

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035489**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.24

(51) Int. Cl. **C12N 1/08** (2006.01)

(21) Номер заявки
201591723

(22) Дата подачи заявки
2014.03.13

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ТЕРМОФИЛЬНЫХ НУКЛЕАЗ ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКАХ-ХОЗЯЕВАХ

(31) 61/794,400; 61/928,080

(32) 2013.03.15; 2014.01.16

(33) US

(43) 2016.03.31

(86) PCT/US2014/026379

(87) WO 2014/151748 2014.09.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДСМ АйПи АСЕТС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Трухарт Джошуа, Макграс Джессика
(US)

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) US-A1-20090226962

SLATKO et al. "Cloning, sequencing and expression of the Taq I restriction-modification system", Nucleic Acids Research, Volume 15, Number 23, 1987, 9781-9796, entire document

US-A1-20100279295

US-A1-20100075376

US-A1-20050266518

KAWARABAYASI et al. "Complete Sequence and Gene Organization of the Genome of a Hyperthermophilic Archaeobacterium, Pyrococcus horikoshii OT3", DNA RESEARCH 5, 55-76 (1998), 55-61, entire document

US-A-3914450

US-A-5498535

(57) Изобретение относится к способу разрушения нуклеиновых кислот клетки-хозяина, содержащей гетерологичный ген термофильной нуклеазы, in vivo и/или in situ посредством изменения температуры для активации термофильной нуклеазы. Изобретение также относится к соответствующей генетически модифицированной клетке-хозяину, содержащей гетерологичный ген термофильной нуклеазы, и к способу получения продукта биомассы такой клетки-хозяина. Также изобретение относится к применению термофильной нуклеазы, гетерологичной для клетки-хозяина, для разрушения нуклеиновых кислот клетки-хозяина. Данное изобретение позволяет устранить биологическую активность рекомбинантной ДНК в биомассе или в происходящих из нее продуктах.

B1

035489

035489

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к способу расщепления нуклеиновых кислот клеток-хозяев *in vivo* и/или *in situ*, в частности когда клетки-хозяева содержат рекомбинантную ДНК, с использованием гетерологичных термофильных нуклеаз. Данное изобретение имеет то практическое значение, что позволяет ликвидировать биологическую активность рекомбинантных ДНК в биомассе. Ликвидация биологической активности рекомбинантных ДНК помогает предотвратить присутствие активных молекул рекомбинантных ДНК в конечном продукте, выделяемом из биомассы, или в самой биомассе. Кроме того, ликвидация биологической активности рекомбинантных ДНК помогает предотвратить попадание активных молекул рекомбинантных ДНК в окружающую среду.

Уровень техники

Биотехнологические производственные процессы все больше применяются для получения биологических соединений и продуктов тонкого органического синтеза. Благодаря прогрессу в области молекулярно-биологических методов стало возможным массовое производство разнообразных биологических соединений и продуктов тонкого органического синтеза, например белков, антител, полисахаридов, антибиотиков, аминокислот, витаминов, спиртов и прочего. Часто для увеличения эффективности производства ген (гены), обеспечивающий образование желаемого конечного продукта (продуктов), генетически модифицируют и/или вводят в гетерологичный организм. Затем образование желаемого конечного продукта (продуктов) осуществляется в ферментерах, управляемых современными средствами регуляции и контроля. Конечные продукты представляют собой сами клетки, или же их экстрагируют из клеток либо выделяют из среды, в которой культивировались клетки, если искомые соединения попадают в нее путем активной либо пассивной секреции или в результате лизиса клеток.

Обычно полученная в итоге процесса ферментации биомасса содержит не только желаемый конечный продукт (продукты), но и активные молекулы ДНК. Часто эта активная ДНК является рекомбинантной. Если такую ДНК оставить как есть, то эти молекулы окажутся в выделенном конечном продукте, а также могут попасть в окружающую среду. В обществе бытуют сильные опасения относительно возможных негативных для здоровья человека эффектов остаточной рекомбинантной ДНК в сельскохозяйственных культурах и пищевых продуктах. Кроме того, озабоченность потенциальным влиянием рекомбинантных ДНК на окружающую среду побуждает власти большинства стран вводить установления и требования, призывающие инактивировать отходы ферментационных процессов прежде, чем они окажутся в окружающей среде.

Для инактивации нуклеиновых кислот имеется несколько подходов. Например, нуклеиновые кислоты можно инактивировать путем физического воздействия, например достаточно высокой температуры. В патенте США № 5417862 описывается способ ликвидации биологической активности ДНК путем нагревания до 60-100°C в присутствии кислоты. Сходный способ разрушения ДНК путем воздействия тепла в сочетании с кислой средой описывается в патенте США № 5118603. Для методов, предполагающих нагревание, нужно значительное количество энергии, что при проведении ферментации в больших масштабах существенно повышает цену конечного продукта. Более того, в зависимости от природы конечного продукта жесткие условия тепловой обработки (и/или воздействия кислой среды) могут оказаться губительными для целостности и активности указанного продукта.

Нуклеиновые кислоты можно инактивировать и другими физическими средствами. В патенте США № 6165711 описывается способ с использованием лазерного облучения для дезинтеграции нуклеиновых кислот в биологически активном белковом материале. Другой пример - способ инактивации микроорганизмов с использованием высокоинтенсивных импульсов полихроматического света, описанный в заявке на патент США № 09/818256 (в настоящее время отозванной). Для осуществления этого способа нужны сложные светогенерирующие устройства, которые требуют постоянного обслуживания, и в итоге стоимость применения оказывается чересчур высокой. Кроме того, облучение может приводить к дезинтеграции не только нуклеиновых кислот, но и других биологических структур и субстанций или активных соединений и вызывать потерю ими желаемых свойств.

Нуклеиновые кислоты можно инактивировать также химически путем воздействия кислот или щелочей. Например, в патенте США № 7435567 описывается способ с использованием хлорноватистой кислоты, которая вызывает в микроорганизмах разрушение нуклеиновых кислот. В упомянутых выше патентах США №№ 5417862 и 5118603 описывается использование других кислот для разрушения нуклеиновых кислот. Эти способы, обеспечивая разрушение молекул нуклеиновых кислот, предполагают жесткие кислотно-щелочные условия. Такие условия могут привести к нежелательной денатурации некоторых важных биологических соединений, например белков. Притом используются относительно большие количества кислоты или щелочи, что является недостатком для методов, применяемых в промышленном производстве.

Предпринимались попытки инактивировать нуклеиновые кислоты организма ферментативным путем, например используя нуклеазы. В заявке на патент США № 13/127825 описывается способ разрушения нуклеиновых кислот клетки-хозяина в связи с получением вакцины, который включает этап расщепления нуклеиновых кислот добавляемой в культуру клеток очищенной нуклеазой. В заявке на патент США № 10/607903 описывается создание штамма трансгенных бактерий, у которых экспрессируется

гетерологичный ген нуклеазы, и она образуется в количестве, эффективном для разрушения нуклеиновых кислот. Способ добавления нуклеазы *in vitro*, как, например, описывается в заявке на патент США № 13/127825, обеспечивает разрушение нуклеиновых кислот, но он весьма дорогостоящий, поскольку требует большого количества нуклеазы; притом эффективность разрушения нуклеиновых кислот низкая, так как в условиях *in vitro* клеточная стенка клетки-хозяина не дает нуклеазе доступа к нуклеиновым кислотам. Подход с использованием трансгенных организмов, как описано, например, в заявке на патент США № 10/607903, позволяет достичь совместной экспрессии нуклеазы с генами клетки-хозяина, и, таким образом, для нуклеазы оказываются доступными нуклеиновые кислоты этой клетки *in vivo*. Однако коэкспрессия нуклеазы в клетке без какого-либо защитного механизма, например метилирования, создает для клетки существенный стресс, который приводит к ослаблению клеточного роста и продуцирования конечного продукта.

Проблема, послужившая поводом к созданию данного изобретения, состоит, таким образом, в том, чтобы разработать экономически эффективный метод разрушения нуклеиновых кислот клетки-хозяина, продуцирующей нужные биологические соединения и продукты тонкого органического синтеза, особенно для применения в промышленных масштабах. Данное изобретение также имело целью решить другую проблему, а именно предложить такой способ разрушения нуклеиновых кислот, чтобы этот процесс можно было контролировать и чтобы он не мешал продуцированию желаемого конечного продукта (продуктов) клетками-хозяевами. По данному изобретению эти проблемы решаются объектом изобретения согласно представленной формуле изобретения.

Раскрытие изобретения

Мы к своему удивлению обнаружили, что для контролируемого разрушения нуклеиновых кислот *in vivo* и/или *in situ* можно использовать термофильные нуклеазы. Данное изобретение относится к новому способу разрушения нуклеиновых кислот организма-хозяина, модифицированного или трансформированного одним или более гетерологичными генами термофильных нуклеаз. Термофильные нуклеазы, описываемые в настоящем документе, находятся в латентном состоянии при температурах, при которых обычно выращивают клеточные культуры для получения нужного продукта, но могут избирательно активироваться при более высоких температурах и тогда расщеплять нуклеиновые кислоты организма-хозяина и/или рекомбинантные нуклеиновые кислоты, включенные в организм-хозяин. Активацию можно инициировать в любой желаемый момент времени, например тогда, когда образование нужного продукта уже завершилось, и нужно его собрать из клеточной культуры. Помимо такого простого регулирования применение способа по данному изобретению обладает преимуществом действия *in vivo* и/или *in situ*, что повышает эффективность ферментативной реакции и позволяет избежать недостатков и сложностей существующих физических и химических методов. Таким образом, применение описываемого в настоящем документе изобретения позволяет получать биологические соединения и продукты тонкого органического синтеза в интактных клетках таким образом, что активные нуклеиновые кислоты, содержащиеся в этих клетках, в частности рекомбинантные ДНК, разрушаются и не проявляют своей активности.

На практике данное изобретение можно применять очень широко в отношении как микроорганизмов, так и культур эукариотических клеток, в частности штаммов и линий, используемых в промышленности для получения желаемых конечных продуктов в больших масштабах на продажу.

В одном из своих аспектов данное изобретение относится к способу разрушения нуклеиновых кислот клеток-хозяев *in vivo* и/или *in situ*, в котором клетка-хозяин содержит гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие термофильную нуклеазу; этот способ включает (а) выращивание клеток-хозяев при температуре, при которой используемая термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии; и (б) разрушение нуклеиновых кислот клеток-хозяев в результате изменения температуры, имевшей место на этапе (а), до температуры, при которой данная термофильная нуклеаза активна.

Данным изобретением также предлагаются генетически модифицированные клетки, содержащие гетерологичные нуклеотидные последовательности одного или более генов термофильных нуклеаз, упомянутых выше. В одном из воплощений данного изобретения генетически модифицированные клетки продуцируют один или более конечных продуктов, которые не являются упомянутыми выше термофильными нуклеазами. В одном из воплощений данного изобретения генетически модифицированные клетки получают путем внедрения одного или более гетерологичных генов термофильных нуклеаз, упомянутых выше, в клетки-хозяева. Эти клетки-хозяева могут быть не модифицированными генетически или же предварительно генетически модифицированными. До генетической модификации одним или более гетерологичными генами термофильных нуклеаз эти клетки-хозяева продуцируют один или более конечных продуктов, причем указанные один или более конечных продуктов не являются термофильными нуклеазами. В другом воплощении данного изобретения указанные выше клетки-хозяева могут быть модифицированы сначала одним или более генами термофильных нуклеаз, так что получают генетически модифицированные клетки, а затем эти генетически модифицированные клетки подвергаются генно-инженерным процедурам для того, чтобы они продуцировали один или более других конечных продуктов.

В другом своем аспекте данное изобретение относится к применению термофильных нуклеаз для разрушения нуклеиновых кислот клеток-хозяев *in vivo* и/или *in situ*, причем используемая термофильная нуклеаза гетерологична для этих клеток-хозяев.

Еще в одном своем аспекте данное изобретение относится к способу получения продукта биомассы, не содержащего активных молекул нуклеиновых кислот, причем этот продукт является продуктом клеток-хозяев, содержащих гетерологичные нуклеотидные последовательности генов термофильных нуклеаз; указанный способ включает: а) выращивание клетки-хозяина при температуре, при которой используемая термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии; б) разрушение клеточных нуклеиновых кислот путем изменения температуры, имевшей место на этапе (а), на температуру, при которой данная термофильная нуклеаза активна; и с) выделение продукта биомассы.

В одном из воплощений данного изобретения нуклеазы, упомянутые в указанных выше аспектах данного изобретения, являются нуклеазами, расщепляющими ДНК, и нуклеиновые кислоты - мишени клетки-хозяина - являются дезоксирибонуклеиновыми кислотами. В одном конкретном воплощении данного изобретения ДНК клетки-хозяина содержит рекомбинантную ДНК. В другом воплощении данного изобретения используется нуклеаза, расщепляющая РНК, и нуклеиновые кислоты - мишени клетки-хозяина - являются рибонуклеиновыми кислотами.

В одном из воплощений данного изобретения температура на этапе (а) указанного выше способа оптимальна для роста и размножения клеток-хозяев. В одном из воплощений данного изобретения разрушение нуклеиновых кислот осуществляется при температуре, не отклоняющейся от оптимального для указанной термофильной нуклеазы значения более чем на 5°C в ту или другую сторону. В одном из конкретных воплощений данного изобретения разрушение нуклеиновых кислот осуществляется при температуре, оптимальной для указанной термофильной нуклеазы. В другом воплощении данного изобретения разрушение нуклеиновых кислот осуществляется в ходе пастеризации клеток-хозяев. В другом воплощении данного изобретения разрушение нуклеиновых кислот осуществляется при температуре от 40 до 100°C.

В одном из воплощений данного изобретения нуклеаза, расщепляющая ДНК, является ферментом TaqI. В одном из воплощений данного изобретения разрушение нуклеиновых кислот осуществляется при температуре от около 60 до около 70°C. В одном из конкретных воплощений данного изобретения разрушение нуклеиновых кислот осуществляется при температуре 65°C. В одном из воплощений данного изобретения нуклеаза TaqI содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3. В другом воплощении данного изобретения ген нуклеазы TaqI содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3.

В одном из воплощений данного изобретения нуклеаза, расщепляющая ДНК, является ферментом PhoI. В одном из воплощений данного изобретения разрушение нуклеиновых кислот осуществляется при температуре от около 70 до около 80°C. В одном из конкретных воплощений данного изобретения разрушение нуклеиновых кислот осуществляется при температуре 75°C. В одном из воплощений данного изобретения нуклеаза PhoI содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10. В другом воплощении данного изобретения ген нуклеазы PhoI содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10.

В одном из воплощений данного изобретения клетки-хозяева являются клетками растений. В другом воплощении данного изобретения клетки-хозяева являются клетками животных. Еще в одном воплощении данного изобретения клетки-хозяева являются клетками микроорганизмов. В одном из воплощений данного изобретения эти микроорганизмы выбирают из группы, состоящей из дрожжей, грибов, водорослей, бактерий и архей. В другом воплощении данного изобретения эти микроорганизмы выбирают из группы, состоящей из *Yarrowia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Corynebacterium*, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Mortierella*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cryptocodium*, *Schizochytrium*, и *Thraustochytrium*. В одном из конкретных воплощений данного изобретения дрожжевые грибки рода *Yarrowia* представлены видом *Yarrowia lipolytica*.

В одном из воплощений данного изобретения клетки-хозяева продуцируют один или более конечных продуктов, не являющихся термофильными нуклеазами. В одном из воплощений данного изобретения конечный продукт выбирают из группы, состоящей из фитоена, ликопена, бета-каротина, альфа-каротина, бета-криптоксантина, лютеина, зеаксантина, астаксантина, кантаксантина, эхиненона, 3-гидроксиэхиненона, 3'-гидроксиэхиненона, адонирубина, виолаксантина, адониксантина, убихинона, витамина К, витамина Е, ретинола, ретиналя, ретиноевой кислоты, ретинилпальмитата и их модифицированных форм.

