

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037088**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.04

(51) Int. Cl. **C12N 9/02** (2006.01)

(21) Номер заявки
201691208

(22) Дата подачи заявки
2014.12.12

(54) ФУМАРАТРЕДУКТАЗЫ

(31) **13196950.3**

(32) **2013.12.12**

(33) **EP**

(43) **2016.12.30**

(86) **PCT/EP2014/077638**

(87) **WO 2015/086839 2015.06.18**

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

(72) Изобретатель:
**Йонг Де Рене Марсель, Чжао Чжэн,
Дюлк Ден Бен, Винтер Ремко Тшиббе
(NL)**

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

(56) **WO-A1-2009065778**

COUSTOU V. ET AL.: "A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic Trypanosoma brucei", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 280, no. 17, 29 April 2005 (2005-04-29), pages 16559-16570, XP002477924, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M500343200 [retrieved on 2005-02-17], page 16562; figure 2

BESTEIRO S. ET AL.: "Succinate secreted by Trypanosoma brucei is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 277, no. 41, 11 October 2002 (2002-10-11), pages 38001-38012, XP002477925, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M201759200 [retrieved on 2002-07-22], page 38003; figure 2

(57) Изобретение относится к вариантному полипептиду, имеющему активность фумаратредуктазы, которая имеет модифицированную NADP(H)-зависимую и/или NAD(H)-зависимую активность по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность фумаратредуктазы. Такой вариант может быть сверхэкспрессирован в клетке-хозяине для улучшения выработки дикарбоновой кислоты.

B1

037088

037088

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к вариантному полипептиду, имеющему активность фумаратредуктазы. Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, включающей последовательность, кодирующую такой вариантный полипептид, к нуклеотидной конструкции, включающей такую нуклеиновую кислоту, к рекомбинантному экспрессирующему вектору, включающему такую нуклеиновую кислоту или такую нуклеотидную конструкцию, и к рекомбинантной клетке-хозяину, включающей такую нуклеиновую кислоту, нуклеотидную конструкцию или экспрессирующий вектор. Изобретение дополнительно относится к способу получения вариантного полипептида, имеющего активность фумаратредуктазы и к способу получения дикарбоновой кислоты.

Предшествующий уровень техники

Янтарная кислота является потенциальным предшественником множества химических соединений. Например, янтарная кислота может быть преобразована в 1,4-бутандиол (BDO), тетрагидрофуран и гамма-бутиролактон. Другой продукт, полученный из янтарной кислоты, представляет собой полиэфирный полимер, который получают путем соединения янтарной кислоты и BDO.

Янтарную кислоту главным образом получают нефтехимическими способами путем гидрогенизации бутана. Эти способы считаются вредными для окружающей среды и затратными. Ферментативная выработка янтарной кислоты может быть привлекательным альтернативным способом получения янтарной кислоты, при котором в качестве источника углерода может быть использовано возобновляемое сырье.

Множество различных бактерий, таких как *Escherichia coli*, и бактерий рубца *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Bacteroides*, *Mannheimia*, или *Succinimonas*, sp. известны в качестве продуцентов янтарной кислоты. Метаболическая инженерия этих бактериальных штаммов улучшает выход и/или продуктивность янтарной кислоты, или снижает образование побочных продуктов.

В WO 2007/061590 описаны отрицательные по пируватдекарбоксилазе дрожжи для выработки яблочной кислоты и/или янтарной кислоты, которые трансформированы ферментом пируваткарбоксилазы или фосфоенолпируваткарбоксилазы, ферментом малатдегидрогеназой и белком-транспортером яблочной кислоты (MAE).

Несмотря на улучшения, которые были сделаны в отношении ферментативной выработки янтарной кислоты, сохраняется потребность в улучшенных микроорганизмах для ферментативной выработки янтарной кислоты.

В WO 2009/065778 раскрывается, что повышенные уровни выработки янтарной кислоты могут быть достигнуты с помощью рекомбинантной эукариотической клетки, выбранной из группы, состоящей из дрожжей и мицелиальных грибов, включающих нуклеотидную последовательность, кодирующую NAD(H)-зависимую фумаратредуктазу, которая катализирует преобразование фумаровой кислоты в янтарную кислоту. Было установлено, что рекомбинантная эукариотическая клетка продуцирует увеличенное количество янтарной кислоты по сравнению с количеством янтарной кислоты, продуцируемой эукариотической клеткой, не несущей нуклеотидную последовательность, кодирующую NAD(H)-зависимую фумаратредуктазу.

Тем не менее, было бы желательно достичь еще более высоких уровней выработки янтарной кислоты ферментативным способом.

Сущность изобретения

Изобретение относится к вариантным полипептидам, обладающим активностью фумаратредуктазы (FRD), т.е. вариантам фумаратредуктазы. Вариант фумаратредуктазы по изобретению может иметь одно или несколько модифицированных, например, улучшенных свойств в сравнении с эталонным полипептидом, эталонный полипептид как правило имеющий активность фумаратредуктазы, в частности относительно NADP(H)-и/или NAD(H)-зависимой активности. Соотношение NADP(H):NAD(H)-зависимой активности может быть модифицировано в сравнении с эталонным полипептидом.

Эталонный полипептид может быть фумаратредуктазой дикого типа, такой как фумаратредуктаза из протозойного источника, такого как *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis*, или *Leishmania Mexicana*. Эталонный полипептид может быть фумаратредуктазой (NADH)EC1.3.1.6.

Вариантные полипептиды по изобретению могут называться "вариант фумаратредуктазы (FRD)", "улучшенной фумаратредуктазой (FRD)" и т.п.

Согласно изобретению, предлагается вариантный полипептид, имеющий активность фумаратредуктазы, который имеет модифицированную NADP(H)-зависимую активность и/или модифицированную NAD(H)-зависимую активность по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность фумаратредуктазы. Такой вариантный полипептид способен катализировать преобразование фумаровой кислоты в янтарную кислоту.

Вариантный полипептид может быть экспрессирован в клетке-хозяине так, что она катализирует преобразование фумаровой кислоты в янтарную кислоту. Такая клетка-хозяин продуцирует повышенное количество дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота, по сравнению с количеством янтарной кислоты, продуцируемой клеткой, экспрессирующей эталонный полипептид.

Вариантный полипептид, обладающий активностью фумаратредуктазы, который имеет аминокис-

лотную последовательность, которая, при выравнивании с фумаратредуктазой, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 1042, 1071, 1072, 1082 или 1083, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 33 и где вариант имеет одно или несколько измененных свойств по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность фумаратредуктазы.

В изобретении также предлагаются

нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующий вариантный полипептид по любому из предшествующих пунктов.

нуклеотидная конструкция, включающая нуклеиновую кислоту по изобретению, функционально связанную с одной или несколькими контрольными последовательностями, способными направлять экспрессию фумаратредуктазы в подходящем хозяине для экспрессии;

экспрессирующий вектор, включающий нуклеиновую кислоту или конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению;

клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, нуклеотидную конструкцию или экспрессирующий вектор изобретения;

способ получения фумаратредуктазы, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях, подходящих для выработки фумаратредуктазы и, необязательно, извлечения фумаратредуктазы;

способ получения дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота, который включает ферментирование клетки-хозяина по изобретению в условиях, подходящих для выработки дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота, и необязательно, извлечение дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлено схематическое отображение интеграции фрагментов 1-8. Полосатые участки в фрагментах 1-8 обозначают уникальные гомологичные перекрывающиеся участки, приводящие к рекомбинантным событиям, на что указывают пунктирные кресты между гомологичными регионами. Фрагмент 1 и фрагмент 8 гомологичны локусу INT59 на хромосоме XI, гомологичная рекомбинация приводит к интеграции фрагмента 1-8 в локус INT59.

