharomyces cerevisiae", YEAST, vol. 28, no. 2, 1 February 2011 (2011-02-01), pages 123-
136, XP055021273, ISSN: 0749-503X, DOI: 10.1002/yea.1824, FR-A1- 2 820 145

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. En fremgangsmåte for fremstilling av et gjærisolat som produserer minst 100 mg/l hydrokortison, som omfatter:

(a) å tilveiebringe to integrasjonsplasmider med fire ekspresjonskassetter, hvert integrasjonsplasmid som omfatter minst to ekspresjonskassetter, hvor de fire ekspresjonskassettene er P450scc, adrenodoksin (ADX), P450c11, og 3 β -hydroksysteroid-dehydrogenase (3 β -HSD)

(b) å stabilt integrere flere kopier av de to integrasjonsplasmidene inn i en populasjon av gjærceller, ved å ko-transformere plasmidene inn i gjæren,

(c) å utføre et primært screen for å velge minst 30 gjærkloner, hvor seleksjonen av klonene er basert på nærværet av ekspresjonskassettene, eller seleksjon for ekspresjonen av en selekterbar markør når en slik markør er til stede, og

(d) å utføre et funksjonelt sekundært screen på de minst 30 gjærklonene valgt i det primære screenet, for å identifisere nevnte gjærisolat som produserer minst 100 mg/l hydrokortison.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor fra 5 til 20 kopier av plasmidene er integrert.

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor minst 40 kloner er valgt i det primære screenet.

4. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor gjæren er *Saccharomyces cerevisae*.

5. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor mist ett av plasmidene omfatter en auxotrofisk selekterbar markør.

6. Fremgangsmåten ifølge krav 5, hvor den auxotrofiske markøren er valgt fra gruppen bestående av *ADE2*, *URA3*, *HIS3*, *LEU2*, *TRP1*, og *LYS2*.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor mist ett av plasmidene omfatter en selekterbar markør som er en resistens markør.

8. Fremgangsmåten ifølge krav 7, hvor resistens markøren er valgt fra gruppen bestående av *natMX*, *phMX* og *KanMX*.

9. Fremgangsmåten ifølge krav 6, hvor ett av plasmidene omfatter *URA3* og det andre plasmidet omfatter *ADE2*.

5 **10.** Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvor *ADE2*-genet koder for et avkortet, inaktivt protein.

11. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor minst 85 % av steroidet produsert av gjæren er hydrokortison.

10 **12.** Et gjærisolat som produserer hydrokortison som kan oppnås ved fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor 3 β -hydroksysteroid-dehydrogenasen og P450_{scc}-kassetten er begge lokalisert på kromosom XII eller IV.

15 **13.** Anvendelse av et gjærisolat fremstilt ifølge fremgangsmåten ifølge krav 1, for å produsere hydrokortison.

14. En fremgangsmåte for å produsere hydrokortison, som omfatter:

(a) å fremstille et gjærisolat som produserer hydrokortison ved å anvende fremgangsmåten ifølge krav 1;

20 (b) å dyrke gjærisolatet i et dyrkningsmedium; og

(c) å gjenvinne og rense nevnte hydrokortison fra dyrkningsmediet.