В одном из воплощений данного изобретения ген термофильной нуклеазы является кодон-оптимизированным, чтобы соответствовать неравному распределению синонимичных кодонов в кодирующей ДНК клетки-хозяина. В одном из воплощений данного изобретения кодон-оптимизированный ген термофильной нуклеазы содержит нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1. В другом воплощении данного изобретения кодон-оптимизированный ген термофильной нуклеазы содержит нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 8.

В одном из воплощений данного изобретения в клетку-хозяин внедряют более одного гена термофильных нуклеаз. В другом воплощении данного изобретения рекомбинантную ДНК оптимизируют,

чтобы она включала дополнительные сайты для расщепления термофильной нуклеазой. В одном из воплощений данного изобретения рекомбинантную ДНК оптимизируют, чтобы она включала один сайт расщепления на каждые 500 или менее нуклеотидов.

В одном из воплощений данного изобретения гетерологичные гены термофильных нуклеаз, используемых по данному изобретению, не влияют на эффективность продуцирования нужного конечного продукта клетками-хозяевами.

Таким образом, предложены следующие объекты изобретения.

Способ разрушения *in vivo* и/или *in situ* нуклеиновых кислот клетки-хозяина, причем клетка-хозяин содержит по меньшей мере один гетерологичный ген термофильной нуклеазы, согласно которому

а) выращивают клетку-хозяина при температуре, при которой термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии; и

б) изменяют температуру для активации термофильной нуклеазы, в результате чего происходит разрушение нуклеиновых кислот клетки-хозяина.

Причем в данном способе нуклеаза является нуклеазой, расщепляющей ДНК, и нуклеиновые кислоты являются дезоксирибонуклеиновыми кислотами.

Более предпочтительно ДНК клетки-хозяина, используемая в способе, содержит рекомбинантную ДНК.

Температура на стадии (а), используемая в способе, предпочтительно является оптимальной для роста клетки-хозяина.

Более предпочтительно разрушение нуклеиновых кислот согласно способу проводят при температуре в пределах отклонения $\pm 5^{\circ}\text{C}$ от значения, оптимального для указанной термофильной нуклеазы.

Например, согласно способу по изобретению разрушение нуклеиновых кислот проводят в процессе пастеризации клеток-хозяев.

Таким образом, предпочтительно разрушение нуклеиновых кислот согласно способу по изобретению проводят при температуре в диапазоне от 40 до 100°C .

Если в способе используют нуклеазу, расщепляющую ДНК, которая является нуклеазой TaqI, то разрушение нуклеиновых кислот проводят при температуре в диапазоне от около 60 до около 70°C .

Если в способе используют нуклеазу, расщепляющую ДНК, которая является нуклеазой PhoI, то разрушение проводят при температуре 75°C или при температуре в диапазоне от около 70 до около 80°C .

Предпочтительно в способе используют клетку-хозяина, которая является растительной, животной или клеткой микроорганизма.

Причем, например, микроорганизм выбирают из группы, состоящей из дрожжей, грибов, водорослей, бактерий и архей, например, родов *Yarrowia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Corynebacterium*, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Mortierella*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cryptocodium*, *Schizochytrium* и *Thraustochytrium*, в частности вида *Yarrowia lipolytica*.

Клетка-хозяин, используемая в способе по изобретению, может содержать несколько генов термофильных нуклеаз, рекомбинантную ДНК согласно указанному способу оптимизируют таким образом, чтобы она включала дополнительные сайты расщепления термофильной нуклеазой, например в указанной рекомбинантной ДНК на каждые 500 или менее нуклеотидов должен быть один сайт расщепления нуклеазой.

Следующим предложенным объектом изобретения является генетически модифицированная клетка, которая продуцирует один или более конечных продуктов, не являющихся термофильной нуклеазой, которая содержит по меньшей мере один гетерологичный ген термофильной нуклеазы, причем кодируемая данным геном термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии при температуре, при которой происходит нормальный рост указанной генетически модифицированной клетки.

В такой клетке нуклеаза может быть нуклеазой, расщепляющей ДНК, например нуклеазой TaqI или нуклеазой PhoI.

Сама клетка может быть растительной, животной или клеткой микроорганизма.

Причем микроорганизм выбирают из дрожжей, грибов, водорослей, бактерий и архей, например, родов *Yarrowia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Corynebacterium*, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Mortierella*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cryptocodium*, *Schizochytrium* и *Thraustochytrium*, в частности вида *Yarrowia lipolytica*.

Конечным продуктом может быть продукт, который выбирают из фитоена, ликопина, бета-каротина, альфа-каротина, бета-криптоксантина, лютеина, зеаксантина, астаксантина, кантаксантина, эхинонена, 3-гидроксиэхинонена, 3'-гидроксиэхинонена, адонирубина, виолаксантина, адониксантина, убихинона, витамина К, витамина Е, ретинола, ретиналя, ретиноевой кислоты, ретинилпальмитата и их модифицированных форм.

Клетка может содержать несколько генов термофильной нуклеазы.

Еще одним предложенным объектом изобретения является применение термофильной нуклеазы для разрушения нуклеиновых кислот клетки-хозяина *in vivo* и/или *in situ*, причем термофильная нуклеаза является гетерологичной для клетки-хозяина.

В таком применении нуклеаза может быть нуклеазой, расщепляющей ДНК, и нуклеиновые кислоты

являются дезоксирибонуклеиновыми кислотами, в частности рекомбинантными ДНК.

Наконец, еще одним предложенным объектом по изобретению является способ получения продукта биомассы, не содержащего активных молекул нуклеиновых кислот и являющегося продуктом клетки-хозяина, которая содержит гетерологичный ген термофильной нуклеазы, согласно которому

а) выращивают клетку-хозяин при температуре, при которой термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии;

б) изменяют температуру для активации термофильной нуклеазы, в результате чего происходит разрушение нуклеиновых кислот клетки-хозяина; и

с) выделяют продукт биомассы.

Согласно данному способу нуклеаза может быть нуклеазой, расщепляющей ДНК, и нуклеиновые кислоты являются дезоксирибонуклеиновыми кислотами, в частности рекомбинантными ДНК.

Температура на стадии (а) указанного способа может быть оптимальной для роста клетки-хозяина, а разрушение нуклеиновых кислот проводят при температуре в пределах отклонения $\pm 5^{\circ}\text{C}$ от значения, оптимального для указанной термофильной нуклеазы.

Перечень последовательностей

Нуклеотидные последовательности, приведенные в прилагаемом перечне последовательностей, изображены с использованием стандартных буквенных аббревиатур, обозначающих основания нуклеотидов. Для каждой нуклеотидной последовательности приводится только одна цепь, но, разумеется, комплементарная цепь тоже включается соответственно представленной цепи путем отсылки. В прилагаемом перечне последовательностей

SEQ ID NO: 1 - нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая нуклеазу TaqI из *Thermus aquaticus*, оптимизированная для экспрессии в клетках *Yarrowia lipolytica* и включающая сайты рестрикции для клонирования и сайт связывания рибосомы (5').

SEQ ID NO: 1:

gctagccacaaaaatggcttcactcaggctcagaaggctcttgagactttcgagcgattctcgcttctcttgacctggagtccta
ccagcagaagtaccgacctcaagactgttgagcaggacctccccgagagctgaaccccttcccgacctgtacgagcactactggaa
ggcccttgaggataaccctccttctgggcttcgaggagttcttgaccactggtgggagaagcgactcgacccctcgacgagttcattcg
aaagtacttttgggggtgctcctacgctttgttgactggccttgaggctcgactgtaccgaactgccgttccatctggactcagttcacttc
tgctaccgatggaacgcctcctcgagcttcccttgaggccgccccgagcttgacgcccaggcgattgacgcccgtgattcacacttccg
gttctctaccggaatccagatcaagaaggagacttaccgatccgaggccaagtccgagaaccgatttctccgaaagcagcgaggcaccg
ccctcatcgagattccctacaccttcagactcccaggagcttgaggagaaggccaagcgagcccaggttaacggagagacttaccgac
tttgggccaaggttgctcaccaccttgaccgacttgagaacgggtttgtcattttcgagagtttacgttaagtctattgagctttctccagaa
gaacgctcccacccttttgactcattcgatgggaccgagttgctcaggaggccctcaccgccccctaaacgcgt

SEQ ID NO: 2 - неоптимизированная нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая нуклеазу TaqI из *Thermus aquaticus*.

SEQ ID NO: 2:

atggcttcacacaagcccagaaagcgctcgaacttttgagcgttttctcgcaagcttgacctcgagtcctaccagcaaaagt
accgcccattcaaaacgggtgaacaagacctgcctaggagctgaacccgctccggacctgtacgagcattattgaaagcgcttgagga
taacccttcttctgggcttcgaagagttcttgaccactggtgggaaaagcgctacggcccttgacgagttcatagcaatacttttg
ggatgctcctacgcgtttgttcgcttgggcttcgaggctaggctgtaccgaacgccgtttccatctggactcagtttacttctgctaccgctg
gaacgcctcctgcgagcttctctagaagctgccccagaactcgacgcccgaaggatagacgcgctgattcatacaagcgggtcctcaac
aggaatccagatcaaaaaggaaacttaccgttccgaggccaagagcgagaaccgcttttaagggaagcaagaggcaccgcccctcatcg
agattccctacaccttcagacaccagaggagctcgaagaaaaagccaaacgggcaagagtgaacggagaaacctaccgtctatgggc
caaggttgacaccatttggaccgtctagaaaacggattcgtcattttcgggaaagtattgtgaaaagcattgagcttttctccagaaaaacg
ctcctaccctatctgggctcatcgctgggacaggggtggcccaggaagccctcaccgccccgtga

SEQ ID NO: 3 - аминокислотная последовательность нуклеазы TaqI, определенная из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3:

MASTQAQKALETFERFLASLDLESYQQKYRPIKTVEQDLPRELNPLPDLYEHYW
 KALEDNPSFLGFEEFFDHWWEKRLRPLDEFIRKYFWGCSYAFVRLGLEARLYRTAVSIW
 TQFHFCYRWNASCELPLEAAPELDAQGIDALIHTSGSSTGIQIKKETRSEAKSENRLRK
 QRGTALEIPYTLQTPEELEEKAKRARVNGETYRLWAKVAHHLDRLENGFVIFRESYVK
 SIELFLQKNAPTL SGLIRWDRVAQEALTAP

SEQ ID NO: 4 - нуклеотидная последовательность ДНК открытой рамки считывания гетерологичного гена *carB*, содержащегося в клетках штамма *Yarrowia lipolytica*.

SEQ ID NO: 4: ген *carB*

atgtccaagaacacattgtcattatcggtgctggcgtgggtggcagcgctacagctgctcgttggcccggaaggcttcaagg
 tctactgtgggtgagaaaaacgacttgggtggcgccgctgctccttgatccatcaccaggccatcgcttggatcaggggcccgctgctctac
 ctgatgcccaagtactttagggacgccttggcgtatggacgagcgcattcaagaccacctggagctgctgcatcgacacaactaca
 aggtgcactttagcagcgtgagtcgacccagctgctgctgacttgacacgcatgaaggctgaattggaccgctggagggcccccttg
 tttggccgattcctggattcatgaaagagacacacatccactacgaaagcggcacccctgattgcgctcaagaagaatttgaatccatctg
 ggacctgattcgcatcaagtacgctccagagatcttgccttgacacctgttggcaagatctacgaccgcttccaagtacttcaagaccaa
 gaagatgcgcatggcattcacgttgcagaccatgtatatgggcatgtcgccctacgatgcgctgctgtctacagcctgttgacgtacaccga
 gttcgctgaaggcatctggatccccgtggcggttcaacatgggtggtcagaagctagaggcgattgcaaagcaaaagtacgatgccgag
 ttatctacaatgcgctgttccaagattaacaccgatgatgccaccaacaagtacaggtgtaaccttggaaaatggccacatcatcgat
 gccgatgcgggtgtgtgaacgcagatctggtctatgcttatcacaatctgttgcctccctgccgatggacgcaaaacacactggcttccaag
 aaattgacgtcttcttccatttcttactgggtccatgtccaccaagggtgcctcaattggacgtgcacaacatcttttggccgaggcttatcagg
 agagctttagcgaatcttcaaggacttggcctgccttctgaagcctccttctacgtcaatgtgccctctcgcacgacatccttctgctgctccc
 acggcaaggactctgctattgttgggtgcctattggcatatgaagagcaagacggcgatgctccaccgagaactacccggccatgggtg
 gacaaggcacgcaagatgggtgctgggtgattgagcgtcgtcgggatgctgaatttgcgagactgattgagcatgagcaagtcaatga
 tcccgtgtatggcagagcaagttcaatctgtggagaggctcaattctgggttctctcatgatgtgcttcagggtgctgtgttccgtcccagca
 caaaggattctaccggctgttatgataacctattcttgggtgcaagcacgcatcccggaactgggtgtccattgtccttgacggaagcaa
 gctcacctctgaccaagttgtcaagagcttggaaagacgcccgaagcaagaagatcgagatggagaacacgcaagcaccttggaggga
 gctgatgctgaatcgacattccctgtgtgttctggtgctgctgcttgggtcatgttatgttctttacttctccctcaatccaatggcca
 aacgcccgcacttttcaataatttgaacctgaagtattccgcttcataacttaattgtcatttaa

SEQ ID NO: 5 и 6 - ПЦП-праймеры 5' и 3' для фрагмента длиной 529 пар оснований в пределах последовательности SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 5 - праймер MO4641: caatctgttgctccctgc

SEQ ID NO: 6 - праймер MO4642: atcctttgtgctgggacgg

SEQ ID NO: 7 - нуклеотидная последовательность ДНК открытой рамки считывания гетерологичного гена *crtZ-Dc*, содержащегося в клетках штамма *Yarrowia lipolytica*.

SEQ ID NO: 7: ген *crtZ-Dc*

atgcttgcgttgggaataaccgggacgtgctactgactatcatcatcatggaaggggtggcaacgttcgcacacaagtacatcat
 gcacggctggggatggggctggcatattcgaccataccccgcgcaagggggcgtttagcgtaacgatctctatcggtggtgttgcg
 ctactggccattgctgattacgcggcagcgaagggtactggcggcttcagtgattggcgcgggaatgaccggctacggcgtgatct
 acttatcgttcacgatggtcttctccaccagcgtggcgttccgttacgtgccgcggcggtatctgcggcctctacatggcacacc
 ggctgcatcacgggtgctggggcgcggaagggtgcgtctccttgggtttatctacccccaccgggtggacaagtgcaggcggtgctg
 cggaacgtaacggcagaccgcccagcgcgggcgctgccagagggtcgggatcgcgcgggcgccagctgccttccgggaagccatc
 gcctgcttcgcgccggaataa

SEQ ID NO: 8 - нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая нуклеазу *PhoI*, из *Rugosoccus horikoshii* OT3, оптимизированная для экспрессии в клетках *Yarrowia lipolytica* и включающая сайты рестрикции для клонирования и сайт (5') связывания рибосомы.