На фиг. 2 представлено схематическое отображение интеграции фрагментов 9-12. Полосатые участки во фрагментах 9-12 обозначают уникальные гомологичные перекрывающиеся участки, приводящие к рекомбинантным событиям, на что указывают пунктирные кресты между гомологичными регионами. Фрагмент 9 и фрагмент 12 гомологичны локусу INT1 на хромосоме XV, гомологичная рекомбинация приводит к интеграции фрагмента 9-12 в локус INT1. Фрагмент 11 может быть заменен фрагментом 13-22, который содержит такие же гомологичные участки, что и фрагмент 11.

На фиг. 3 показана активность NADH- и NADPH-зависимой фумаратредуктазы FCC-вариантов. Показанное является крутизной изменения в поглощении при 340 нм мин⁻¹, которая является мерой активности фумаратредуктазы. Равные количества растворимых экстрактов использовали для тестирования NADH- и NADPH-зависимой активности каждого варианта, для того, чтобы можно было определить эффект мутации на специфичность к кофактору у каждого варианта. Ясно, что FCC-варианты, которые содержат благоприятные мутации для увеличения выработки янтарной кислоты (варианты в графике ниже) все демонстрируют значимо измененную специфичность к кофакторам, при сравнении с эталоном (белок дикого типа минус C-концевой SKI). Во всех случаях NADH-зависимой активности FRD значимо снижена по сравнению с эталоном, в большинстве случаев более чем в три раза. Неожиданно оказалось, что для большого количества FCC-вариантов NADPH-специфичность повышена на 50-100% по сравнению с эталоном, что указывает на то, что мы получили варианты фумаратредуктазы, которая демонстрирует значимую зависимость от NADPH помимо NADH (для справки нет никакой существенной NADPH-зависимой активности по сравнению с NADH-активностью). Пунктирная линия представляет фоновую NADPH-активность эталонного FRDg. Фиг. 3a - полная фигура. Фиг. 3b - такой же график, что и в 3a, но с увеличенной нижней областью оси y. Метка соответствует значению эталонной активности.

На фиг. 4 представлено схематическое отображение интеграции фрагментов 10, 11, 23 и 24. Полосатые части во фрагментах 10, 11, 23 и 24 обозначают уникальные гомологичные перекрывающиеся участки, приводящие к рекомбинантным событиям, на что указывают пунктирные кресты между гомологичными регионами. Фрагмент 11 может быть заменен на фрагмент 13, 16, 17, 19, 21 или 22. Фрагмент 23 и фрагмент 24 являются гомологичными к выше и ниже лежащим областям локуса INT12 на хромосоме II, 743 п.о. выше ATG из YOR071 с ORF и 618 п.о. ниже ATG из YBL029C-A. Гомологичная рекомбинация приводит к интеграции фрагментов 10, 11 (или 13, 16, 17, 19, 21 или 22), 23 и 24 в локус INT12.

На фиг. 5 показана NADH- и NADPH-зависимая активность фумаратредуктазы (FRD) FCC-вариантов, экспрессированных в штамме SUC-723. Показанное является нормализованной активностью, определенной как изменение поглощения при 340 нм (мин⁻¹), разделенное на концентрацию общего белка (мг мл⁻¹) растворимого клеточного экстракта, который является мерой для активности фумаратредуктазы. Равные количества растворимых экстрактов использовали для тестирования NADH- и NADPH-зависимой активности каждого варианта, для того, чтобы можно было определить эффект мутации на

специфичность к кофактору каждого варианта. Ясно, что FCC-варианты, которые содержат благоприятные мутации для увеличения выработки янтарной кислоты (варианты в графике ниже) все демонстрируют значимо измененную специфичность к кофакторам при сравнении с эталоном (белок FRD дикого типа минус C-концевой SKI). Это доказывается тем фактом, что во всех случаях NADH-зависимая активность FRD значимо снизилась по сравнению с эталоном, при этом снижение составляет от семи до шестнадцати раз. Для варианта FCC-034 NADPH-специфичность понижена по сравнению с эталоном, что указывает на то, что мы получили вариант фумаратредуктазы в штамме SUC-723, который демонстрирует значимую NADPH-зависимость помимо акцептирования NADH. FCC_040 имеет полностью переключенную кофакторную специфичность, предпочитая NADPH относительно NADH, что доказано более высокой активностью NADPH по сравнению с его активностью с NADH. Удивительно, но изменение специфичности фумаратредуктазы к кофактору NAD(P)H (фиг. 5) оказывает благоприятный эффект на выработку янтарной кислоты штамма SUC-723 (табл. 4). Фиг. 5a - полная фигура. Фиг. 5b - такой же график, что и в 5a, но с увеличенной нижней областью оси y. Метка соответствует значению эталонной активности FRD. Активность контроля SUC-723 (отсутствие FRD) соответствует фоновой активности в экстрактах. Все значения являются средними измерений в трех повторях.

На фиг. 6 представлено схематическое отображение интеграции фрагментов 25-28. Полосатые части во фрагментах 25-28 обозначают уникальные гомологичные перекрывающиеся участки, приводящие к рекомбинантным событиям, на что указывают пунктирные кресты между гомологичными регионами. Фрагмент 27 может быть заменен на фрагмент 29-58 по отдельности. Фрагмент 25 и фрагмент 28 являются гомологичными к выше и ниже лежащим областям локуса INT09.01 на хромосоме IX, 359 п.о. ниже YIL009W ORF. Гомологичная рекомбинация приводит к интеграции фрагмента 26 и 27 или 29-58 по отдельности, 23 и 24 в локус INT09.01.

На фиг. 7 представлена активность NADH и NADPH зависимой фумаратредуктазы FCC-вариантов, экспрессированных в штамме CEN.PK113-7D. Показанное является нормализованной активностью, определенную как изменение поглощение при 340 нм (мин^{-1}), разделенное на концентрацию общего белка (мг мл^{-1}) растворимого клеточного экстракта, который является мерой для активности фумаратредуктазы. Равные количества растворимых экстрактов использовали для тестирования NADH- и NADPH-зависимой активности каждого варианта, для того, чтобы можно было определить эффект мутации на специфичность к кофактору каждого варианта. Ясно, что все демонстрируют значимое измененную специфичность к кофакторам, при сравнении с эталоном (белок FRD дикого типа минус C-концевой SKI). Это доказывается тем фактом, что во всех случаях NADH-зависимая FRD-активность значимо снизилась по сравнению с эталоном, снижение составляет от четырех до пяти раз. Неожиданно оказалось, для нескольких вариантов специфичность кофакторов была полностью переключена с NADH на NADPH, а именно FCC_097, 098, 105, 106, 107, 108 & 109. Эти варианты предпочитают NADPH относительно NADH в качестве кофактора для реакции фумаратредуктазы; увеличение в NADPH-специфичной нормализованной активности составляет вплоть до ~11 раз выше, чем у эталона. Неожиданно оказалось, что положением, который, по-видимому, ответственен за эту полный переход NADH-специфичности в NADPH-специфичность, является остаток 1083. Мутация этого остатка, в комбинации с другими остатками, из громоздкого ароматического остатка в более мелкий гидрофобный остаток (например, изолейцин или аланин) приводит к тому, что специфичность к кофактору переключается полностью. Пунктирная линия обозначает эталон (фон) NADPH-специфичной активности FRD.

Описание перечня последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой нуклеотидную последовательность фрагмента 2 (фиг. 1), который включает PEP-карбоксикиназу из *Actinobacillus succinogenes* с оптимизированными кодоновыми парами для экспрессии в *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 2 представляет собой нуклеотидную последовательность фрагмента 3 (фиг. 1), которая включает пируваткарбоксилазу (PYC2) с *S. cerevisiae* - оптимизированными кодоновыми парами, для экспрессии в *S. cerevisiae*.

SEQ ID NO: 3 представляет собой нуклеотидную последовательность фрагмента 4 (фиг. 1), которая включает селективный маркер KanMX в *S. cerevisiae*.