SEQ ID NO: 8:

tgctagccacaaaatggagatgtacaagggttggtcgataacctggtgattccctccagatttactccccgcttcttggatcca
ggaggagcttattaacaacggcttctacgttccccgatctctgatcgaaagggttctatgccattccattgttactccgatttgggtggtcga
gttatttctattgagcgactcattctcccgagtggttggagatttctcccgagcagctcggttgggaggagacttaccctgagaacaagcgag
gtttcaagctccctaaggaggagggttacgttgatgtttctatttctaacgattccattatttgcagcttgacgttaagaactaccaccttgagcg
aacctccattcgaggcatcaacctgagaagtggaagaactgggttatgtttacattgatctcaagtacgttgatgagttcattaacgctcttcg
agagcacatccctgcttccgagaacaagacccgagttattcgagagaagcagcaggggtggcaaggagggttacttactacgctaagggttaac
gtcaagaacttctcttctgtctcggttgttctgatctcgctcagcgataaccttcagatcaaggctaaggagcactgtaacattaccctggttctc
ccacctgtaacgattctctcttaagctcaagctccgacttgagtacgatccctccattaccaccttgcctaaggttggtattgccaagatttctg
gtaagcgaccccgatcatggttaagctcaccttaccgagactaagaccattcgagggtattctcaagcctgagattaagggttaaggcccgga
ggtaagctcggttactgtgatcaccgagagaagcgacagtacattgctcttgacctcttcgattttacaaggccctcggttctactaagaagtac
gagggttaagctccctaccgatgattaaacgct

SEQ ID NO: 9 - неоптимизированная нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая нуклеазу
PhoI из *Pyrococcus horikoshii* OT3.

SEQ ID NO: 9:

atggaatgtataagggtggaagataccttgttgattcccttcaaatatatttcccgcttactagagatccaggaggagcttataaa
taatggcttctacgtaccaggagcccagatagaaaagtaagcatgccattccaatagtatactccgatttggaggagggttatctatt
gagagggttaatacctccggagtggttgaatctcgccagagcaattaggttgggaagaaactatttagagaacaaacgtggttttaacta
cctaagaagaggtctacgtggatgtagtataagcaacgattccataatattcgagctagacgtgaaaaattatcacctgaaaggacatcca
ttagaggcatcaatcctgaaaaatggaagaattgggtgatgttttatattgattgaagtacgtagatgagttcattaacgctttaagggaacata
tccagcttccgaaaataaaacaagggttattcgtgaaaagcagcaagggggcaaggagttacatattatgctaaagttaacgtcaagaatt
tcagcttatgcttaggatgcttcgatctcgctcaaaggtatcttcaaatcaaagctaaagagcactgtaacatatatccaggctcaccaatgt
aacgattctctaagcaaatataaattaaggcttgaatacgatccatccattactaccttgcctaaggttgaatagccaagatctcaggcaagag
acccgatcatggttaataaacctctacggaaactaaaactataaggggaatacttaagccagaaataaaaggtaaggcgctggttaaac
ttgtatattcgatcacagagaaaagagacagtatatagcttggacttgttgattttacaaggccttggttaagcactaagaagtatgaaggtta
agctaccgactgatgattaa

SEQ ID NO: 10 - аминокислотная последовательность нуклеазы PhoI, определенная из нуклеотид-
ной последовательности SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO: 10:

MEMYKVGRYLVDSLQIYFPASLEIQEELINNGFYVPRSPDRKVSMPPIVYSDFGG
RVISIERLIPPEWLEISPEQLGWEETYLENKRGFKLPKKEEVYVDVSISNDSIIFELDVKNYH
LERTSIRGINPEKWKNWVMFYIDLKYVDEFINALREHIPAFENKTRVIREKQQGGKEVTY
YAKVNVKNFSLCLGCFDLAQRYLQIKAKEHCNIYPGSPTCNDLSKLRLEYDPSITTF
AKVGIKISGKRPQIMVKLTSTETKTIRGILKPEIKGKARGKLVYCDHREKRQYIALDLF
DFYKALVSTKKYEGKLPTDD

SEQ ID NO: 11 нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая нуклеазу TaqI, из *Thermus aquaticus*, оптимизированная для экспрессии в *Escherichia coli* и включающая сайты рестрикции для клонирования.

SEQ ID NO: 11:

CCATGGCATCAACCCAAGCACAAAAAGCCCTGGAAACCTTCGAACGCTTCCT
GGCGAGCCTGGACCTGGAATCATACCAACAGAAATACCGTCCGATTAAAACCGTGG
AACAGGATCTGCCGCGTGAACCTGAACCCGCTGCCGGACCTGTATGAACATTACTGG
AAAGCACTGGAAGATAATCCGTCCTTTCTGGGGCTTCGAAGAATTTTTCGATCACTGG
TGGGAAAAACGTCTGCGCCCGCTGGACGAATTTATTCGCAAATATTTCTGGGGCTGC
AGCTACGCGTTTGTTCGTCTGGGTCTGGAAGCGCGTCTGTATCGCACCGCCGTCAGC
ATCTGGACGCAATTTCAATTTCTGCTACCGCTGGAACGCCTCTTGTGAACTGCCGCTG
GAAGCAGCACCGGAACCTGGATGCACAGGGCATTGACGCTCTGATCCACACCAGTGG
CAGCTCTACGGGTATCCAAATCAAAAAAGAAACCTACCGTAGTGAAGCAAAATCCG
AAAAATCGTTTCTGCGCAAACAGCGTGGTACGGCTCTGATTGAAATCCCGTATACCC
TGCAAACGCCGGAAGAAGCTGGAAGAAAAAGCAAAACGTGCTCGCGTCAACGGCGA
AACCTACCGTCTGTGGGCGAAAGTGGCCCATCACCTGGATCGCTGGAAAATGGTTT
TGTGATTTTCCGTGAATCATACGTAAATCGATCGAACTGTTCTCCTGCAGAAAAACGC
CCCGACCTGTGCGGGCTGATTGCTTGGGACCGTGTGCGACAAGAAGCACTGACCGC
TCCGTGAGGTACC

SEQ ID NO: 12 и 13 - ПЦР-праймеры 5' и 3' для амплификации *taqI* с использованием pMB6736 в качестве матрицы для экспрессии в *Corynebacterium glutamicum*. Праймеры включают сайты рестрикции для клонирования.

SEQ ID NO: 12 - праймер MO9315:

CACACACCATGGCTTCCACTCAGGCTCAG

SEQ ID NO: 13: - праймер MO9316:

CACACAGGTACCTTAGGGGGCGGTGAGGGCCTCC

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 демонстрирует разрушение клеточной ДНК у штамма *Y. lipolytica*, несущего ген *taqI* нуклеазы (справа), при двух разных температурах в различные моменты времени; в клетках штамма, не содержащего этого гена, разрушения ДНК не происходит (слева).

Фиг. 2 демонстрирует разрушение клеточной ДНК у штамма *Y. lipolytica*, несущего ген *taqI* нуклеазы (справа), при различных температурах; в клетках штамма, не содержащего этого гена, разрушения ДНК не происходит (слева).

Фиг. 3 демонстрирует полное разрушение ДНК по результатам ПНР.

Фиг. 4 иллюстрирует продуцирование атаксантина и его предшественников двумя разными штаммами *Y. Lipolytica*: несущим ген *taqI* нуклеазы и не содержащим его.

Фиг. 5 иллюстрирует продуцирование зеаксантина и его предшественников штаммом *Y. lipolytica*, несущим ген *taqI* нуклеазы.

Фиг. 6 демонстрирует разрушение ДНК в клетках разных штаммов *Y. lipolytica*, продуцирующих атаксантин или зеаксантин, в ферментерах в различные моменты времени.

Фиг. 7 демонстрирует температурный диапазон нуклеазной активности в клетках *Y. lipolytica* в области значения, оптимального для данной нуклеазы - *TaqI* либо *PhoI*.

Фиг. 8 иллюстрирует нуклеазную активность фермента *TaqI* в клетках *E.coli*, в которых экспрессируется ген *taqI* нуклеазы.

Фиг. 9 иллюстрирует нуклеазную активность фермента *TaqI* в клетках *C. glutamicum*, в которых экспрессируется ген *taqI* нуклеазы.

Фиг. 10 демонстрирует температурный диапазон нуклеазной активности в клетках *C.glutamicum* в области значения, оптимального для нуклеазы *TaqI*

Осуществление изобретения

Данным изобретением предлагается способ разрушения нуклеиновых кислот *in vivo* и/или *in situ* с использованием гетерологичных термофильных нуклеаз. Этот способ предназначен для разрушения дезоксирибонуклеиновых кислот организма, в частности рекомбинантных ДНК, и тем самым для ликвидации биологической активности дезоксирибонуклеиновых кислот на любой стадии в ходе продуцирования конечного продукта (продуктов). По данному изобретению в организм, нуклеиновые кислоты которого нужно разрушить, внедряется гетерологичный ген термофильной нуклеазы. При той температуре, при которой данный организм в норме растет, эта термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии, но при увеличении температуры (предпочтительно до значения в диапазоне близ оптимальной для данного фермента температуры) может активироваться.

По данному изобретению термофильные нуклеазы используются для ликвидации биологической активности нуклеиновых кислот организма-хозяина. Выражение "ликвидация биологической активности нуклеиновых кислот" относится к разрушению нуклеиновых кислот, осуществляемому по данному изобретению. Нуклеиновая кислота считается биологически неактивной, когда ее молекула расщеплена так, что более не способна к репликации, транскрипции, и не может происходить ее трансляция. Предпочтительно подлежащие такому воздействию нуклеиновые кислоты являются рекомбинантными ДНК. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты расщепляется на фрагменты, состоящие из 500 или менее нуклеотидных пар.

По данному изобретению термофильные нуклеазы продуцируются клетками-хозяевами, а не добавляются извне; таким образом, расщепление ими нуклеиновых кислот клеток-хозяев происходит *in vivo* и/или *in situ*. Термин "*in vivo*" относится к расщеплению нуклеиновых кислот внутри клетки-хозяина под действием термофильной нуклеазы, продуцируемой этой клеткой, которая в момент расщепления может быть жизнеспособной или нежизнеспособной. Термин "*in situ*" относится к расщеплению нуклеиновых кислот под действием термофильной нуклеазы, продуцируемой клеткой-хозяином, после того как ее клеточная стенка разрушена (полностью либо частично). Например, расщепление нуклеиновых кислот *in situ* может осуществляться в конце процесса ферментации, когда клетки претерпевают лизис, чтобы высвободилось их содержимое. Разрушение нуклеиновых кислот может осуществляться тотчас после лизиса клеток или же после того, как произойдет какая-то дополнительная обработка среды, содержащей лизированные клетки.

В контексте данного изобретения термин "нуклеиновая кислота" означает одноцепочечную, двухцепочечную или частично двухцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или рибонуклеиновую кислоту (РНК).

Термин "ген" в настоящем документе относится к нуклеиновой кислоте (нуклеотидной последовательности), кодирующей полипептид и при необходимости содержащей определенные регуляторные элементы, которые могут влиять на экспрессию одного или более генных продуктов (то есть РНК или белка). Например, термин "ген термофильной нуклеазы" по данному изобретению относится к открытой рамке считывания (ORF), кодирующей полипептид, образующий термофильную нуклеазу, а также к нуклеотидным последовательностям, включающим открытую рамку считывания термофильной нуклеазы вместе с определенными промоторами, располагающимися в сторону 3'-конца от данной открытой рамки считывания и служащими для управления экспрессией гена нуклеазы, и/или с участком терминации транскрипции, и/или с другими регуляторными элементами.

Термин "гетерологичный" в настоящем документе относится к гену или полипептиду, не присущим от природы организму, в котором этот ген или полипептид экспрессируется. Ясно, что в тех случаях, когда нужно, чтобы гетерологичный полипептид экспрессировался в клетке-хозяине, часто желательно использовать кодирующие этот полипептид нуклеотидные последовательности, измененные соответственно неравному распределению синонимичных кодонов в кодирующей ДНК клетки-хозяина, и/или соединить кодирующие нуклеотидные последовательности с регуляторными элементами, действующими в клетке-хозяине. Например, когда клетка-хозяин принадлежит к роду *Yarrowia* (например, к виду *Yarrowia lipolytica*), часто бывает желательно изменить нуклеотидную последовательность гена, кодирующего данный полипептид, таким образом, чтобы она больше соответствовала предпочтениям кодонов, свойственным этому виду *Yarrowia*. В некоторых воплощениях данного изобретения нуклеотидную последовательность гена, кодирующего данный полипептид, изменяют для большего соответствия предпочтениям кодонов, свойственным виду, родственному клеткам-хозяевам. Такие воплощения предпочтительны, если нуклеотидную последовательность гена, кодирующего данный полипептид, трудно оптимизировать соответственно предпочтениям кодонов, свойственным клетке-хозяину, в силу характера эксперимента (например, клонирования) и/или по иным причинам. В некоторых воплощениях данного изобретения нуклеотидную последовательность гена, кодирующего данный полипептид, оптимизируют даже тогда, когда эта генная последовательность происходит из самой клетки-хозяина (и, таким образом, не является гетерологичной). Например, нуклеотидная последовательность гена, кодирующая нужный полипептид, может быть кодон-оптимизированной для экспрессии в определенных клетках-хозяевах, даже если такая последовательность выделена из этих клеток-хозяев. В таких воплощениях данного изобретения указанная нуклеотидная последовательность может быть далее оптимизирована соответственно предпочтениям кодонов, свойственным клетке-хозяину. Или же не гетерологичная кодирующая нуклеотидная последовательность гена может не быть кодон-оптимизированной, но зато присоединена к регуляторным элементам, отличным от ее собственных (эти регуляторные элементы могут быть взяты из другого гена данного организма-хозяина или принадлежать другому виду живых организмов). Рядовым специалистам в данной области техники должны быть известны предпочтения кодонов, свойственные данным клеткам-хозяевам, и они смогут осуществить на практике способы по данному изобретению и применить описанные в настоящем документе композиции, чтобы добиться оптимальной экспрессии нужного полипептида в данных клетках-хозяевах.

Термин "клетка-хозяин" в настоящем документе означает клетку любого типа, подходящую для внедрения в нее генетической конструкции или экспрессионного вектора. Внедрение в клетку-хозяин

генетической конструкции или экспрессионного вектора может осуществляться путем трансформации, трансфекции, трансдукции и прочего. Термин "клетка-хозяин" охватывает все потомство исходной клетки, не идентичное ей в силу мутаций, происходящих в процессе репликации. В предпочтительных воплощениях данного изобретения клетки-хозяева продуцируют один или более конечных продуктов, являющихся нужными биологическими соединениями или продуктами тонкого органического синтеза. Предпочтительно, чтобы клетки-хозяева являлись промышленным штаммом. Клетки-хозяева могут быть генетически модифицированными или же природными клетками, изначально не модифицированными генетически. Термин "генетически модифицированные клетки-хозяева" относится к клеткам-хозяевам, которые были модифицированы, подвергнуты генно-инженерным процедурам или иным манипуляциям, часто с целью добиться усиленной экспрессии определенных биологических соединений или продуктов тонкого органического синтеза.

Клетка-хозяин может быть любой клеткой - прокариотической (бактериальной или архейной) либо эукариотической, - способной быть использованной для продуцирования биологических соединений и/или продуктов тонкого органического синтеза с применением методов рекомбинантной ДНК.

Термин "биологические соединения", будучи известен в данной области техники, включает вещества, встречающиеся в живых объектах природы. Примеры биологических соединений включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) белки, полипептиды, аминокислоты, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды, углеводы и липиды.

Термин "продукты тонкого органического синтеза", будучи известен в данной области техники, включает вещества, которые используются в различных областях промышленности, например (перечисленное здесь не имеет ограничительного характера) в фармацевтической индустрии, в сельском хозяйстве, производстве косметических средств, пищевых продуктов и кормов для животных. Эти вещества включают органические кислоты, например виннокаменную, итаконную и диаминопимелиновую кислоты, липиды, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты (например, арахидоновую кислоту), двухатомные спирты (например, пропандиол и бутандиол), ароматические соединения (например, ароматические амины, ванилин и индиго), каротиноиды, витамины и кофакторы.

У высших животных утрачена способность синтезировать витамины, каротиноиды, кофакторы и некоторые другие необходимые для жизнедеятельности вещества, а поэтому им необходимо получать их извне, благо эти соединения синтезируются многими другими живыми организмами, например бактериями. Такие вещества являются биологически активными соединениями как таковые либо представляют собой предшественники биологически активных соединений, играя роль переносчиков электронов или интермедиатов тех или иных метаболических путей. Эти вещества, помимо своей питательной ценности, имеют большое промышленное значение: их используют в качестве красителей, антиоксидантов и катализаторов или для других технологических целей. Термин "витамин", будучи известен в данной области техники, включает питательные вещества, необходимые для нормального функционирования живого организма, который не способен их синтезировать самостоятельно. К витаминам относятся кофакторы и нутрицевтики. Термин "кофактор" включает небелковые соединения, необходимые для осуществления нормальной ферментативной активности. Это могут быть органические либо неорганические соединения; кофакторы по данному изобретению являются предпочтительно органическими соединениями. Термин "нутрицевтик" включает биологически активные добавки к пище (компоненты пищевых продуктов или отдельно принимаемые препараты), способствующие здоровью живого организма, в том числе животных, в частности человека. Примерами таких веществ могут служить витамины, антиоксиданты и определенные липиды (например, полиненасыщенные жирные кислоты).

Предпочтительными продуктами тонкого органического синтеза или биосинтетическими продуктами, которые могут продуцироваться организмами рода *Yarrowia*, являются каротиноиды (например фитоеин, ликопин, бета-каротин, альфа-каротин, бета-криптоксантин, лютеин, зеаксантин, астаксантин, кантаксантин, эхиненон, 3-гидроксиэхиненон, 3'-гидроксиэхиненон, адонирубин, виолаксантин, адониксантин и/или их формы, полученные в результате модификации (включая, но не ограничиваясь перечисленным здесь, изомеризацию, этерификацию, гликозилирование и расщепление); производные хинона, например убихинон (включая, но не ограничиваясь перечисленным здесь, кофермент Q₁₀ и хиноновые соединения Q₅ и Q₉); витамин K; витамин E; ретиноиды, например ретинол, ретиналь, ретиновую кислоту и ретинилпальмитат.

Прокариотические клетки-хозяева могут быть грамположительными либо грамотрицательными бактериями. Грамположительные бактерии включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) роды *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Paenibacillus* и *Streptomyces*. Грамотрицательные бактерии включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) *Escherichia coli*, роды *Pseudomonas* и *Paracoccus*.

Бактериальные клетки-хозяева могут быть каким-либо представителем порядка *Bacillales*, включая (но не ограничиваясь перечисленным здесь) виды *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis*.

Бактериальные клетки-хозяева могут быть каким-либо представителем рода *Streptomyces*, включая

(но не ограничиваясь перечисленным здесь) виды *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* и *Streptomyces lividans*.

Бактериальные клетки-хозяева могут быть каким-либо представителем рода *Paracoccus*, включая (но не ограничиваясь перечисленным здесь) виды *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus versutus*, *Paracoccus carotinifaciens*, *Paracoccus marcusii* и *Paracoccus zeaxanthinifaciens*.

Клетки-хозяева могут быть эукариотическими, например клетками млекопитающих, насекомых, растений, водорослей или грибов.

Клетки-хозяева водорослей могут быть из родов *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, например *Cryptocodinium cohnii*, и различные виды родов *Schizochytrium* или *Thraustochytrium*.

Клетки-хозяева могут быть клетками грибов. Термин "грибы" в настоящем документе включает отделы *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* и *Zygomycota* (согласно определениям по Hawksworth et al., In: Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Кембридж, Великобритания), а также *Oomycota* (см. выше Hawksworth et al., 1995, стр. 171) и все митоспорные грибы (см. выше Hawksworth et al., 1995).

Грибные клетки-хозяева могут принадлежать к нитчатым (мицелиальным) грибам. Термин "нитчатые (мицелиальные) грибы" включает все нитчатые (мицелиальные) формы представителей групп *Eumycota* и *Oomycota* (согласно определениям по Hawksworth et al., 1995, см. выше). У нитчатых (мицелиальных) грибов стенка мицелия обычно состоит из хитина, целлюлозы, глюкана, хитозана, маннана и других сложных полисахаридов. Вегетативный рост происходит путем удлинения гиф; катаболизм облигатно-аэробный. В отличие от таких грибов у дрожжей, например у *Saccharomyces cerevisiae*, вегетативный рост происходит путем почкования, а катаболизм состоит в брожении.

Клетки-хозяева нитчатых (мицелиальных) грибов могут быть представителями родов

Acremonium, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* или *Trichoderma*.

Например, клетки-хозяева нитчатых (мицелиальных) грибов могут принадлежать к видам

Aspergillus awamori, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcocroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* или *Trichoderma viride*.

Грибные клетки-хозяева могут быть также клетками дрожжей. Термин "дрожжи" в настоящем документе включает аскомицетовые дрожжи (порядок *Endomycetales*), базидиомицетовые дрожжи и дрожжи из группы несовершенных грибов (порядок *Blastomycetes*). Поскольку классификация дрожжей может измениться, в контексте данного изобретения дрожжи определяются, как описано в работе "Biology and Activities of Yeast" (Skinner, F.A., Passmore, S.M., Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

Дрожжевые клетки-хозяева могут быть представителями родов

Candida, Hansenula,

Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces, Schizosaccharomyces или *Yarrowia*, например, принадлежать к видам *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, *Schizosaccharomyces pombe* или *Yarrowia lipolytica*.

Трансформация клеток грибов осуществляется методом, включающим получение протопластов, трансформацию протопластов и регенерацию клеточной стенки путем, известным рядовым специалистам в данной области техники. Подходящие способы трансформации клеток-хозяев из родов *Aspergillus* и *Trichoderma* описаны в Европейском патенте № 238023 и в работе Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474. Подходящие способы трансформации грибов из рода *Fusarium* описана в работе Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 и в публикации WO 96/00787. Дрожжевые клетки можно трансформировать способами, описанными в работах Becker and Guarente, In: Abelson, J.N., Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163-168; Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933.

Для создания штаммов клеток-хозяев, несущих гетерологичные гены термофильных нуклеаз, рекомбинантную конструкцию гена термофильной нуклеазы вводили в вектор, специфичный для данного организма-хозяина, что обеспечивало оптимальную экспрессию данного гена в этих клетках-хозяевах. Такие векторы известны под названием "векторы для клонирования" (Pouwels et al., Eds., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985). Под векторами подразумеваются не только плазмиды, но и другие векторы, известные специалистам в данной области техники, например фаги, вирусы (например, вирус SV40, цитомегаловирус, бакуловирусы и аденовирусы), транспозоны, инсерционные последовательности (IS-элементы), космиды и линейные или кольцевые молекулы ДНК. В организме-хозяине эти векторы могут реплицироваться автономно или с хромосомами.

Векторы по данному изобретению обеспечивают получение рекомбинантных организмов, трансформированных, например, по меньшей мере одним вектором по данному изобретению; эти организмы можно использовать для продуцирования термофильных нуклеаз. Описанные выше рекомбинантные конструкции по данному изобретению предпочтительно внедряются в геном организма-хозяина и экспрессируются. Чтобы добиться экспрессии термофильных нуклеаз в желаемой экспрессионной системе, предпочтительно применять методы клонирования и трансфекции, известные специалистам в данной области техники. Подходящие экспрессионные системы описаны, например, в работе Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Eds., Wiley Interscience, New York 1997.

В некоторых воплощениях данного изобретения модифицированные клетки-хозяева содержат плазмиды, несущие гетерологичные гены термофильных нуклеаз; эти плазмиды автономно реплицируются в организме-хозяине.

ДНК считается рекомбинантной, если она получена путем применения технологии рекомбинантной ДНК. При этом используются такие методы как, например, клонирование, мутагенез, трансформация и др. (перечисленное здесь не имеет ограничительного характера). Технология рекомбинантных ДНК описана, например, в работах Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York (1989) и Ausubel F.M., et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York (1998).

Термин "нуклеаза" означает фермент, катализирующий гидролитическое расщепление эфирной связи между 5'-фосфатной группой одного нуклеотида и 3'-гидроксильной группой соседнего нуклеотида в молекуле нуклеиновой кислоты; таким образом происходит разрушение молекул ДНК и РНК. Нуклеазы известны у многих организмов. Нуклеазы расщепляют либо ДНК, либо РНК на более короткие цепочки нуклеотидов или даже на мономеры (нуклеотиды).

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения термофильная нуклеаза является нуклеазой, расщепляющей ДНК, причем молекула нуклеиновой кислоты, расщепляемая этой термофильной нуклеазой, является двухцепочечной или одноцепочечной. В одном из конкретных воплощений данного изобретения расщепляемая нуклеазой ДНК является рекомбинантной.

Хотя предпочтительные воплощения данного изобретения относятся к инактивации ДНК, предлагаемый способ позволяет инактивировать любые молекулы нуклеиновых кислот, включая РНК, гибриды РНК-ДНК или конъюгаты нуклеиновых кислот с белками.

Термин "нуклеаза, расщепляющая ДНК" означает нуклеазу, способную расщепить молекулы ДНК на более короткие цепочки нуклеотидов или на мономеры (нуклеотиды). В данной области техники такой фермент называют также "ДНКазой". Термин "нуклеаза, расщепляющая РНК" означает нуклеазу, способную расщепить молекулы РНК на более короткие цепочки нуклеотидов или на мономеры (нуклеотиды). В данной области техники такой фермент называют также "РНКазой".

Фермент, расщепляющий ДНК либо РНК, может быть эндонуклеазой или же экзонуклеазой. Эндонуклеаза - это фермент, разрывающий связи между нуклеотидами, образующими молекулу нуклеиновой кислоты, на всем протяжении полинуклеотидной цепи. А экзонуклеаза - это фермент, который осуществляют ступенчатое отщепление мононуклеотидов от одного или обоих концов полинуклеотидной цепи. По данному изобретению предпочтительны эндонуклеазы.

Термин "термофильная нуклеаза" означает фермент-нуклеазу, оптимальная активность которой достигается при температуре 45°C или больше. Указанная оптимальная активность наблюдается при температуре, оптимальной для активности данной нуклеазы. Оптимальную температуру для данной нуклеазы можно определить путем анализа *in vitro* или *in vivo*, когда данная нуклеаза экспрессируется в рекомбинантном организме-хозяине по данному изобретению, с использованием подходящего субстрата и в условиях (подразумевается состав среды, время анализа и прочее), соответствующих предполагаемому применению, что определяет специалист в данной области техники. Например, оптимальную температуру для нуклеазы TaqI обычно определяют *in vitro*, используя очищенный фермент TaqI. Фиксированное количество фермента инкубируют в течение 1 ч с 1 мкг ДНК фага λ в 50 мкл реакционной среды, в которой поддерживается заданная температура в диапазоне от 25 до 85°C. Оптимальная температура - это такая температура, при которой наблюдается наиболее полное расщепление субстрата (определяемое, например, путем гель-электрофореза рестрикционных фрагментов, образовавшихся в результате воздействия фермента TaqI на ДНК фага λ). И наоборот, под единицей фермента понимают количество этого белка, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК фага λ в 50 мкл реакционной среды при оптимальной температуре за 1 ч. Таким образом, оптимальная температура - это та температура, при которой количество белка-фермента, необходимое для полного расщепления субстрата, минимально. Для установления оптимальной температуры в пределах клетки невозможно обеспечить определенное соотношение количеств фермента и субстрата (ДНК), как это делается при анализе *in vitro*. Вместо этого применяется более прагматический подход. Если считать, что оптимальная температура *in vivo* близка к таковой *in vitro*, то данные, полученные в последнем случае, могут служить ориентиром. Определяют расщепление нуклеиновой кислоты нуклеазой при значениях температуры, оптимальных *in vitro* и близких к ним. Оптимальная температура - это такая температура, при которой наблюдается наиболее полное расщепление субстрата. Для некоторых нуклеаз оптимальная температура *in vivo* - это не точечное значение, а диапазон значений: полное расщепление геномной ДНК наблюдается в некотором диапазоне температур.

Термофильные нуклеазы, описываемые в настоящей заявке, включают как нативные термофильные нуклеазы, так и любые их гомологи или варианты, обладающие термофильной нуклеазной активностью. Средства для получения термофильных нуклеаз, используемых по данному изобретению, включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) выделение этих ферментов из термофильных организмов, модификацию гомологичных нуклеаз для придания им термофильной активности и/или увеличение термостойкости обычных ферментов путем их генно-инженерного преобразования и/или направленной эволюции. В отличие большинства организмов, термофильные виды хорошо себя чувствуют при более высоких температурах, оптимальная для их роста и жизнедеятельность температура составляет 50°C или выше. Большинство же клеток растет при более низких температурах и не выживает при температурах, предпочитаемых термофильными организмами. Например, известно, что обычные микроорганизмы растут при температуре от 25 до 40°C, культуры клеток млекопитающих растут при температуре около 37°C, культуры клеток растений и насекомых растут при сравнительно низких температурах. При температурах, выходящих за пределы диапазона оптимальных значений, термофильные нуклеазы теряют активность, и при той температуре, при которой растут культуры обычных микроорганизмов или других клеток, они неактивны. Уровень нуклеазной активности при температурах ниже оптимальной у различных нуклеаз различен, и его нужно определять для каждого отдельно взятого фермента. По данному изобретению считается, что термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии при данной (сравнительно низкой) температуре, если ее нуклеазная активность составляет менее 20% от максимальной активности, наблюдаемой при оптимальной для данного фермента температуре.

Способ по данному изобретению применим к широкому набору термофильных нуклеаз. Для применения по данному изобретению пригодна любая нуклеаза, которая находится в латентном состоянии при температуре, нормальной для роста микроорганизма-хозяина или культуры эукариотических клеток-хозяев, но проявляет высокую активность при оптимальной для себя температуре.

Некоторые термофильные нуклеазы менее пригодны для использования по данному изобретению, чем другие. Например, некоторые термофильные нуклеазы проявляют нуклеазную активность, хотя и низкую, при температурах от 25 до 37°C. Такая остаточная активность при температуре роста клеток-хозяев может ограничивать их рост и тем самым ослаблять образование продуцируемого этими клетками конечного продукта. У некоторых термофильных нуклеаз при оптимальной для них температуре нуклеазная активность недостаточно высокая, так что они неэффективно разрушают нуклеиновые кислоты. Поэтому, чтобы выбрать наилучшие для задач данного изобретения термофильные нуклеазы, требуется провести соответствующий скрининг таких ферментов.

Наилучшими кандидатами в контексте данного изобретения являются те термофильные нуклеазы, у

которых нуклеазная активность при нормальных для организма-хозяина температурах достаточно низкая, чтобы не вызывать существенного стресса для этих клеток, а при оптимальной для себя температуре они достаточно высоко активны, чтобы эффективно разрушать нуклеиновые кислоты клеток-хозяев.

Обладая свойством проявлять свою активность - расщеплять нуклеиновые кислоты - при температурах вне температурного диапазона нормального роста организма-хозяина, термофильные нуклеазы по данному изобретению можно использовать предпочтительно при контролируемом разрушении нуклеиновых кислот клеток-хозяев. Например, в одном из воплощений данного изобретения в клетки-хозяева вводят гетерологичный ген термофильной нуклеазы, которая там расщепляет клеточные нуклеиновые кислоты. По данному изобретению в клетку-хозяин, нуклеиновые кислоты которой нужно разрушить, внедряют ген термофильной нуклеазы. Такие клетки-хозяева выращивают при оптимальной для их роста и жизнедеятельности температуре, при которой гетерологичная термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии. Клетки-хозяева выращивают при этой температуре некоторое время до определенной стадии, например столько времени, чтобы по истечении его можно было собрать продуцируемое ими желаемое вещество, после чего активируют имеющуюся в клетках-хозяевах термофильную нуклеазу, изменяя температуру на оптимальную для нуклеазной активности данного фермента. В результате активации термофильной нуклеазы ДНК и/или РНК клетки-хозяина расщепляется этим ферментом, и, таким образом, активность ДНК и/или РНК в клетке-хозяине ликвидируется.