SEQ ID NO: 4 представляет собой нуклеотидную последовательность фрагмента 5 (фиг. 1), которая включает транспортер дикарбоновых кислот из *A. niger* с оптимизированными кодоновыми парами для экспрессии в *S. cerevisiae*.

SEQ ID NO: 5 излагает нуклеотидную последовательность фрагмента 6 (фиг. 1), которая включает малатдегидрогеназу (MDH3) из *S. cerevisiae* с оптимизированными кодоновыми парами, для экспрессии в *S. cerevisiae*.

SEQ ID NO: 6 представляет собой нуклеотидную последовательность фрагмента 7 (фиг. 1), который включает фумаразу (fumB) из *Escherichia coli* с оптимизированными кодоновыми парами для экспрессии в *S. cerevisiae*.

SEQ ID NO: 7 представляет собой нуклеотидную последовательность фиг. 10 (фиг. 2), которая включает селективный маркер ноурсетрицин, функциональный в *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 8 представляет собой нуклеотидную последовательность фрагмента 11 (фиг. 2), кото-

рая включает кодирующую последовательность для фумаратредуктазы из *Trypanosoma brucei* (FRDg) с оптимизированными кодоновыми парами для экспрессии в *S. cerevisiae*.

SEQ ID NO: 9 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 1 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 10 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 1 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 11 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 2 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 12 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 2 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 13 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 3 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 14 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 3 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 15 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 3 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 16 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 4 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 17 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 5 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 18 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 5 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 19 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 6 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 20 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 6 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 21 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 7 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 22 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 7 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 23 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 8 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 24 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 8 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 25 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 9 (фиг. 2).

SEQ ID NO: 26 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 9 (фиг. 2).

SEQ ID NO: 27 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 10 (фиг. 2).

SEQ ID NO: 28 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 10 (фиг. 2).

SEQ ID NO: 29 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 12 (фиг. 2).

SEQ ID NO: 30 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 12 (фиг. 2).

SEQ ID NO: 31 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 11 (эталон FRDg) или фрагментов 13-22 (варианты FRD) (фиг. 2).

SEQ ID NO: 32 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 11 (эталон FRDg) или фрагментов 13-22 (варианты FRD) (фиг. 2).

В SEQ ID NO: 33 представлена аминокислотная последовательность белка фумаратредуктазы из *T. brucei* без С-концевой последовательности SKI (эталон FRDg).

SEQ ID NO: 34 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 23.

SEQ ID NO: 35 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 23.

SEQ ID NO: 36 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 24.

SEQ ID NO: 37 представляет собой нуклеотидную последовательность праймера, используемого для получения фрагмента 24.

SEQ ID NO: 38 представляет собой нуклеотидную последовательность ПЦР-фрагмента 25, включающего 5' фланкирующий участок интеграции для нацеливания в локус INT09.01 из CEN.PK113-7D.

SEQ ID NO: 39 представляет собой нуклеотидную последовательность ПЦР-фрагмента 26, который включает селективный маркер ноурсетрицин, функциональный в *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 40 представляет собой нуклеотидную последовательность ПЦР-фрагмента 27, которая включает кодирующую последовательность для фумаратредуктазы из *Trypanosoma brucei* (FRDg), оптимизированной по кодоновым парам для экспрессии в *S. cerevisiae*.

SEQ ID NO: 41 представляет собой нуклеотидную последовательность ПЦР-фрагмента 28, включающего 3'-фланкирующий участок интеграции для нацеливания в локус INT09.01 из CEN.PK113-7D.

Подробное описание изобретения

Во всем настоящем описании и в сопровождающих пунктах формулы изобретения слова "содержать", "включать" и "иметь" и их вариации, такие как "содержит", "содержащий", "включает" и "включающий" должны толковаться включительно. Т.е. эти слова призваны передать идею возможного включения других элементов или целых специально не перечисленных там, где позволяет контекст.

В данном документе, слова, употребляемые в единственном числе, также включают и их множественное число. К примеру, элемент может обозначать один элемент или больше одного элемента.

Восстановительный путь TCA содержит две реакции, которые требуют потребления восстанавливающего источника (например, NADH или NADPH): реакция малатдегидрогеназы (восстановление оксалоацетата в малат) и реакции фумаратредуктазы (восстановление фумарата в сукцинат).

Saccharomyces cerevisiae имеет две эндогенные фумаратредуктазы, FRD1 и OSM1. Они расположены как в цитозоле, так и в митохондриях, и детектируются во фракциях плазматической мембраны. Они обе используют FADH2 в качестве кофактора. Однако, не известен цитозольный источник FADH2. В отличие FADH2, никотинамид-содержащие кофакторы, такие как NADH и NADPH могут быть регенерированы, например, малатдегидрогеназы (восстановление оксалоацетата в малат) и реакции фумаратредуктазы (восстановление фумарата в сукцинат).

Saccharomyces cerevisiae имеет две эндогенные фумаратредуктазы, FRD1 и OSM1. Они расположены как в цитозоле, так и в митохондриях, и детектируются во фракциях плазматической мембраны. Они обе используют FADH2 в качестве кофактора. Однако не известен цитозольный источник FADH2. В отличие FADH2 никотинамид-содержащие кофакторы, такие как NADH и NADPH, могут быть регенерированы, например, посредством глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (NADH) в гликолизе или окислительной ветки пентозофосфатного пути (NADPH).

Соответственно введение фумаратредуктазы, которая использует никотинамид-содержащий кофактор, может быть благоприятной для ферментативной выработки дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота.

В настоящее время единственный известный класс фумаратредуктазы с помощью никотинамид-содержащего кофактора представляет собой фумаратредуктазы из видов *Trypanosoma* и *Leishmania*, например, ген фумаратредуктазы *Trypanosoma brucei* и его гомологи. Объединение этой FRD и дрожжевой MDH в цитозоли дрожжей дает, таким образом, восстановительный путь TCA, который использует NADH в качестве кофактора.

Изменение кофактора, используемого в восстановительном пути TCA, с NADH на NADPH, может иметь несколько преимуществ, включая:

1) более сильную термодинамическую движущую силу из-за более высокого соотношения внутриклеточных концентраций $\frac{[NADPH]}{[NADP]}$ по сравнению с $\frac{[NADH]}{[NAD]}$;

2) более высокую концентрацию субстрата на основании измерений метаболических концентраций ($[NADPH] > [NADH]$);

3) восстановление кофактора, не связанное с гликолизом; и

4) дополнительную регенерацию кофактора через другие пути, такие как пентозо-фосфатный путь.

Согласно изобретению, таким образом, предлагается вариантный полипептид, имеющий активность фумаратредуктазы (FRD). Вариантный полипептид изобретения обладает активностью фумаратредуктазы. Активность фумаратредуктазы является активностью преобразования фумаровой кислоты в янтарную кислоту: Сукцинат + акцептор $\rightleftharpoons$ фумарат + восстановленный акцептор

Вариантный полипептид по изобретению имеет модифицированную NAD(H)-зависимую активность по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность FRD.

Такой вариантный полипептид может иметь повышенную NADP(H)-зависимую активность по сравнению с эталонным полипептидом.

Такой вариантный полипептид может иметь сниженную NAD(H)-зависимую активность по сравнению с эталонным полипептидом.

Эталонный полипептид может быть фумаратредуктазой дикого типа, такой как фумаратредуктаза из протозойного источника, такого как *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis*, или *Leishmania Mexicana*. Эталонный полипептид может быть фумаратредуктазой (NADH) EC1.3.1.6. FRD, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33 может быть подходящим эталонным полипептидом.

Вариантный полипептид по изобретению может быть не встречающимся в природе полипептидом

и/или может быть закодирован не встречающейся в природе полинуклеотидной последовательностью.