По данному изобретению вместо нативной термофильной нуклеазы можно использовать любые ее гомологи или варианты, если эти гомологи и варианты обладают термофильной нуклеазной активностью.

В другом воплощении данного изобретения в предлагаемом способе вместо гетерологичного гена термофильной нуклеазы используется гомолог или вариант нуклеазы самой клетки-хозяина, которому придана термофильность с помощью таких методов как рациональная инженерия ферментов и/или направленная эволюция.

В одном из воплощений данного изобретения в клетку-хозяин вводят одну термофильную нуклеазу, которая там расщепляет клеточные нуклеиновые кислоты. В другом воплощении данного изобретения в клетку-хозяин вводят две или более термофильных нуклеазы. Введением дополнительных термофильных нуклеаз достигается, например, увеличение эффективности разрушения нуклеиновых кислот.

В другом воплощении данного изобретения нуклеотидную последовательность рекомбинантной ДНК, которую нужно разрушить, оптимизируют таким образом, чтобы в ней появились дополнительные сайты расщепления термофильной нуклеазой. Добавление сайтов расщепления обеспечивает полное разрушение рекомбинантной ДНК. Рекомбинантная ДНК, подлежащая разрушению, может включать ген самой нуклеазы. В одном из конкретных воплощений данного изобретения нуклеотидная последовательность рекомбинантной ДНК, подлежащей разрушению, сконструирована так, что в ней на каждые 500 или менее нуклеотидов имеется один сайт расщепления нуклеазой. Сайт расщепления может быть сконструирован таким, чтобы его распознавала только одна определенная нуклеаза или же несколько разных нуклеаз. В другом воплощении данного изобретения нуклеотидная последовательность рекомбинантной ДНК, подлежащей разрушению, сконструирована так, что сайты нуклеазного расщепления, которые она включает, не влияют на аминокислотную последовательность ее белка-продукта.

Описанный выше метод разрушения нуклеиновых кислот можно осуществлять в любом масштабе - от лабораторного уровня до уровня промышленной ферментации. Как говорилось в разделе "Уровень техники" настоящей заявки, предпочтительно, чтобы ДНК клеток-хозяев, в особенности рекомбинантная ДНК, разрушалась до выделения желаемого продукта (например, в конце процесса ферментации). Данным изобретением предлагается способ разрушения и тем самым ликвидации активности рекомбинантной ДНК в биомассе. Биомасса может представлять собой клетки, собранные в результате культивирования микроорганизмов или более высоко организованных эукариотических клеток.

В одном из конкретных воплощений данного изобретения предлагается способ ферментации, в результате которого ликвидируется активность рекомбинантной ДНК в биомассе. В плане методики этот способ включает, например, следующие этапы.

Во-первых, в клетки-хозяева вводят ген, кодирующий термофильную нуклеазу по данному изобретению. Сконструированную нуклеотидную последовательность, содержащую ген термофильной нуклеазы, интегрируют в клеточный геном так, что она находится в составе хромосом либо остается вне хромосом. Во-вторых, клетки-хозяева выращивают в ферментере при температуре, оптимальной для их роста и жизнедеятельности и/или процесса продуцирования желаемого вещества. В-третьих, в конце процесса ферментации температуру в ферментере поднимают до оптимальной для активности используемой термофильной нуклеазы, и она, таким образом, активируется. Эта повышенная температура поддерживается в течение промежутка времени, достаточного для желаемого уровня разрушения ДНК (рекомбинантной или не рекомбинантной) в клетках-хозяевах. Затем собирают биомассу, из которой, если сама по себе она не представляет конечного продукта, получают нужный конечный продукт, при необходимости путем очистки.

В другом воплощении данного изобретения предлагаемый способ применяется для разрушения ДНК не в биомассе, а в частично очищенных продуктах. Например, в описанном выше процессе фермен-

талии термофильную нуклеазу активируют не перед сбором биомассы, а после того, как она собрана и далее обработана, так что получен частично очищенный конечный продукт. Тогда термофильную нуклеазу активируют, чтобы разрушить ДНК, содержащиеся в частично очищенном конечном продукте; после этого продельвают, если это нужно, его дальнейшую очистку. Во время первоначальной (частичной) очистки важно, чтобы сохранялась активность. Собственно, коль скоро активность термофильной нуклеазы сохраняется в ходе обработки, следующей за сбором биомассы, разрушение ДНК клеток-хозяев можно проводить на любой стадии после сбора биомассы.

Способ по данному изобретению можно использовать помимо ферментации во многих областях техники. Например, способ по данному изобретению можно использовать для ликвидации активности ДНК клеток-хозяев при производстве вакцин.

При коммерческом производстве противовирусных вакцин все больше применяются методы получения вакцин, содержащих вирусы или вирусные антигены, с использованием клеточных культур. Однако в данной области техники хорошо известно, что, если для получения вакцин использовались культуры клеток, существует риск воздействия содержащейся в вакцинном препарате остаточной ДНК клеток-хозяев на реципиента вакцины. Чтобы исключить присутствие каких-либо потенциальных онкогенов в конечном вакцинном продукте, ставится задача полного удаления ДНК клеток-хозяев из состава окончательного препарата производимой вакцины. Для разрушения нуклеиновых кислот клеток-хозяев, имеющих отношение к вирусам или их антигенам и присутствующим в клеточной культуре, можно применять способ по данному изобретению. Этот способ включает этапы: (а) введение гена термофильной ДНК-азы в культуру клеток-хозяев (тем самым создается новый штамм/линия клеток-хозяев); (b) инокуляция клеток указанного нового штамма/линии вирусом, против которого делается вакцина; (с) культивирование полученных зараженных клеток-хозяев, в ходе которого происходит репликация вируса и которое проводится при такой температуре, когда используемая термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии; (d) разрушение ДНК клеток-хозяев путем изменения температуры стадии (с) на такую, при которой данная термофильная нуклеаза активна; (е) сбор образовавшихся вирусных частиц; (f) выделение вируса. Вирус может быть, например, вирусом гриппа, но по данному изобретению можно получать любой вирус или вирусный антиген.

Способ по данному изобретению можно также применять для ликвидации активности нуклеиновых кислот в генетически модифицированных сельскохозяйственных культурах. Например, в генетически модифицированное сельскохозяйственное растение можно ввести термофильную нуклеазу по данному изобретению. Сельскохозяйственные культуры растут в полевых условиях, где температура обычно не превышает 50°C. После сбора урожая можно, например, проводить тепловую обработку полученного растительного материала при температуре, оптимальной для введенной термофильной нуклеазы, чтобы разрушить нуклеиновые кислоты растения-хозяина.

Способ по данному изобретению можно также применять для снижения вязкости клеточных лизатов. В данной области техники хорошо известно, что при лизисе клеток из них высвобождается ДНК, из-за чего получаемый лизат становится очень вязким. Из-за высокой вязкости лизата затруднена дальнейшая его обработка. Термофильные нуклеазы расщепляют длинные молекулы ДНК на короткие олигонуклеотидные фрагменты, и в результате вязкость, обусловленная присутствием ДНК, снижается, причем снижение вязкости можно проводить контролируемым образом.

По данному изобретению термофильной нуклеазой может быть, например, эндонуклеаза TaqI из *Thermus aquaticus*. Для фермента TaqI оптимальной является температура 65°C. По данному изобретению можно использовать и другие термофильные нуклеазы. Примеры термофильных нуклеаз, которые можно использовать по данному изобретению, помимо TaqI включают: Tsp509I с оптимальной температурой 65°C, MwoI с оптимальной температурой 60°C, PhoI с оптимальной температурой 75°C, BsaII с оптимальной температурой 60°C и BspQI с оптимальной температурой 50°C.

Собственно говоря, по данному изобретению может использоваться любая известная или еще не известная в данной области техники термофильная нуклеаза, если она обладает высокой расщепляющей активностью в отношении нуклеиновых кислот при оптимальной для себя температуре, но находится в латентном состоянии при более низкой температуре, при которой нормально растут клетки-хозяева - микроорганизмы или культуры клеток высших организмов.

В пределах объема данного изобретения предпочтительно, чтобы расщепление нуклеиновых кислот происходило при температуре, о которой известно, что она является оптимальной для активности данной термофильной нуклеазы. Например, разрушение нуклеиновых кислот клеток-хозяев при помощи термофильной нуклеазы TaqI нужно проводить при температуре 65°C, потому что этот фермент наиболее активен именно при 65°C. Однако оптимальная температура по данному изобретению не ограничивается одним "точечным" значением. По данному изобретению предпочтительной для разрушения нуклеиновых кислот температурой является также любое значение в пределах отклонения $\pm 5^\circ\text{C}$ от известной оптимальной для данной термофильной нуклеазы температуры. Например, в случае фермента TaqI предпочтительным является любое значение температуры в пределах диапазона от 60 до 70°C. Другой пример: известно, что термофильная нуклеаза PhoI наиболее активна при 75°C. Предпочтительным при использовании нуклеазы PhoI значением температуры является любое значение в пределах диапазона 70-80°C. В

частности, предпочтительно, чтобы температура для активации термофильной нуклеазы была в пределах $\pm 1^\circ\text{C}$, $\pm 2^\circ\text{C}$, $\pm 3^\circ\text{C}$ или $\pm 4^\circ\text{C}$ от известной оптимальной для активности данного фермента температуры. Так, в одном из воплощений данного изобретения температура, при которой осуществляют активацию термофильной нуклеазы, находится в пределах отклонения $\pm 5^\circ\text{C}$ от известного оптимального для данной нуклеазы значения.

Специалистам в данной области техники понятно, что температура для активирования термофильной нуклеазы ограничивается не только отклонения $\pm 5^\circ\text{C}$ от известной оптимальной для активности данной термофильной нуклеазы температуры. Для тепловой активации термофильной нуклеазы можно брать любую температуру, при которой нет активного клеточного роста организма-хозяина, но термофильная нуклеаза проявляет ферментативную активность. Например, для активации фермента TaqI можно использовать температуру 75°C , при которой клетки-хозяева не размножаются активно, а ферментативная активность у этой термофильной нуклеазы есть. В одном из воплощений данного изобретения активация термофильной нуклеазы осуществляется при температуре или в диапазоне температур, при которых используемая термофильная нуклеаза обладает 20% или более своей оптимальной ферментативной активности. В другом воплощении данного изобретения активация термофильной нуклеазы осуществляется при температуре или в диапазоне температур, при которых клеточный рост организма-хозяина происходит со скоростью 20% или менее от оптимальной для этого организма скорости клеточного роста или вообще не происходит, а используемая термофильная нуклеаза проявляет 20% или более от своей оптимальной ферментативной активности. В другом воплощении данного изобретения активация термофильной нуклеазы осуществляется при температуре от 40 до 100°C .

В отношении степени, до которой можно в каком-либо диапазоне температур проводить разрушение нуклеиновых кислот без ущерба для его эффективности, предпочтительным является любое значение температуры в пределах данного диапазона, при котором достигается оптимальное сочетание других показателей, включая (но не ограничиваясь перечисленным здесь) титр конечного продукта, стабильность конечного продукта, чистоту конечного продукта, выход конечного продукта, трудоемкость обращения с материалом для последующих этапов обработки и прочее.

Таким образом, в объем данного изобретения входит тот факт, что для активации термофильной нуклеазы может быть выбрано любое значение температуры, при котором разрушение нуклеиновых кислот происходит эффективно. Иногда при такой температуре не достигается наибольшая ферментативная активность используемой термофильной нуклеазы, но в сочетании с некоторыми дополнительными факторами достигается наилучшая общая эффективность. Например, вместо отдельного этапа тепловой активации термофильной нуклеазы можно осуществлять тепловую пастеризацию. Путем постепенного нагревания биомассы в ходе пастеризации достигается за один этап как пастеризация клеток-хозяев, так и активация термофильной нуклеазы в этих клетках, что удешевляет производство. В такой ситуации оптимальная температура или оптимальный температурный диапазон оказываются промежуточным моментом приближения к температуре пастеризации.

Способ разрушения нуклеиновых кислот по данному изобретению осуществляется относительно быстро. По одному из воплощений данного изобретения разрушение нуклеиновых кислот осуществляется при оптимальной для используемой термофильной нуклеазы температуре на протяжении менее 48 ч, менее 24 ч, менее 1 ч, менее 40 мин, менее 30 мин или менее 20 мин. Оптимальную продолжительность определяют опытным путем для каждой термофильной нуклеазы и конкретных условий эксперимента.

Данное изобретение можно применять в отношении любых клеток-хозяев. Примеры клеток-хозяев включают микроорганизмы и высшие эукариотические организмы, например клетки сельскохозяйственных растений или животные клетки. По данному изобретению микроорганизмы могут быть прокариотическими, например бактериями или археями, либо эукариотическими, например высшими или низшими грибами, включая дрожжи, водорослями или простейшими. По одному из предпочтительных воплощений данного изобретения микроорганизмы представляют собой бактериальные клетки, клетки дрожжей или иных грибов либо клетки микроводорослей.

В некоторых воплощениях данного изобретения организм, нуклеиновые кислоты которого разрушают способом по данному изобретению, является микроорганизмом, относящимся к одному из следующих родов (перечисленное здесь не имеет ограничительного характера): *Yarrowia*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Mortierella*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cryptocodium*, *Schizochytrium* и *Thraustochytrium*.

В одном из воплощений данного изобретения клетки-хозяева принадлежат к виду *Yarrowia lipolytica*. К преимуществам *Y. lipolytica* можно отнести, например, сравнительную легкость генетических и молекулярно-биологических манипуляций, известность и доступность нуклеотидной последовательности генома, способность расти в различных недорогих условиях, способность достигать высокой плотности в культуре, отсутствие прецедентов каких-либо негативных для человека эффектов при использовании. На сегодняшний день в коммерческих целях клетки *Y. lipolytica* используются весьма широко.

Клетки *Escherichia coli* полезны по данному изобретению, поскольку это наиболее часто используемые бактерии, в частности они обычно служат носителем рекомбинантной ДНК.

Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* также полезны в качестве организма-хозяина по данному изобретению, в частности благодаря сравнительной легкости манипулирования с ними в экспериментах и большому опыту исследовательской работы с этими клетками.

Клетки-хозяева по данному изобретению включают также клетки высших эукариотических организмов. Термин "высший эукариотический организм" означает эукариотические клетки высокого уровня развития, какие свойственны, например, животным или растениям. Клетки высших эукариотических организмов не способны осуществлять все жизненно важные биохимические и метаболические функции независимо; их можно выращивать в культуре. Клетки высших эукариотических организмов, которые можно использовать по данному изобретению, включают, в частности, клетки млекопитающих, растений, насекомых или птиц. По одному из воплощений данного изобретения используемые клетки высшего эукариотического организма являются клетками млекопитающего. По другому воплощению данного изобретения используемые клетки высшего эукариотического организма являются растительными клетками. По другому воплощению данного изобретения используемые клетки высшего эукариотического организма являются клетками насекомого.

По одному из воплощений данного изобретения разрушение нуклеиновых кислот клеток-хозяев происходит без влияния или с минимальным влиянием на другие клеточные компоненты организма-хозяина. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения разрушение нуклеиновых кислот клеток-хозяев происходит без влияния (или с минимальным влиянием) на продуцирование биологических соединений и/или продуктов тонкого органического синтеза, для производства которых получены и при необходимости модифицированы данные клетки-хозяева. В одном из воплощений данного изобретения клетками-хозяевами служат клетки, принадлежащие к роду *Yarrowia*, а биологические соединения, продуцирование которых этими клетками достигнуто методами генетической инженерии, включают фитонен, ликопин, бета-каротин, альфа-каротин, бета-криптоксантин, лютеин, зеаксантин, астаксантин, кантаксантин, эхиненон, 3-гидроксиэхиненон, 3'-гидроксиэхиненон, адонирубин, виолаксантин, адониксантин, убихинон, витамин К, витамин Е, ретинол, ретиналь, ретиновую кислоту, ретинилпальмитат и/или их модифицированные формы, в том числе полученные путем изомеризации, этерификации, гликозилирования и расщепления этих веществ (названное здесь не имеет ограничительного характера), в том числе продукты расщепления этих веществ. В одном из воплощений данного изобретения клетки *Yarrowia* генетически модифицированы. В одном из конкретных воплощений данного изобретения генетически модифицированные клетки *Yarrowia*, несущие ген термофильной нуклеазы, представляют штамм *Yarrowia lipolytica* ML12924, а биологическое соединение, которое они продуцируют - это астаксантин. В другом воплощении данного изобретения генетически модифицированные клетки *Yarrowia*, несущие ген термофильной нуклеазы, представляют штамм *Yarrowia lipolytica* ML12921, а биологическое соединение, которое они продуцируют - это зеаксантин. В другом воплощении данного изобретения генетически модифицированные клетки *Yarrowia*, несущие ген термофильной нуклеазы, представляют штамм *Yarrowia lipolytica* ML12805, а биологическое соединение, которое они продуцируют - это ликопин.

В одном из воплощений данного изобретения проводили оптимизацию кодонного состава гетерологичного гена нуклеазы, чтобы усилить его экспрессию в клетках-хозяевах. В данной области техники известно, что экспрессия ненативных генов тормозится из-за разницы в их предпочтениях кодонов по сравнению с тем, которое свойственно организму-хозяину. Чтобы обойти это затруднение, по данному изобретению прежде, чем вводить ген термофильной нуклеазы в клетки-хозяева, проводят оптимизацию его кодонного состава, чтобы предпочтения кодонов соответствовали таковому организма-хозяина. Эта процедура включает замену редких кодонов в нуклеотидной последовательности гена нуклеазы таким образом, чтобы она максимально соответствовала предпочтениям кодонов, свойственным организму-хозяину, и в то же время чтобы аминокислотная последовательность белка-продукта оставалась на 100% или почти на 100% идентичной нативной аминокислотной последовательности. Процесс оптимизации кодонного состава нуклеотидной последовательности также дает возможность одновременной модификации ожидаемой вторичной структуры матричной РНК вследствие изменения содержания пар GC.

В генах термофильных нуклеаз, используемых по данному изобретению, изначальный кодонный состав оптимизируют так, что кодируемая данным геном аминокислотная последовательность не изменялась. Для многих термофильных нуклеаз нуклеотидные последовательности их генов известны. Если нуклеотидная последовательность гена нужной термофильной нуклеазы изначально не установлена, ее можно определить методами, известными рядовым специалистам в данной области техники, включая секвенирование РНК и ДНК (но не ограничиваясь им). По данному изобретению участки гена термофильной нуклеазы превращали в нуклеотидные последовательности, которые транслировались в те же аминокислотные последовательности, что и исходные участки, но с иными предпочтениями кодонов.

В одном из воплощений данного изобретения нуклеотидную последовательность, кодирующую нативную термофильную нуклеазу TaqI (SEQ ID NO: 2) оптимизируют по кодонному составу соответственно предпочтениям кодонов, свойственным *Y. lipolytica*. Полученный кодон-модифицированный ген taqI представлен последовательностью SEQ ID NO: 1. В одном из воплощений данного изобретения нуклеотидную последовательность, кодирующую нативную термофильную нуклеазу TaqI (SEQ ID NO: 2), оптимизируют по кодонному составу соответственно предпочтениям кодонов, свойственным *E.coli*. По-

лученный кодон-модифицированный ген *taqI* представлен последовательностью SEQ ID NO: 11. Аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностями SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 11, представлена последовательностью SEQ ID NO: 3.

В одном из воплощений данного изобретения нуклеотидную последовательность, кодирующую нативную термофильную нуклеазу *PhoI* (SEQ ID NO: 9), оптимизируют по кодонному составу соответственно предпочтениям кодонов, свойственным *Y. lipolytica*. Полученный кодон-модифицированный ген *phoI* представлен последовательностью SEQ ID NO: 8. Аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностями SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, представлена последовательностью SEQ ID NO: 10.

Кодон-модифицированные гены *taqI* и *phoI*, представленные последовательностями SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 8, служат лишь примерами из множества возможных кодон-модифицированных генов *taqI* и *phoI* или генов других термофильных нуклеаз. Опытному специалисту в данной области техники понятно, что для модификации генов термофильных нуклеаз по данному изобретению можно применять любой подходящий метод модификации кодонов и что нуклеотидные последовательности, получаемые разными методами модификации кодонов, могут различаться.

Дав общее описание данного изобретения, для лучшего его понимания мы приводим ниже конкретные примеры, которые включены в настоящий документ только в иллюстративных целях и не носят ограничительного характера, если не оговорено иного.

Данное изобретение иллюстрируют следующие примеры.

Примеры

В приведенной ниже табл. 1 охарактеризованы некоторые штаммы *Yarrowia lipolytica*, которые использовались в описанных здесь примерах.

Таблица 1. Штаммы *Yarrowia lipolytica*

Номер штамма	Генотип	Каким образом получен
ML8195	<i>MATA erg9-4789::ura3 HMG-tr GGS carB carRP(L78G) ura3 ade1</i>	Стандартные молекулярно-генетические методы
ML12805	ML8195 [pMB6722]	Не направленная трансформация
ML11956	<i>MATB erg9-4789::URA3HMG-tr GGS carB carRP crtW crtZ</i> (прототрофный)	Стандартные молекулярно-генетические методы
ML12924	ML11956 [pMB6736]	Не направленная трансформация
ML11218	<i>MATB erg9-4789:: URA3 HMG-tr GGS carB carRP crtW crtZ-Xa crtZ-Dc crtW-Δ6180</i>	Стандартные молекулярно-генетические методы
ML12921	ML11218 [pMB6736]	Не направленная трансформация
ML13270	ML11218 [pMB6868]	Не направленная трансформация

Штаммы *Yarrowia* ML8195, ML12805, ML11956, ML12924, ML12921 и ML13270 получены путем введения гетерологичных генов, находящихся под контролем конститутивных промоторов (например, TEF1), и перекрестного скрещивания на протяжении нескольких поколений, начиная с ML350 и ATCC201249, как описано в патенте США № 7851199 B2. Ген GGS и укороченный ген HMG ("HMG-tr") происходят из последовательностей *Yarrowia lipolytica*, соответствующих нативным генам геранилгеранил-пирофосфат-синтазы и гидроксиметилглутарил-коферментА-редуктазы соответственно. Гены *carRP* и *carB* происходят из *Mucor circinelloides*; они кодируют бифункциональный фермент фитоенсинтазу/ликопинциклазу и фитоендегидрогеназу соответственно. Ген *crtW* синтезированный; он кодирует каротинкетотлазу *Parvularcula bermudensis*. Ген *crtZ* амплифицирован из *Xanthobacter autotrophicus* (Xa) или синтезированный; он кодирует каротингидроксилазу *Enterobacteriaceae bacterium* DC404 (Dc) (SEQ ID NO: 7). Эти гены иногда (не всегда) ассоциированы с маркерами ауксотрофности (URA3, LEU2, URA2, LYS1, ADE1) или сайтом loxP - остатком маркера *HygR* (устойчивости к гигромицину).

Пример 1. Получение плазмид для конструирования штаммов *Yarrowia*.

Получали плазмиды для экспрессии термофильных нуклеаз *TaqI* в клетках *Yarrowia*, как описано в табл. 2. Кодон-оптимизированную открытую рамку считывания нуклеазы *taqI* синтезировали de novo на основании нуклеотидной последовательности гена *taqI* нуклеазы *Thermus aquaticus* (SEQ ID NO: 2), используя предпочтения кодонов *Y. lipolytica* согласно SEQ ID NO: 1. Кодон-оптимизированную открытую рамку считывания *taqI* нуклеазы расщепляли рестриктазами *NheI* и *MluI* и лигировали с pMB5082, расщепленной рестриктазами *NheI* и *MluI*, так что получалась pMB6722. Кодируемый полученной нуклеотидной последовательностью белок-продукт *TaqI* pMB6722 представлен последовательностью SEQ ID NO: 3.

Для плазмид второго типа ту же нуклеотидную последовательность гена *taqI* нуклеазы вырезали из плазмиды pMB6722 и клонировали в другой плазмиде, служившей основой - pMB6157; в результате получали новую плазмиду pMB6736.

Для экспрессии термofilной нуклеазы PhoI получали плазмиду, описанную в табл. 2. Синтезировали de novo кодон-оптимизированную открытую рамку считывания phoI нуклеазы на основании нуклеотидной последовательности гена phoI нуклеазы *Pyrococcus horikoshii* OT3 (SEQ ID NO: 9), используя предпочтения кодонов, свойственные *Y. lipolytica* (см. последовательность SEQ ID NO: 8). Эту кодон-оптимизированную открытую рамку считывания phoI нуклеазы расщепляли с помощью рестриктаз NheI и MluI и лигировали с pMB6771, расщепленной ферментами NheI и MluI, так что получалась плазида pMB6868. Кодированный полученной нуклеотидной последовательностью белок-продукт PhoI pMB6868 представлен последовательностью SEQ ID NO: 10.

Конструирование плазмид осуществлялось на базе основных молекулярно-биологических методов и методик манипуляций с ДНК. Все такие процедуры, описанные в данном и других примерах, осуществлялись в основном по работам Sambrook J, Fritsch E.F., Maniatis T. (eds). 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, и Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (eds). 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: New York).

Таблица 2. Плазмиды

Плазида	Структурная основа	Вставка	Олигонуклеотиды или источник
pMB6722	pMB5082 (URA3)	<i>taqI</i>	Синтезированный фрагмент (расщепление NheI-MluI)
pMB6736	pMB6157 (HygR)	<i>taqI</i>	Фрагмент pMB6722 (расщепление NheI-MluI)
pMB6868	pMB6771 (HygR)	<i>phoI</i>	Синтезированный фрагмент (расщепление NheI-MluI)

Пример 2. Демонстрация нуклеазной активности в клетках *Y. lipolytica*, в которых экспрессируется нуклеаза TaqI.

В данном примере ген, кодирующий нуклеазу TaqI, внедряли в клетки-хозяева *Y. lipolytica*. Определяли нуклеазную активность TaqI в клетках-хозяевах.

Плазмиду pMB6722 расщепляли с помощью рестриктазы XbaI и трансформировали ею клетки штамма ML8195 (см. табл. 1). Штамм *Yarrowia* ML8195 ранее генетически модифицирован для продуцирования ликопина. Трансформированные клетки, несущие введенный гетерологичный ген *taqI* нуклеазы, культивировали в чашках со средой YNB, содержащей гутамат и 0,12 мМ аденина; одну из полученных в результате такого отбора колоний обозначили как штамм *Yarrowia* ML12805. Клетки ML12805 инкубировали в 20 мл среды YPD в 125-миллилитровых колбах на качалке с частотой 250 об/мин в течение 3 суток при температуре 30°C. Полученные культуры пассировали и аликвоты по 1,5 мл инкубировали при температуре 65 либо 25°C в течение промежутка времени от 5 мин до 24 ч.

Выделяли клеточную ДНК штаммов ML8195 и ML12805, инкубировали при температуре 65 либо 25°C и анализировали. Для выделения ДНК использовали метод с разрушением клеток ("Smash and Grab") для геномной ДНК дрожжей. Для этого 1,5 мл 3-суточной культуры центрифугировали, супернатант отбрасывали, осадок клеток ресуспендировали в 0,5 мл воды. Клетки опять осаждали в течение 10 с и супернатант отбрасывали. Осадок клеток ресуспендировали в 0,2 мл раствора для разрушения (1% додецилсульфата натрия, 2% Triton-X100, 100 мМ NaCl, 10 мМ Tris с pH 8,0; 1 мМ этилендиаминтетраацетат) и 0,2 мл смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт и добавляли 0,3 г стеклянных шариков. Пробирки помещали на 5 мин в многорестную мешалку. Затем в них прибавляли по 0,2 мл смеси TE (10 мМ Tris, 1 мМ EDTA; pH 8,0) и центрифугировали в течение 5 мин. Из каждой пробирки водную фазу переносили в новую пробирку, прибавляли 1,0 мл холодного этилового спирта и перемешивали, чтобы ДНК выпала в осадок. Центрифугировали 5 мин, супернатант отбрасывали. Осадок ресуспендировали в 0,4 мл раствора TE, содержащего 75 мкг/мл РНКазы и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Прибавляли 10 мкл раствора ацетата аммония (4М) и 1,0 мл этилового спирта. Инкубировали на льду в течение 5 мин, затем центрифугировали 10 мин; супернатант отбрасывали. Осадок промывали 0,5 мл 70%-ного этилового спирта и центрифугировали в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, осадок высушивали на воздухе и ресуспендировали в 100 мкл раствора TE. Полученную ДНК анализировали путем электрофореза (100 В в течение 1,5 ч) в 0,8%-ном агарозном геле; буферный раствор для заполнения камер брали 1×TAE (Tris-ацетат-EDTA).

Как демонстрирует фиг. 1, в клетках-хозяевах штамма *Y. lipolytica*, не содержащих гена *taqI* нуклеазы (ML8195), не исчезала активность ДНК ни при 65°C, ни при 25°C. В клетках-хозяевах штамма *Y. lipolytica*, содержащих ген *taqI* нуклеазы (ML12805), активность ДНК исчезала при температуре 65°C, но не при 25°C. Исчезновение активности ДНК наблюдалось через 20 мин после того, как культуру клеток инкубировали при температуре 65°C. В случае штамма ML12805 активность ДНК при температуре 25°C не исчезала даже после инкубации в течение 24 ч, что указывало на латентное состояние нуклеазы TaqI у *Y. lipolytica* при температуре 25°C.

Пример 3. Зависимость активности TaqI от температуры.

В этом примере исследовали активность нуклеазы TaqI при различной температуре.

Выращивали клетки *Y. lipolytica* штаммов ML12805 и ML8195 в течение 3 суток, как описано в примере 2. Инкубировали аликвоты по 1,5 мл клеток ML12805 и ML8195 при температуре 25, 30, 40, 50 и 65°C в течение 1,5 ч и выделяли ДНК, как описано в примере 2.

Как показано на фиг. 2, при температуре 25, 30, 40 и 50°C разрушения ДНК не наблюдалось ни в случае штамма ML12805, ни в случае штамма ML8195. Разрушение ДНК наблюдалось только при температуре 65°C для клеток ML12805, как это было показано в примере 2. Эти результаты демонстрируют, что при температуре не выше 50°C нуклеаза TaqI находится в латентном состоянии.

Пример 4. Анализ геномной ДНК, расщепленной TaqI *in vivo*, путем полимеразной цепной реакции.

В этом примере исследовали разрушение гетерологичного гена *carB* в рекомбинантном штамме *Y. lipolytica*.

Гене *carB* длиной 1740 нуклеотидов кодирует фермент фитоендегидрогеназу, который участвует в биосинтезе каротиноидов. Ген *carB* ввели в клетки *Y. lipolytica*, чтобы придать им способность продуцировать каротиноиды. Как описано в примере 2, клетки штамма ML8195 продуцируют ликопин и не содержат никаких термофильных нуклеаз, а штамм ML12805 является производным от ML8195 и содержит ген *taqI* нуклеазы; оба штамма несут ген *carB*.