Термин "NADPH-зависимый" в данном документе, как правило, относится к свойству фермента предпочтительно использовать NADPH, а не NADH, в качестве редокс-кофактора. Таким образом, NADPH-зависимый фермент, как правило, имеет более высокую активность, например, более высокую константу специфичности (k_{cat}/K_M) с кофактором NADPH, чем с кофактором NADH, например, определенную с помощью теста ферментативной активности, такого, как описанный в Примерах.

Термин "NADH-зависимый" в данном документе, как правило, относится к свойству фермента предпочтительно использовать NADH, а не NADPH, в качестве редокс-кофактора. Таким образом, NADH-зависимый фермент, как правило, имеет более высокую активность, например, более высокую константу специфичности (k_{cat}/K_M) с кофактором NADH, чем с кофактором NADPH, например, определенную с помощью теста ферментативной активности, такого, как описанный в примерах.

Активность вариантного полипептида изобретения может быть определена как изложено в примере 4. V_{max} и K_M ферментов к NADH и NADPH могут быть определены из v_0 с помощью координат Лайнуивера-Берка (Lineweaver, H and Burk, D. (1934), "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". Journal of the American Chemical Society 56 (3): 658-666), где концентрация NADH или NADPH варьирует, например, от 25 до 400 мкМ.

Вариантный полипептид изобретения может демонстрировать увеличение NADP(H)- относительно NAD(H)- активности по сравнению с эталонным полипептидом. Иначе говоря, вариантный полипептид может показать снижение в соотношении NADP(H)-активности к NAD(H)-активности в сравнении с эталонным полипептидом.

В данном документе вариантные полипептиды изобретения могут называться "FRD-вариант", "вариантный полипептид FRD", "вариант", "вариантный полипептид" или "FCC" или "FCC-полипептид" или т.п.

Вариантный полипептид FRD по изобретению (например, вариант, имеющий одну или несколько замен, представленных в данном документе) может иметь по меньшей мере 60, 70, 80% идентичности эталонному полипептиду FRD, такому как FRD с SEQ ID NO: 33, например по меньшей мере 85% идентичности эталонному полипептиду, например по меньшей мере около 90% идентичности эталонному полипептиду, по меньшей мере около 95% идентичности к эталонному полипептиду, по меньшей мере 98% идентичности к эталонному полипептиду или по меньшей мере 99% идентичности к эталонному полипептиду. Такой вариант будет, как правило, иметь одну или несколько замен или наборов замен, изложенных в любой из табл. 1, 2, 4, 5 или 6.

Вариант FRD по изобретению, как правило, сохраняет активность FRD. Иначе говоря, FRD-вариант изобретения будет, как правило, способен катализировать реакцию, изложенную выше, несмотря на модифицированную кофакторную специфичность по сравнению с эталонным полипептидом.

Предпочтительно, если вариантный полипептид FRD по изобретению будет, как правило, демонстрировать улучшенные свойства по сравнению с эталонным полипептидом, из которого вариантный полипептид выделен, как правило, по показателю модифицированной кофакторной специфичности. Такое улучшенное свойство относится, как правило, к такому, которое является релевантным, если вариант будет использоваться, как представлено ниже, например, для способа получения дикарбоновой кислоты (путем экспрессии FRD).

Таким образом, FRD-вариант по изобретению является вариантом, который, как правило, способен осуществить повышенную выработку дикарбоновой кислоты в рекомбинантном микроорганизме, способном осуществлять выработку указанной дикарбоновой кислоты. Иначе говоря, сверхэкспрессия вариантного полипептида FRD по изобретению в клетке-хозяине, как правило, приведет к увеличению выработки дикарбоновой кислоты по сравнению с клеткой-хозяином, которая сверхэкспрессирует хозяйский полипептид (такой как FRDg из SEQ ID NO: 33).

FRD-вариант, который демонстрирует свойство, которое является улучшенным относительно эталонного FRD, представляет собой вариант, который демонстрирует измеряемое уменьшение или повышение релевантного свойства, т.е. NAD(H)- или NADP(H)-зависимой активности, как правило, так, что FRD-вариант более подходит для изложенного ниже применения, например, в способе выработки дикарбоновой кислоты.

Вариантный полипептид FRD включает аминокислотную последовательность, которая имеет одну или несколько замен, делеций и/или вставок аминокислот по сравнению с эталонным полипептидом и/или одну или несколько укорочений по сравнению с эталонным полипептидом. Вариантный полипептид FRD может включать одну или несколько замен, описанных в данном документе.

Вариантный полипептид, имеющий активность FRD, например, изложенную выше, который имеет аминокислотную последовательность, которая, при выравнивании с фумарат, имеющей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, включает по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 1042, 1071, 1072, 1082 или 1083, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 33 и где вариант имеет одно или несколько измененных свойств по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность фумаратредуктазы.

Таким образом, аминокислота, представленная в одной или нескольких из указанных положений,

будет заменена на другую аминокислоту, отличную от той, что находится в данном положении в эталонном полипептиде (положения, определенные на основании SEQ ID NO: 33).

Замена в положении 1042 (определенном относительно SEQ ID NO: 33), как правило, является полярной аминокислотой, например, неотрицательно заряженной аминокислотой, такой как положительно заряженная аминокислота. Подходящие положительно заряженные аминокислоты включают аргинин (R), лизин (K) и гистидин (H). Дополнительной подходящей полярной аминокислотой является глутамин (Q).

Замена в положении 1071 (определенном относительно SEQ ID NO: 33), как правило, будет малой аминокислотой. Подходящие малые аминокислоты включают треонин (T), серин (S), глицин (G), аланин (A), пролин (P) и аспартат (D).

Замена в положении 1082 (определенном относительно SEQ ID NO: 33), как правило, является положительно заряженной аминокислотой. Подходящие положительно заряженные аминокислоты включают аргинин (R), лизин (K) и гистидин (H).

Замена в положении 1083 (определенном относительно SEQ ID NO: 33), как правило, будет малым гидрофобным остатком. Подходящие более мелкие аминокислоты включают изолейцин (I) или аланин (A).

Различные типы аминокислоты выше классифицированы на основании, например, Betts and Russell, *In Bioinformatics for Geneticists*, Barnes and Gray eds, Wiley 2003.

Более подробно, вариантный полипептид может включать

R, K или Q в положении 1042, определенном относительно SEQ ID NO: 33;

T или S в положении 1071, определенном относительно SEQ ID NO: 33;

K в положении 1072, определенном относительно SEQ ID NO: 33;

K или R в положении 1082, определенном относительно SEQ ID NO: 33; или

Y, I или A в положении 1083, определенном относительно SEQ ID NO: 33.

Такой вариантный полипептид может быть модифицирован для того, чтобы модифицированное свойство являлось модифицированной NAD(H)-зависимой активностью, такой как сниженная NAD(H)-зависимая активность, и/или модифицированная NADP(H)-зависимая активность, такая как увеличенная NADP(H)-зависимая активность.

Вариантный полипептид согласно одному из предшествующих пунктов, который включает дополнительные замены, отличные от пяти позиций, определенных выше, например, одну или несколько дополнительных замен, добавлений или делеций.

Вариант по изобретению может включать комбинацию различных типов модификации данного вида. Вариант может включать одну, две, три, четыре, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30 или более таких модификаций (которые все могут быть одного типа или могут быть модификациями разного типа). Как правило, дополнительные модификации могут быть заменами.

Вариантный полипептид по любому из предшествующих пунктов, определенный относительно табл. 1, 2, 4, 5 или 6. Иначе говоря, вариантный полипептид может включать любую комбинацию замен, изложенную в табл. 1, 2, 4, 5 или 6 по сравнению с подходящей эталонной последовательностью, такой как та, что представлена в SEQ ID NO: 33.

Как правило, вариантный полипептид может содержать последовательность SEQ ID NO: 33, но в одном из положений 1042, 1071, 1072, 1082 или 1083 будет присутствовать другая аминокислота, отличная от присутствующей в SEQ ID NO: 33 (т.е. вариантный полипептид включает замену в одном или нескольких положениях 1042, 1071, 1072 или 1083). Иначе говоря, вариантный полипептид может иметь аминокислоту, отличную от глутамата в позиции 1042 и/или аминокислоту, отличную от аспарагина в позиции 1071 и/или аминокислоту, отличную от аргинина в позиции 1072 и/или аминокислоту, отличную от глицина в позиции 1082 и/или аминокислоту, отличную от фенилаланина в положении 1083.

Таблица 1. Мутированная фумаратредуктаза, которая содержит мутации по сравнению с эталонной последовательностью (SEQ ID NO: 33) в аминокислотных положениях, указанных ниже. Эти последовательности могут быть полезными при дальнейшем увеличении титров янтарной кислоты относительно применения эталонной последовательности (SEQ ID NO: 33)

Клон	Мутация в положении				
	1042	1071	1072	1082	1083
Эталон	E	N	R	G	F
FCC_001	E	S	R	G	F
FCC_002	E	S	R	G	Y
FCC_003	E	S	R	K	F
FCC_004	E	S	R	K	Y
FCC_005	E	S	R	R	F
FCC_006	E	S	R	R	Y
FCC_007	E	S	K	G	F
FCC_008	E	S	K	G	Y
FCC_009	E	S	K	K	F
FCC_010	E	S	K	K	Y
FCC_011	E	S	K	R	F
FCC_012	E	S	K	R	Y
FCC_013	E	T	R	G	F
FCC_014	E	T	R	G	Y
FCC_015	E	T	R	K	F
FCC_016	E	T	R	K	Y
FCC_017	E	T	R	R	F
FCC_018	E	T	R	R	Y
FCC_019	E	T	K	G	F
FCC_020	E	T	K	G	Y
FCC_021	E	T	K	K	F
FCC_022	E	T	K	K	Y
FCC_023	E	T	K	R	F
FCC_024	E	T	K	R	Y
FCC_025	R	S	R	G	F
FCC_026	R	S	R	G	Y
FCC_027	R	S	R	K	F
FCC_028	R	S	R	K	Y
FCC_029	R	S	R	R	F
FCC_030	R	S	R	R	Y
FCC_031	R	S	K	G	F
FCC_032	R	S	K	G	Y
FCC_033	R	S	K	K	F

037088

FCC_034	R	S	K	K	Y
FCC_035	R	S	K	R	F
FCC_036	R	S	K	R	Y
FCC_037	R	T	R	G	F
FCC_038	R	T	R	G	Y
FCC_039	R	T	R	K	F
FCC_041	R	T	R	R	F
FCC_042	R	T	R	R	Y
FCC_043	R	T	K	G	F
FCC_044	R	T	K	G	Y
FCC_047	R	T	K	R	F
FCC_049	K	S	R	G	F
FCC_050	K	S	R	G	Y
FCC_051	K	S	R	K	F
FCC_052	K	S	R	K	Y
FCC_053	K	S	R	R	F
k<t0/>a1	K	S	R	R	Y
FCC_055	K	S	K	G	F
FCC_056	K	S	K	G	Y
FCC_057	K	S	K	K	F
FCC_058	K	S	K	K	Y
FCC_059	K	S	K	R	F
FCC_060	K	S	K	R	Y
FCC_061	K	T	R	G	F
FCC_062	K	T	R	G	Y
FCC_063	K	T	R	K	F
FCC_064	K	T	R	K	Y
FCC_066	K	T	R	R	Y
FCC_067	K	T	K	G	F
FCC_068	K	T	K	G	Y
FCC_071	K	T	K	R	F
FCC_072	K	T	K	R	Y
FCC_073	Q	S	R	G	F
FCC_074	Q	S	R	G	Y
FCC_077	Q	S	R	R	F
FCC_079	Q	S	K	G	F
FCC_080	Q	S	K	G	Y
FCC_081	Q	S	K	K	F
FCC_082	Q	S	K	K	Y
FCC_083	Q	S	K	R	F
FCC_084	Q	S	K	R	Y
FCC_085	Q	T	R	G	F
FCC_086	Q	T	R	G	Y
FCC_087	Q	T	R	K	F

FCC_088	Q	T	R	K	Y
FCC_089	Q	T	R	R	F
FCC_090	Q	T	R	R	Y
FCC_091	Q	T	K	G	F
FCC_092	Q	T	K	G	Y
FCC_093	Q	T	K	K	F
FCC_094	Q	T	K	K	Y
FCC_095	Q	T	K	R	F
FCC_096	Q	T	K	R	Y
FCC_097	R	G	R	R	Y
FCC_098	Q	G	R	R	Y
FCC_099	R	G	R	K	Y
FCC_100	Q	G	R	K	Y
FCC_101	R	S	R	R	I
FCC_102	R	G	R	R	I
FCC_103	Q	S	R	R	I
FCC_104	Q	G	R	R	I
FCC_105	R	S	R	K	I
FCC_106	R	G	R	K	I
FCC_107	Q	S	R	K	I
FCC_108	Q	G	R	K	I
FCC_109	R	S	R	R	A
FCC_110	R	G	R	R	A
FCC_111	Q	S	R	R	A
FCC_112	Q	G	R	R	A
FCC_113	R	S	R	K	A
FCC_114	R	G	R	K	A
FCC_115	Q	S	R	K	A
FCC_116	Q	G	R	K	A
FCC_117	R	S	R	R	S
FCC_118	R	G	R	R	S
FCC_119	Q	S	R	R	S
FCC_120	Q	G	R	R	S
FCC_121	R	S	R	K	S
FCC_122	R	G	R	K	S
FCC_123	Q	S	R	K	S
FCC_124	Q	G	R	K	S

Вариантный полипептид, как правило, будет обладать модифицированной активностью FRD по сравнению с эталонным полипептидом. Как правило, модифицированная активность может быть определена по показателю модифицированной зависимости от кофакторов. Эта NAD(H)- или NADP(H)-зависимая активность может быть модифицирована, например, уменьшением (в случае NAD(H)-зависимой активности), по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%. В ином случае, свойство может быть увеличено (в случае NADP(H)-зависимой активности) по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 1000%.

Процент уменьшения или увеличения в данном контексте представляет собой процент уменьшения или увеличения в сравнении с эталонным полипептидом FRD, например, из SEQ ID NO: 33. Специалистам хорошо известно, как такие процентные изменения могут быть измерены - измерение является сравнением, например, NAD(H)-или NADP(H)-зависимой активности, эталонного FRD и варианта FRD, измеренных, как изложено в примере, или согласно, например: Miura A. et al., J. Bacteriol 190:7170-717.

Модифицированная активность может быть определена по показателю увеличения выработки дикарбоновой кислоты, при сверхэкспрессии варианта FRD в клетке-хозяине, по сравнению с уровнем выработки эквивалентной клетки-хозяина, которая сверхэкспрессирует эталонный полипептид, например, с SEQ ID NO: 33. Вариант FRD может быть способен повысить уровни выработки по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или больше. Уровень выработки может быть выражен в г/л, так, что увеличение уровня выработки дикарбоновой кислоты будет очевидно по более высокому уровню выработки в г/л.

Слово «полипептид» используется в данном документе для цепей, содержащих больше, чем семь аминокислотных остатков. Все полипептидные последовательности в данном документе записаны слева направо в направлении от аминоконца к карбоксильному концу. Используемый в данном документе однобуквенный аминокислотный код широко известен в данной области и может быть найден в Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd,ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Вариант полипептида FRD по изобретению может быть в выделенной форме, например, частично выделенной форме. Под "выделенным" полипептидом или белком понимается полипептид или белок, удаленный из своей естественной среды. Например, рекомбинантно-продуцируемые полипептиды и белки, экспрессируемые в хозяйских клетках, рассматриваются как выделенные в целях изобретения, если являются рекомбинантными полипептидами, которые были по существу очищены любым подходящим

методом. Вариантный полипептид FRD согласно изобретению может быть извлечен и очищен из культур рекомбинантных клеток с помощью методов, известных в данной области.