Присутствие гена *carB* в штаммах ML8195 и ML12805 исследовали при температуре 25 и 65°C. Получали серийные разведения геномной ДНК ML12805, инкубированного при температуре 25 либо 65°C в течение 24 ч. С указанными образцами осуществляли полимеразную цепную реакцию (ПЦР), используя праймеры, предназначенные для амплификации фрагмента длиной 529 нуклеотидных пар (н.п.) гена *carB*. Последовательность праймера MO4641 представлена SEQ ID NO: 5. Последовательность праймера MO4642 представлена SEQ ID NO: 6. Фрагмент ДНК гена *carB* между олигонуклеотидами MO4641 и MO4642 содержит два сайта расщепления нуклеазой TaqI.

Для ПЦР использовали амплификатор MJ PTC-225 Peltier Thermal Cycler в следующих условиях. Реакцию проводили в объеме 25 мкл; при этом брали 1 мкл разведенной геномной ДНК, по 0,5 мкл каждого праймера (исходный раствор 10 мкМ), 0,5 мкл воды и 22,5 мкл смеси для ПЦР Platinum Taq Super Mix. Параметры реакции: 1 цикл продолжительностью 2 мин при температуре 94°C, следующие 45 циклов 30 с при 94°C, 30 с при 58°C и 60 с при 72°C. Последний цикл: 5 мин при 72°C. Реакционную смесь вместе с красителем (1×) наносили на 2%-ный агарозный гель (буферный раствор 1×TAE), содержащий 0,5 мг/мл этидийбромида; электрофорез проводили при напряжении 100 В в течение 1,5 ч.

Как показано на фиг. 3, в случае штамма *Y. lipolytica*, несущего введенный ген *taqI* термофильной нуклеазы (ML12805), продукт ПЦР длиной 529 н.п. гена *carB* наблюдался в образце, который инкубировали при температуре 25°C, а в образце, который инкубировали при температуре 65°C, его не было (чтобы продемонстрировать чувствительность аналитического метода, делали серийные разведения взятой для ПЦР ДНК-матрицы, как это известно рядовым специалистам в данной области техники). Полученные результаты демонстрируют, что нуклеаза TaqI расщепляла рекомбинантную ДНК (ген *carB*) в клетках штамма ML12805 в случае инкубации при температуре 65°C. Фиг. 3 также показывает, что чужеродная ДНК в штамме ML12805 может быть мишенью для расщепления и что она разрушается полностью, так что фрагмент длиной приблизительно 500 нуклеотидов не выявляется.

Пример 5a. Продуцирование астаксантина штаммом *Y. lipolytica*, несущим ген *taqI* термофильной нуклеазы.

В данном примере исследовали продуцирование астаксантина штаммом *Y. lipolytica* до и после введения в эти клетки гена *taqI* термофильной нуклеазы.

В данном примере использовали штамм ML1956 *Y. lipolytica*, продуцирующий астаксантин. Был также создан другой штамм, ML12924, путем введения гена *taqI* нуклеазы (MB6736) в клетки штамма ML11956. Определяли количество астаксантина и его предшественников в клетках обоих штаммов. Измерения проводили в различные моменты времени в ходе периода клеточного роста и после инкубации клеток-хозяев при температуре 65°C.

Клетки штаммов ML11956 и ML12924 выращивали в ферментере методом периодического культивирования с подпиткой. В различные моменты времени в ходе ферментации отбирали образцы и определяли в них каротиноиды способами, описанными ранее в патенте США № 7851199 B2.

Как видно на фиг. 4, по мере клеточного роста штамма ML11956 количество астаксантина возрастает, и в конце концов его продуцирование достигает плато. Количество астаксантина не изменялось после инкубации клеток ML11956 при температуре 65°C. То же наблюдалось в случае штамма ML12924. Количество астаксантина, продуцируемое клетками ML12924, было таким же, как у клеток ML11956 на протяжении процесса ферментации и после инкубации при температуре 65°C. Не изменялось также количество предшественников астаксантина, продуцируемых клетками ML11956 и ML12924, до и после инкубации при температуре 65°C. Эти результаты свидетельствуют, что ни введение гена *taqI* нуклеазы, ни его активация не влияли на количество или чистоту астаксантина, продуцируемого *Y. lipolytica*.

Пример 5b. Продуцирование зеаксантина штаммом *Y. lipolytica*, несущим ген *taqI* термофильной нуклеазы.

В данном примере исследовали продуцирование зеаксантина штаммом *Y. lipolytica*, несущим ген *taqI* термофильной нуклеазы.

В данном примере клетки штамма ML11218 *Y. lipolytica*, продуцирующего зеаксантин, трансформировали геном *taqI* термофильной нуклеазы (MB6736). В клетках полученного штамма *Y. lipolytica* (ML12921) определяли количество продуцируемого зеаксантина и его предшественников. Измерения проводили в различные моменты времени в ходе периода клеточного роста и после инкубации клеток-хозяев при температуре 65°C.

Клетки штамма ML12921 выращивали в ферментере методом периодического культивирования с подпиткой. В различные моменты времени в ходе ферментации отбирали образцы и определяли в них каротиноиды способами, описанными ранее в патенте США № 7851199 B2.

Фиг. 5 показывает, что по мере клеточного роста штамма ML12921 количество зеаксантина возрастает, и в конце концов его продуцирование достигает плато. Количество продуцируемого зеаксантина не изменялось после инкубации клеток-хозяев при температуре 65°C. Не изменялось также количество предшественников зеаксантина после инкубации клеток-хозяев при температуре 65°C. В случае контрольного штамма ML11218 (не показано) продуцирование зеаксантина было таким же, как у штамма ML12921, во всех проверенных на этот счет условиях. Эти результаты свидетельствуют, что ни присутствие нуклеазы *TaqI*, ни ее активация не влияли на количество или чистоту зеаксантина, продуцируемого *Y. lipolytica*.

Пример 5с. Активность нуклеазы *TaqI* в штаммах *Y. lipolytica*, продуцирующих астаксантин или зеаксантин.

В данном примере исследовали активность нуклеазы *TaqI* в штаммах *Y. lipolytica* ML11956, ML12924 и ML12921, описанных в примерах 5а и 5b.

Клетки штаммов ML11956, ML12924 и ML12921 выращивали в ферментерах. В случае штаммов ML11956 и ML12924 (продуцирующих астаксантин при более продолжительной ферментации) образцы клеток брали через 46, 121 и 236 ч после инокуляции. В случае штамма ML12921 (продуцирующего зеаксантин при менее продолжительной ферментации), образцы клеток брали через 46 и 69 ч после инокуляции. В конце процесса ферментации (236 ч в случае штаммов, продуцирующих астаксантин, и 69 ч в случае штаммов, продуцирующих зеаксантин) температуру повышали до 65°C и клетки инкубировали при этой температуре в течение 6 ч. В моменты времени 0 мин, 10 мин, 30 мин, 2 ч и 6 ч после повышения температуры отбирали образцы. Выделяли и анализировали ДНК, как описано в примере 2.

Как показывает фиг. 6, в случае штамма ML11956, не имеющего нуклеазы, разрушения ДНК не наблюдалось. В случае штаммов ML12924 и ML12921 разрушение ДНК наблюдалось после того, как клетки инкубировали при температуре 65°C. Эти результаты демонстрируют, что в клетках *Y. lipolytica* нуклеаза *TaqI* находилась в латентном состоянии при той температуре, при которой происходила ферментация, но активна при температуре 65°C, так что разрушение ДНК не влияет на количество и чистоту желаемого конечного продукта (астаксантина или зеаксантина).

Пример 6. Температурный диапазон для ферментов *TaqI* и *PhoI*, включающий значение, оптимальное для нуклеазной активности.

В данном примере исследовали активность нуклеаз *TaqI* и *PhoI* при оптимальной для каждого из этих ферментов температуре и около нее.

Как показывает фиг. 7, в случае штамма *Y. lipolytica*, несущего ген *taqI* нуклеазы (ML12921), нуклеазная активность (расщепление ДНК) наблюдалась при температуре 65°C, но отсутствовала при 25°C. Нуклеазная активность (расщепление ДНК) у штамма ML12921 имела также при 60 и при 70°C, т.е. в пределах отклонения $\pm 5^\circ\text{C}$ от оптимальной для нуклеазы *TaqI* температуры 65°C. Аналогично в случае штамма *Y. lipolytica*, несущего ген нуклеазы *PhoI* (ML13270), нуклеазная активность (расщепление ДНК) наблюдалась при температуре 75°C, но отсутствовала при 25°C. Нуклеазная активность (расщепление ДНК) у штамма ML13270 имела также при 70 и при 80°C, т.е. в пределах отклонения $\pm 5^\circ\text{C}$ от оптимальной для нуклеазы *PhoI* температуры 75°C. Эти результаты демонстрируют, что в клетках-хозяевах *Y. lipolytica*, трансформированных экзогенным геном нуклеазы, можно разрушить клеточную геномную ДНК в диапазоне температур размахом по меньшей мере 10°, включающем в середине оптимальную для данной нуклеазы температуру. Такие результаты наблюдались для двух разных нуклеаз, оптимальные температуры у которых различались.

Пример 7. Получение плазмид для экспрессии в бактериальных клетках.

Получали плазмиды для экспрессии термофильной нуклеазы *TaqI* в клетках *E.coli*, представленные в табл. 3. Синтезировали de novo кодон-оптимизированную открытую рамку считывания гена *taqI* термофильной нуклеазы на основании нуклеотидной последовательности гена *taqI* термофильной нуклеазы из *Thermus aquaticus* (SEQ ID NO: 2), используя предпочтения кодонов, свойственные *E.coli* (см. последовательность SEQ ID NO: 11). Эту кодон-оптимизированную открытую рамку считывания гена *taqI* термофильной нуклеазы расщепляли с помощью рестриктаз *NcoI* и *Acc65I* и лигировали с плазмидой pMB4124 (*Kan^RoriP15*), расщепленной ферментами *NcoI* и *Acc65I*; в результате получали плазмиду pMB7268 (*trcP-taqI*). Белок-продукт *TaqI*, кодируемый pMB7268, представлен последовательностью SEQ ID NO: 3.

Для экспрессии термофильной нуклеазы *TaqI* в клетках *Corynebacterium glutamicum* путем ПЦР с

олигонуклеотидами MO9315 и MO9316, используя pMB6736 в качестве матрицы, получали фрагмент, который расщепляли NcoI и KpnI и лигировали с pMB4124, расщепленной NcoI и Acc65I; в результате получали pMB7263 (trcP-taqI). Белок-продукт TaqI, кодируемый pMB7263, представлен последовательностью SEQ ID NO: 3. Последовательность праймера MO9315 представлена SEQ ID NO: 12. Последовательность праймера MO9316 представлена SEQ ID NO: 13.

Таблица 3. Плазмиды

Плазида	Основа	Вставка	Олигонуклеотиды или источник
pMB4124	KanR <i>oriP15</i> <i>lacIq trcP</i>	<i>lacZ</i>	Синтезирована ранее
pMB7268	pMB4124	<i>taqI</i>	Синтезирован фрагмент NcoI-Acc65I
pMB7263	pMB4124	<i>taqI</i>	ПЦР-амплификация: олигонуклеотиды MO9315 и MO9316, матрица pMB6736

Пример 8. Нуклеазная активность клеток E.coli, в которых экспрессируется фермент TaqI.

В этом примере в клетки E.coli вводили ген, кодирующий нуклеазу TaqI. Определяли активность нуклеазы TaqI в клетках-хозяевах.

Клетки E.coli штамма DH5α (F-Φ80lacZAM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ-thi-1 gytA96 relA1), несущие плазмиду pMB4124 (trcP-lacZ) либо pMB7268 (trcP-taqI), культивировали до экспоненциальной фазы роста при температуре 30°C, затем повышали температуру до 37°C на 1 ч и воздействовали индуктором экспрессии генов изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG, 500 мкМ) в течение 2,5 ч. Затем клетки инкубировали при температуре 25°C в течение 4 и 18 ч или при температуре 65°C в течение 1,5; 4 и 18 ч. Из культуры с поглощением A600 ~1 выделяли тотальную ДНК с помощью набора Qiagen Blood and Tissue DNeasy Kit согласно рекомендациям производителя за тем исключением, что температуру инкубации для обработки протеиназой K изменили на 22°C. Как видно на фиг. 8, в клетках, несущих генетическую конструкцию trcP-taqI, происходило значительное разрушение ДНК при температуре 65°C, а при 25°C такого не наблюдалось. В контрольных клетках, не содержащих trcP-taqI, разрушения ДНК не было ни при какой температуре.

Пример 9. Нуклеазная активность клеток C.glutamicum, в которых экспрессируется фермент TaqI.

В этом примере в клетки C.glutamicum вводили ген, кодирующий нуклеазу TaqI. Определяли активность нуклеазы TaqI в клетках-хозяевах.

Получали штамм C.glutamicum MA428 путем замены нативного оперона hom(thrA)-thrB в штамме ATCC 13032 на аллель устойчивости по типу обратной связи (G362E) гена hom Streptomyces coelicolor под контролем промотора GPD C.glutamicum (см. заявку на патент США № 10/858730, в настоящее время оставленную без движения). Полученный штамм трансформировали плазмидой pMB7263 (trcP-taqI), и колонии клеток, устойчивых к канамицину (KanR) выращивали при температуре 30°C в среде ВНИ, в которую добавляли канамицин (20 мкг/мл), и воздействовали IPTG (250 мкМ) в течение ночи с. Затем клетки инкубировали при температуре 25, 60, 65 или 70°C и выделяли ДНК с помощью набора Qiagen Blood and Tissue DNeasy Kit согласно рекомендациям производителя для грамположительных бактерий за тем исключением, что температуру инкубации для обработки протеиназой K изменили на 22°C. Клетки, несущие конструкцию trcP-taqI, инкубировали при температуре 25°C в течение 5 ч и при 65°C в течение 0,5; 1; 2,5 и 5 ч. Как можно видеть на фиг. 9, в клетках, содержащих конструкцию trcP-taqI, происходило значительное разрушение ДНК при температуре 65°C, а при 25°C этого не наблюдалось. Фиг. 10 иллюстрирует зависимость этой активности от температуры (продолжительность инкубации во всех случаях 5 ч). Геномная ДНК клеток-хозяев C.glutamicum разрушалась в диапазоне температур размахом по меньшей мере 10° с серединой около значения 65°C, оптимального для нуклеазы TaqI.

Все описанные в настоящем документе различные варианты, воплощения и альтернативные возможности данного изобретения можно комбинировать в любых сочетаниях.

Все публикации, патенты и патентные заявки, упоминаемые в настоящем описании, включаются в него путем отсылки точно так же, как если бы для каждой публикации, патента или патентной заявки было особо конкретно указано ее/его включение в настоящий документ путем отсылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ разрушения *in vivo* и/или *in situ* нуклеиновых кислот клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере один гетерологичный ген термофильной нуклеазы, согласно которому:

а) выращивают клетку-хозяина при температуре, при которой термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии; и

б) изменяют температуру для активации термофильной нуклеазы, в результате чего происходит разрушение нуклеиновых кислот клетки-хозяина.

2. Способ по п.1, в котором нуклеаза является нуклеазой, расщепляющей ДНК, и нуклеиновые кислоты являются дезоксирибонуклеиновыми кислотами.

3. Способ по п.2, в котором ДНК клетки-хозяина содержит рекомбинантную ДНК.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором температура на стадии (а) является оптимальной для роста клетки-хозяина.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором разрушение нуклеиновых кислот проводят при температуре в пределах отклонения $\pm 5^{\circ}\text{C}$ от значения, оптимального для указанной термофильной нуклеазы.

6. Способ по п.1, в котором разрушение нуклеиновых кислот проводят в процессе пастеризации клеток-хозяев.

7. Способ по п.1, в котором разрушение нуклеиновых кислот проводят при температуре в диапазоне от 40 до 100°C .

8. Способ по п.2, в котором нуклеаза, расщепляющая ДНК, является нуклеазой TaqI и разрушение нуклеиновых кислот проводят при температуре в диапазоне от около 60 до около 70°C .