Вариантные полипептиды FRD по настоящему изобретению включают продукты процедур химического синтеза, и продукты, полученные рекомбинантными методами из прокариотических или эукариотических хозяев, включающих, например, бактерии, дрожжи, клетки высших растений, насекомых и клетки млекопитающих. В зависимости от используемого в процедуре рекомбинантного получения хозяина, полипептиды настоящего изобретения могут быть гликозилированы или негликозилированы. Кроме того, полипептиды изобретения могут также включать инициальный модифицированный остаток метионина, в некоторых случаях как результат опосредованных хозяином процессов.

Изобретение также описывает биологически активные фрагменты вариантов полипептида FRD по изобретению. Такие фрагменты считаются охваченными термином "вариант FRD по изобретению".

Биологически активные фрагменты варианта полипептида FRD по изобретению включают полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, в достаточной степени идентичные или полученные из аминокислотной последовательности вариантного белка изобретения, которые включают меньшее количество аминокислот, чем полноразмерный белок, но которые демонстрируют по меньшей мере одну биологическую активность соответствующего полноразмерного белка. Как правило, биологически активные фрагменты содержат домен или мотив по меньшей мере с одной активностью вариантного белка по изобретению. Биологически активный фрагмент варианта FRD по изобретению может быть полипептидом, длина которого составляет, например, 10, 25, 50, 100 или более аминокислот. Более того, другие биологически активные части, в которых удалены другие области белка, могут быть получены путем рекомбинантных технологий и оценены по одному или нескольким биологическим активностям нативной формы полипептида изобретения.

Как правило, фрагмент варианта FRD по изобретению будет содержать одну или несколько замен, определенных в данном документе.

Изобретение также описывает функции фрагментов нуклеиновых кислот, кодирующих вышеупомянутые биологически активные фрагменты (где биологически активные фрагменты сами являются вариантами по изобретению).

Предпочтительно, если для цитозольной активности фермента при экспрессии кодирующей нуклеотидной последовательности в подходящей клетке-хозяине вариант

FRD по изобретению утрачивает сигнал нацеливания в пероксисомы или митохондрии.

В настоящем изобретении предлагаются полинуклеотиды, которые включают последовательности, кодирующие вариантный полипептид FRD по изобретению (и его биологически активные фрагменты). Изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему, по меньшей мере, один функциональный домен варианта полипептида FRD по изобретению. Как правило, такой домен будет содержать одну или несколько замен, определенных в данном документе.

Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может быть получена с использованием стандартных методов молекулярной биологии, хорошо известных специалисту в данной области, в комбинации с информацией о последовательности, представленной в данном документе. Например, с использованием стандартных синтетических методов требуемая молекула нуклеиновой кислоты может быть получена с помощью ПЦР или синтезирована *de novo*. Такой синтетический способ, как правило, может быть автоматизированным способом.

Нуклеиновая кислота по изобретению может включать одну или несколько делеций, т.е., пропусков по сравнению с нуклеиновой кислотой, кодирующей эталонную FRD. Такие делеции/разрывы также могут быть образованы с помощью сайт-направленного мутагенеза, с использованием соответствующих олигонуклеотидов. Методы образования таких делеций хорошо известны специалистам в данной области.

Кроме того, олигонуклеотиды, соответствующие или гибридизующиеся с нуклеотидными последовательностями согласно изобретению, могут быть получены с помощью стандартных синтетических методов, например, с использованием автоматического ДНК-синтезатора.

Кроме того, в настоящее изобретение включены комплементарные молекулы нуклеиновых кислот и антисмысловых нуклеиновых кислот. Молекула нуклеиновой кислоты, которая является комплементарной другой нуклеотидной последовательности является последовательностью, которая достаточно комплементарна другой нуклеотидной последовательности, такой, которая может гибридизоваться с другой нуклеотидной последовательностью, тем самым образуя стабильный дуплекс.

Один аспект изобретения относится к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют вариант по изобретению или его биологически активный фрагмент или домен, а также молекулы нуклеиновой кислоты, достаточные для применения в качестве гибридизационных зондов для идентификации молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид по изобретению, а фрагменты таких молекул нуклеиновых кислот, подходят для применения в качестве ПЦР-праймеров для амплификации или мутации молекул нуклеиновых кислот, как например, для получения молекул нуклеиновых кислот по изобретению.

"Выделенный полинуклеотид" или "выделенная нуклеиновая кислота" представляет собой молеку-

лу ДНК или РНК, которая непосредственно не граничит с обеими кодирующими последовательностями, с которыми она непосредственно граничит (с одной с 5' конца и с одной с 3' конца) в естественном геноме организма, из которого данная молекула получена. Таким образом, в одном воплощении, выделенная нуклеиновая кислота включает некоторые или все 5' концевые некодирующие последовательности (например, промотор), которые непосредственно граничат с кодирующей последовательностью. Термин, следовательно, включает, например, рекомбинантную ДНК, которая вставлена в вектор, в автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус, или в геномную ДНК прокариотического или эукариотического организма, или которая существует в виде отдельной молекулы (например, к ДНК или фрагмента геномной ДНК, полученной ПНР или обработкой эндонуклеазами рестрикции). Термин также включает рекомбинантную ДНК, которая является частью гибридного гена кодирующего дополнительный полипептид, который фактически не содержит клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды (когда производится методами рекомбинантных ДНК), или химическими предшественниками или другими химическими веществами (если молекула синтезирована химически). Более того, "выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты" представляет собой фрагмент нуклеиновой кислоты, не существующий в природе как фрагмент, и который не может быть обнаружен в естественном состоянии.

Использованный в данном документе термин "полинуклеотид" или "молекула нуклеиновой кислоты" предназначен для включения молекул ДНК (например, кДНК или геномной ДНК) и молекул РНК (например, мРНК) и аналогов ДНК или РНК, полученных с использованием аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно является двухцепочечной ДНК. Нуклеиновая кислота может быть синтезирована с использованием олигонуклеотидных аналогов или производных (например, инозина или фосфоротиоатных нуклеотидов). Такие олигонуклеотиды могут быть использованы, например, для подготовки нуклеиновых кислот, которые имеют измененные способности спаривания оснований или повышенную устойчивость к нуклеазам.

Изобретение также относится к нуклеотидной конструкции, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую вариантный полипептид по изобретению, и функционально связанные с ней контрольные последовательности, позволяющие осуществить экспрессию нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине. Нуклеотидная конструкция может быть включен в вектор, такой как экспрессирующий вектор и/или в клетку-хозяина для эффективной экспрессии вариантного полипептида.

Термин "нуклеотидная конструкция" определен в данном документе как молекула нуклеиновой кислоты, либо одно-, либо двухцепочечная, которая выделена из естественного гена, или, что встречается чаще, которая была модифицирована так, чтобы она содержала сегменты нуклеиновой кислоты, которые объединены и расположены рядом друг с другом так, как они не существуют в природе. Термин конструкция нуклеиновой кислоты является синонимом термину "экспрессирующая кассета", если конструкция нуклеиновой кислоты содержит контрольные последовательности, которые необходимы для экспрессии кодирующей последовательности.

Используемый в данном документе термин "функционально связан" относится к связыванию полинуклеотидных элементов (или кодирующих последовательностей или нуклеотидных последовательностей) в функциональное взаимодействие. Нуклеотидная последовательность является "функционально связанной" если она находится в функциональном взаимодействии с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, если промотор или энхансер функционально связаны с кодирующей последовательностью, то указанный промотор или энхансер влияют на транскрипцию кодирующей последовательности.

Использованный в данном документе термин "промотор" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, которая функционирует для контроля транскрипции одного или нескольких генов, где данный фрагмент расположен выше относительно направления транскрипции от сайта начала транскрипции гена, и структурно идентифицируется по присутствию сайта связывания с ДНК-зависимой РНК полимеразой, сайта инициации транскрипции и любой другой последовательности ДНК, известной специалисту в данной области. "Конститутивный" промотор является промотором, который активен в большинстве условий обусловленных окружением и развитием. "Индукцируемый" промотор является промотором, который активен при регуляции обусловленной окружением или стадией развития.

Промотор, который может быть использован для достижения экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей фермент NAD(H)-зависимую фумаратредуктазу или любой другой фермент, вводимый в эукариотическую клетку по изобретению, может в природе не контролировать нуклеотидную последовательность, кодирующую экспрессируемый фермент, т.е. промотор, который является гетерологичным к нуклеотидной последовательности (кодирующей последовательности), с которой он функционально связан. Предпочтительно, если промотор является гомологичным, т.е. эндогенным по отношению к клетке-хозяину.

Подходящие промоторы в данном контексте включают как конститутивные, так и индуцируемые природные промоторы, а также сконструированные промоторы, которые широко известны специалисту в данной области. Подходящими промоторами в эукариотических клетках-хозяевах могут быть GAL7, GAL10 или GAL 1, CYC1, HIS3, ADH1, PGL, PH05, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TPI и

АОХ1. Другие подходящие промоторы включают PDC, GPD1, PGK1, TEF1 и TDH.

Обычно нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент, содержит терминатор. Любой терминатор, который является функциональным в эукариотической клетке, может быть использован в настоящем изобретении. Предпочтительные терминаторы получают из природных генов клетки-хозяина. Подходящие терминаторные последовательности хорошо известны в данной области. Предпочтительно такие терминаторы объединяются с мутациями, которые предотвращают нонсенс-опосредованный распад РНК в клетках-хозяевах изобретения (см., например: Shirley et al., 2002, Genetics 161:1465-1482).

Изобретение дополнительно относится к вектору, предпочтительно экспрессирующему вектору, содержащему нуклеиновую кислоту или нуклеотидную конструкцию по изобретению (т.е. содержащий последовательность, кодирующую вариантный полипептид FRD по изобретению).

Для облегчения экспрессии и/или трансляции ISP, нуклеотидная последовательность, кодирующая ISP, может быть включена в экспрессирующий вектор так, чтобы ген, кодирующий ISP, был функционально связан с соответствующими контрольными последовательностями для экспрессии и/или трансляции *in vitro*, или в клетке-хозяине по изобретению. Иначе говоря, в изобретении предлагается экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту или нуклеотидную конструкцию по изобретению.

Экспрессирующий вектор может быть любым вектором (например, плазмидой или вирусом), который удобно подвергать процедурам рекомбинантных ДНК и который может привести к экспрессии полинуклеотида, кодирующего вариантный полипептид FRD. Выбор вектора, как правило, зависит от совместимости вектора с клеткой, в которую вектор будет вводиться. Векторы могут быть линейными или замкнутыми кольцевыми плазмидами. Вектор может быть автономно реплицирующимся вектором, т.е. вектором, который существует как экстрахромосомная сущность, репликация которой независима от хромосомной репликации, например, плазмидой, экстрахромосомным элементом, мини-хромосомой или искусственной хромосомой. Если клетка-хозяин имеет грибное происхождение, то подходящая эписомальная нуклеотидная конструкция может, например, быть основана на дрожжевых плазмидах 2μ или pKD1 (Gleer et al., 1991, Biotechnology 9: 968-975), или плазмидах AMA (Fierro et al., 1995, Curr Genet. 29:482-489).

В ином случае вектор может быть вектором, который при введении в клетку-хозяин, интегрируется в геном клетки-хозяина и реплицируется вместе с хромосомой(ами) в которую он был интегрирован. Интегрирующий клонирующий вектор может быть интегрирован в случайном или заданном локусе-мишени в хромосомах клетки-хозяина. В предпочтительном воплощении изобретения интегрирующий вектор для клонирования содержит фрагмент ДНК, который является гомологичным последовательности ДНК в заданном локусе-мишени в геноме клетки-хозяина для направленной интеграции вектора для клонирования в этот заданный локус. Для стимуляции направленной интеграции клонирующий вектор предпочтительно линеаризуют перед трансформацией клетки. Линеаризация предпочтительно осуществляется так, чтобы по меньшей мере один, но предпочтительно и другой конец вектора для клонирования фланкировался последовательностями, гомологичными локусу-мишени. Длина гомологичных последовательностей фланкирующих локус-мишень, предпочтительна равна по меньшей мере 20 п.о., по меньшей мере 30 п.о., по меньшей мере 50 п.о., по меньшей мере 0,1 тыс. п.о., по меньшей мере 0,5 тыс. п.о., по меньшей мере 1 тыс. п.о., по меньшей мере 2 тыс. п.о. или длиннее. Эффективность адресной интеграции в геном клетки-хозяина, т.е. интеграции в заданный локус-мишень, повышается посредством усиленной способности к гомологичной рекомбинации клетки-хозяина.

Гомологичные фланкирующие последовательности в клонирующем векторе, которые являются гомологичными локусу-мишени, происходят из сильноэкспрессируемого локуса, что означает, что они происходят из гена, который способен иметь высокий уровень экспрессии в клетке-хозяине. Ген, способный достичь высокого уровня экспрессии, т.е. сильноэкспрессируемый ген, в данном документе определен как ген, чья мРНК может достичь по меньшей мере 0,5% (мас./мас.) от общей клеточной мРНК, например, в индуцируемых условиях, или в ином случае, определен как ген, чей генный продукт может достичь по меньшей мере 1% (мас./мас.) от общего количества клеточного белка, или в случае секретрируемого генного продукта, может быть секретирован на уровне по меньшей мере 0,1 г/л.

Нуклеотидная конструкция или экспрессирующий вектор может быть собран *in vivo* в клетке-хозяине по изобретению, и, необязательно, интегрирован в геном клетки в одну стадию (см., например, WO 2013/076280).

Более чем одна копия нуклеотидной конструкции или экспрессирующего вектора по изобретению может быть вставлена в клетку-хозяин мицелиального гриба для увеличения выработки вариантного полипептида FRD (сверхэкспрессия), кодируемого указанной последовательностью, включенной в нуклеотидную конструкцию. Это можно осуществить предпочтительно путем интеграции в геном двух или более копий нуклеиновой кислоты, более предпочтительно, путем направленной интеграции нуклеиновой кислоты в высоко экспрессирующийся локус, определенный выше.

Специалистам в данной области понятно, что конструирование экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор трансформируемой клетки-хозяина, желаемый уровень экспрессии белка и т.п. Экспрессирующие векторы по изобретению могут быть введены в клетки-хозяева для того, чтобы продуцировать белки или пептиды, кодируемые описанными в данном документе нуклеино-

выми кислотами (например, вариант FRD с SEQ ID NO: 33, например, функциональный эквивалент или фрагмент или сшитый белок, включающий один или несколько из таких вариантов).

Нуклеотидные конструкции и векторы по изобретению могут быть сконструированы для экспрессии вариантных полипептидов FRD по изобретению в прокариотических или эукариотических клетках.

Нуклеотидная конструкция и/или экспрессирующий вектор по изобретению могут быть введены в прокариотические или эукариотические клетки с помощью обычных методов трансфекции и трансформации. Используемые в данном документе термины "трансформация" и "трансфекция" предназначены для обозначения множества признанных в данной области методов для внедрения чужеродной нуклеиновой кислоты (например, ДНК) в клетку-хозяина, известных специалистам в данной области. Подходящие способы для трансформации или трансфекции клеток-хозяев могут быть найдены в Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) и в других лабораторных руководствах.