9. Способ по п.2, в котором нуклеаза, расщепляющая ДНК, является нуклеазой PhoI и разрушение нуклеиновых кислот проводят при температуре 75°C или при температуре в диапазоне от около 70 до около 80°C .

10. Способ по любому из пп.1-9, в котором клетка-хозяин является растительной, животной или клеткой микроорганизма.

11. Способ по п.10, в котором микроорганизм выбирают из дрожжей, грибов, водорослей, бактерий и архей, например, родов *Yarrowia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Corynebacterium*, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Mortierella*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cryptocodium*, *Schizochytrium* и *Thraustochytrium*, в частности вида *Yarrowia lipolytica*.

12. Способ по п.1, в котором клетка-хозяин содержит несколько генов термофильных нуклеаз.

13. Способ по п.3, в котором указанная рекомбинантная ДНК оптимизирована таким образом, что включает дополнительные сайты расщепления термофильной нуклеазой, в частности включает один сайт расщепления нуклеазой на каждые 500 или менее нуклеотидов.

14. Генетически модифицированная клетка, которая продуцирует один или более конечных продуктов, не являющихся термофильной нуклеазой, и которая содержит по меньшей мере один гетерологичный ген термофильной нуклеазы, причем кодируемая данным геном термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии при температуре, при которой происходит нормальный рост указанной генетически модифицированной клетки.

15. Клетка по п.14, в которой указанная нуклеаза является нуклеазой, расщепляющей ДНК, например нуклеазой TaqI или нуклеазой PhoI.

16. Клетка по п.14 или 15, которая является растительной, животной или клеткой микроорганизма.

17. Клетка по п.16, в которой микроорганизм выбирают из дрожжей, грибов, водорослей, бактерий и архей, например, родов *Yarrowia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Corynebacterium*, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Mortierella*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cryptocodium*, *Schizochytrium* и *Thraustochytrium*, в частности вида *Yarrowia lipolytica*.

18. Клетка по п.17, в которой указанный конечный продукт выбирают из фитоена, ликопина, бета-каротина, альфа-каротина, бета-криптоксантина, лютеина, зеаксантина, астаксантина, кантаксантина, эхинонена, 3-гидроксиэхинонена, 3'-гидроксиэхинонена, адонирубина, виолаксантина, адониксантина, убихинона, витамина К, витамина Е, ретинола, ретиналя, ретиноевой кислоты, ретинилпальмитата и их модифицированных форм.

19. Клетка по п.14, которая содержит несколько генов термофильной нуклеазы.

20. Применение термофильной нуклеазы для разрушения нуклеиновых кислот клетки-хозяина *in vivo* и/или *in situ*, причем термофильная нуклеаза является гетерологичной для клетки-хозяина.

21. Применение по п.20, в котором нуклеаза является нуклеазой, расщепляющей ДНК, и нуклеиновые кислоты являются дезоксирибонуклеиновыми кислотами, в частности рекомбинантными ДНК.

22. Способ получения продукта биомассы, не содержащего активных молекул нуклеиновых кислот и являющегося продуктом клетки-хозяина, которая содержит гетерологичный ген термофильной нуклеазы, согласно которому:

а) выращивают клетку-хозяина при температуре, при которой термофильная нуклеаза находится в латентном состоянии;

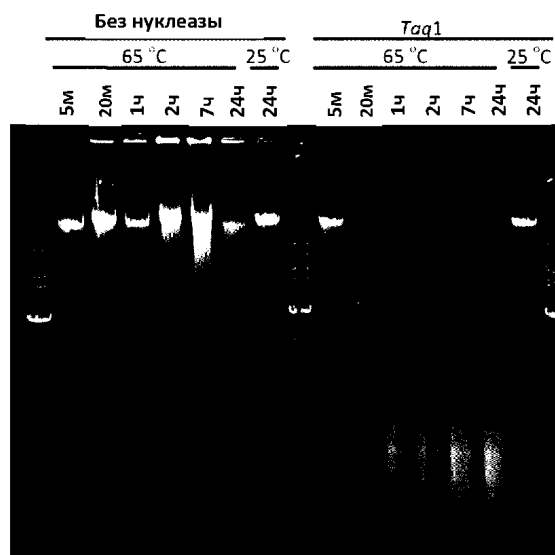
б) изменяют температуру для активации термофильной нуклеазы, в результате чего происходит разрушение нуклеиновых кислот клетки-хозяина; и

с) выделяют продукт биомассы.

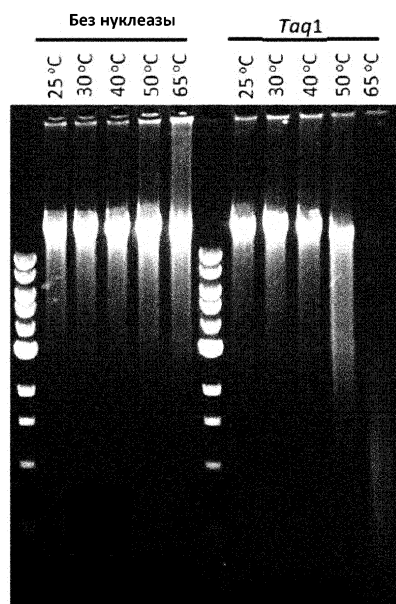
23. Способ по п.22, в котором нуклеаза является нуклеазой, расщепляющей ДНК, и нуклеиновые кислоты являются дезоксирибонуклеиновыми кислотами, в частности рекомбинантными ДНК.

24. Способ по п.22 или 23, в котором температура на стадии (а) является оптимальной для роста клетки-хозяина.

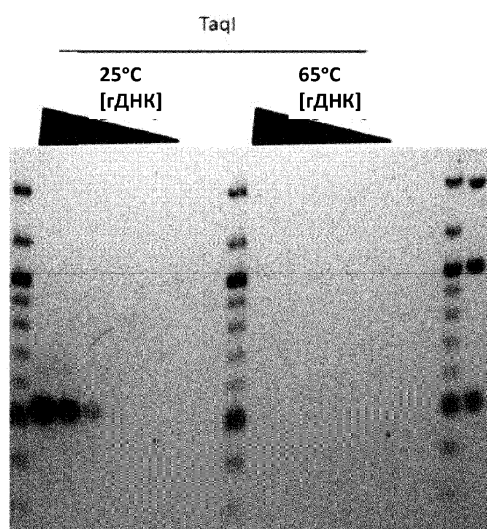
25. Способ по любому из пп.22-24, в котором разрушение нуклеиновых кислот проводят при температуре в пределах отклонения $\pm 5^{\circ}\text{C}$ от значения, оптимального для указанной термофильной нуклеазы.



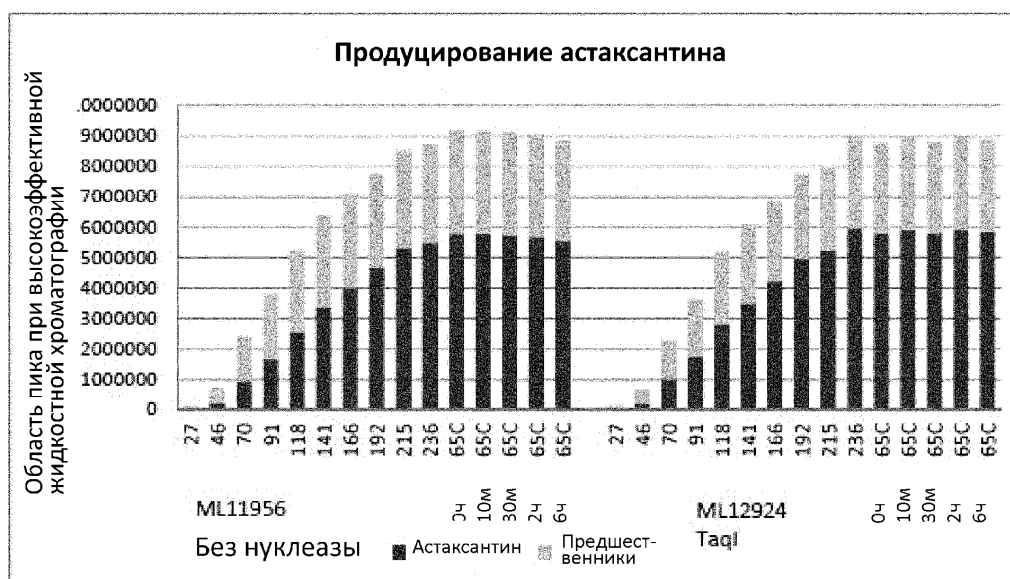
Фиг. 1



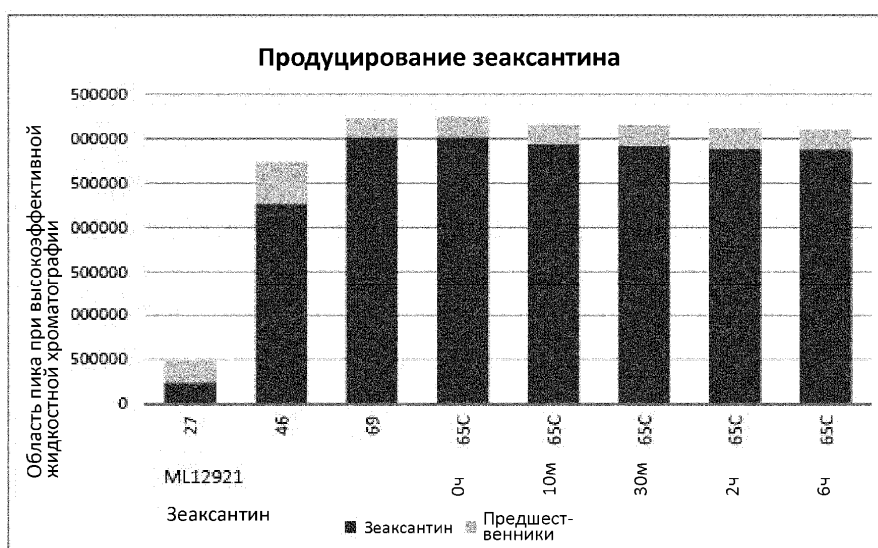
Фиг. 2



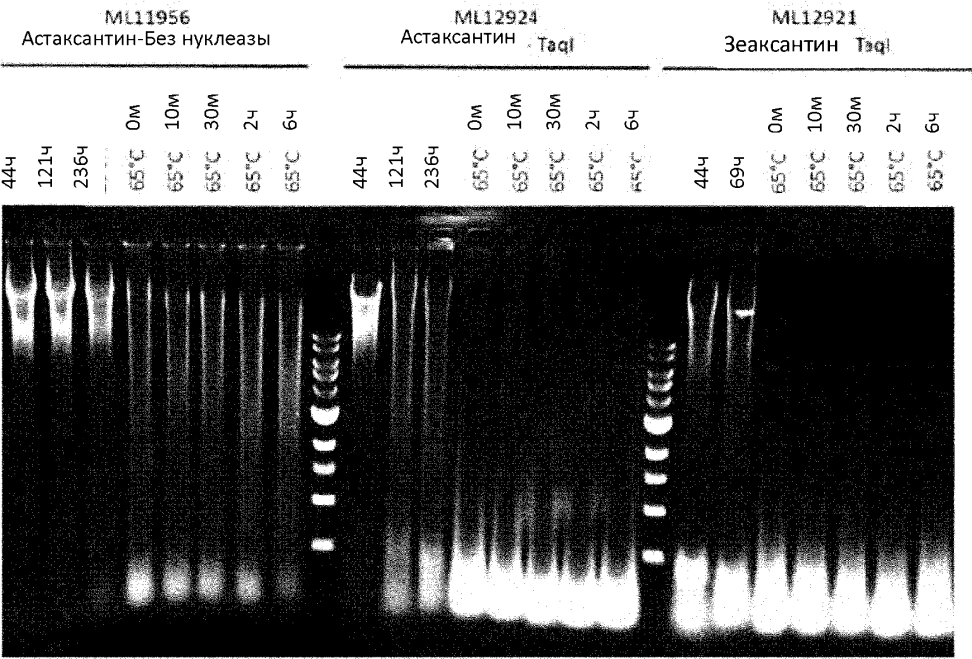
Фиг. 3



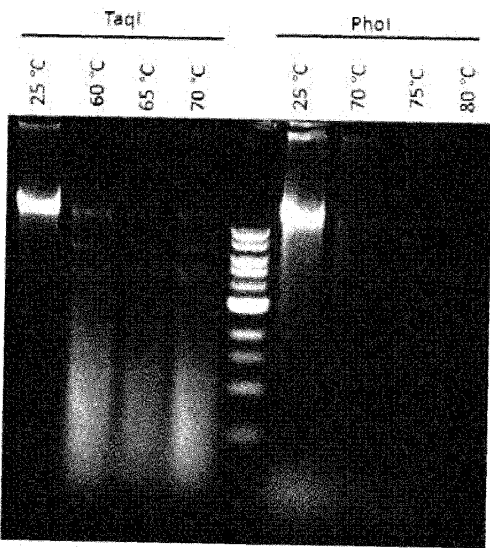
Фиг. 4



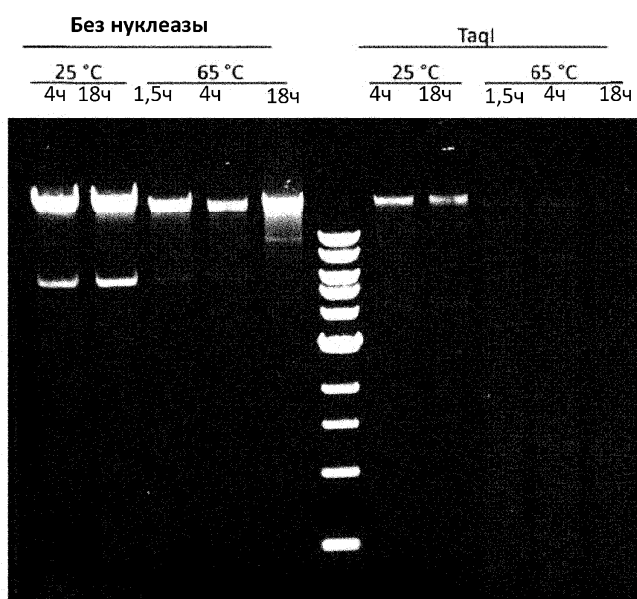
Фиг. 5



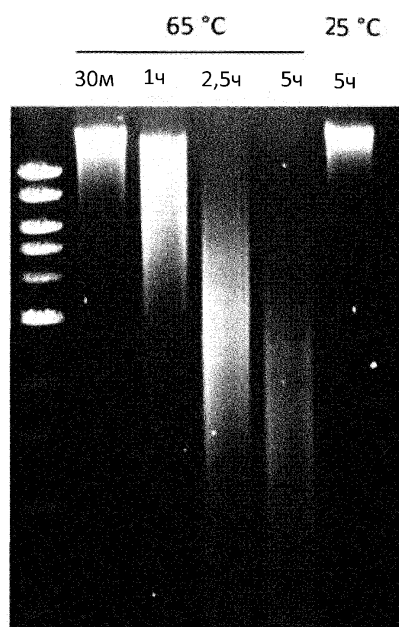
Фиг. 6



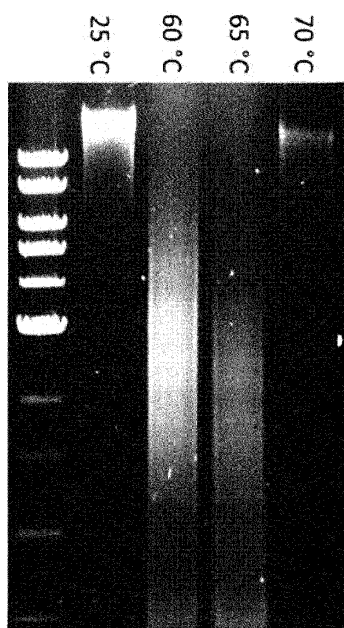
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