Термины "функциональные эквиваленты" и "функциональные варианты" в данном описании применяются взаимозаменяемо. Функциональные эквиваленты по изобретению являются выделенными фрагментами нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид, демонстрирующий конкретную функцию варианта FRD, определенного в данном документе. Функциональные эквиваленты, следовательно, также охватывают биологически активные фрагменты и сами охватываются термином "вариант FRD" по изобретению.

Предпочтительно функциональный эквивалент изобретения включает одну или несколько замен, описанных в данном документе. Однако функциональный эквивалент может содержать одну или несколько модификаций в дополнение к заменам, описанным выше.

Функциональные эквиваленты нуклеиновых кислот могут, как правило, содержать молчащие мутации или мутации, которые не влияют на биологическую функцию кодируемого вариантного полипептида FRD. Соответственно в изобретении предлагаются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие вариантный белок FRD, который содержит аминокислотные остатки, которые не являются существенными для конкретной биологической активности, т.е. активности FRD.

Такие функциональные эквиваленты вариантных белков FRD отличаются по аминокислотной последовательности от последовательности родительского варианта FRD, от которой они произошли, сохраняя при этом по меньшей мере одну его биологическую активность, предпочтительно они сохраняют, по меньшей мере, активность FRD. Специалисту будет понятно, что изменения могут быть введены мутациями в нуклеотидные последовательности по изобретению, что тем самым приведет к изменениям в аминокислотной последовательности полученного белка без существенного изменения функции такого белка.

В одном воплощении выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, где белок содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, идентичную на около 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% с родительским вариантом FRD или эталонной аминокислотной последовательности (например, которая показана в SEQ ID NO: 33).

Соответственно вариант FRD по изобретению предпочтительно является белком, который содержит аминокислотную последовательность идентичную по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более аминокислотной последовательности родительского варианта FRD или эталонной полипептидной последовательности, например той, которая показана в SEQ ID NO 33, и который, как правило, сохраняет по меньшей мере одну функциональную активность родительского полипептида FRD.

Вариантные полипептиды FRD по изобретению могут быть идентифицированы, например, скринингом библиотек мутантов, например мутантов с заменами подходящего эталонного полипептида. Кандидатные мутанты могут быть подвергнуты скринингу на основании их способности повышать выработку дикарбоновых кислот, такую как выработка янтарной кислоты, при экспрессии в клетке-хозяине (по сравнению с соответствующей клеткой-хозяином, экспрессирующей эталонный полипептид).

Фрагменты нуклеиновой кислоты по изобретению могут включать или состоять из последовательностей, не кодирующих функциональные полипептиды. Такие нуклеиновые кислоты могут функционировать как зонды или праймеры для реакции ПЦР.

Нуклеиновые кислоты по изобретению независимо от того, кодируют ли они функциональные или нефункциональные полипептиды, могут быть использованы в качестве зондов гибридизации или в качестве праймеров полимеразной цепной реакции (ПЦР). Применения молекул нуклеиновых кислот настоящего изобретения, которые не кодируют полипептид с активностью FRD, включают, помимо прочего, (1) гибридизацию *in situ* (например, FISH) в хромосомной метафазной пластинке для определения точной хромосомной локализации FRD-кодирующего гена, как описано в работе Verma et al., *Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press, New York (1988); (2) нозерн-блот анализ для выявления экспрессии мРНК FRD в определенных тканях и/или клетках и (3) зонды и праймеры, которые можно использовать в качестве диагностического инструмента для анализа наличия нуклеиновых кислот, способных гибридизоваться с зондом или праймером в конкретном биологическом образце (на-

пример, в ткани).

Варианты заданного эталонного фермента FRD могут быть получены с помощью следующей стандартной процедуры:

Мутагенез (сниженной точности ПЦР, использование в синтезе неравных количеств dNTP (doped oligo), использование смешанных олигонуклеотидов в синтезе (spiked oligo)) или синтез вариантов;

Трансформация, например, в *S. Cerevisiae*;

Культивирование трансформантов, селекция трансформантов;

Экспрессия, например, в *S. Cerevisiae*;

Первичный скрининг, например, на основании выработки дикарбоновой кислоты;

Идентификация улучшенного варианта (например, по измененной специфичности к кофакторам).

В одном воплощении изобретение относится к способу получения варианта полипептида FRD по изобретению, который включает:

- a) выбор эталонного полипептида FRD;
- b) замену по меньшей мере одного аминокислотного остатка, соответствующего любому из 1042, 1071, 1072, 1082 или 1083, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 33;
- c) необязательная замена одной или нескольких дополнительных аминокислот, определенных в b);
- d) получение варианта, на основании стадий a)-c);
- e) определение свойства варианта, например, изложенного в примерах; и
- f) отбор варианта со свойством, измененным при сравнении с эталонным полипептидом FRD.

В предпочтительном воплощении в способе получения варианта полипептида FRD по изобретению, эталонный полипептид FRD имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

Более предпочтительно, если в стадии b) способа по изобретению по меньшей мере один аминокислотный остаток, соответствующий любому из числа 1042, 1071, 1072, 1082 или 1083, заменен, указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 33. Эталонный полипептид может иметь по меньшей мере 80% гомологию с SEQ ID NO: 33.

В другом воплощении, изобретение описывает клетки, например трансформированные клетки-хозяева или рекомбинантные клетки-хозяева, которые содержат нуклеиновую кислоту, нуклеотидную конструкцию или вектор по изобретению. "Клетка-хозяин" или "рекомбинантная клетка" по изобретению является, как правило, клеткой в которой (или в предшественнике которой) вводится посредством методов рекомбинантных ДНК, нуклеиновая кислота по изобретению, т.е. нуклеиновая кислота, кодирующая FRD по изобретению. В контексте настоящего изобретения "клетка-хозяин" по изобретению или родитель указанной клетки-хозяина может быть клеткой-хозяином любого типа.

Клетка-хозяин по любому из предшествующих пунктов, где клетка-хозяин является эукариотической или прокариотической клеткой. Соответственно, к ним относятся как прокариотические, так и эукариотические клетки, например, бактерии, грибы, дрожжи и т.п., особенно предпочтительными являются клетки дрожжей, например, *S. cerevisiae* K. lactis. Клетки-хозяева также включают, в частности, клеточные линии млекопитающих, такие как CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38 и клеточные линии хордидного сплетения.

В изобретении, таким образом, предлагается способ получения FRD, который включает культивирование клетки-хозяина, описанной в данном документе, в условиях, подходящих для выработки FRD и, необязательно, для выделения FRD. Как правило, клетка-хозяин способна продуцировать дикарбоновую кислоту, такую как янтарная кислота.

Клетка-хозяин может быть, например, прокариотической клеткой. Предпочтительно, если прокариотическая клетка-хозяин является бактериальной клеткой. Термин "бактериальная клетка" включает как грамотрицательные, так и грамположительные микроорганизмы. Подходящими бактериями могут быть, например, те, которые принадлежат к *Mannheimia*, такие как *M. succiniciproducens*, *Actinobacillus*, такие как *A. succinogenes*, *Anaerobiospirillum*, *Bacteroides*, *Succinimonas*, *Escherichia*, такие как *E. coli*.

Клетка хозяин по изобретению может быть эукариотической клеткой-хозяином. Предпочтительно, если эукариотическая клетка является клеткой млекопитающего, растения, гриба или водоросли. Более предпочтительно эукариотическая клетка является грибной клеткой. Подходящая грибная клетка может, например, принадлежать к родам *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Candida*, *Hansenula*, *Humicola*, *Issatchenkia*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Brettanomyces*, *Rhizopus*, *Zygosaccharomyces*, *Pachysolen* или *Yamadazyma*. Грибная клетка может, например, принадлежать к видам *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia stipidis*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sonorensis*, *Candida kruisei*, *C. glabrata*, *Hansenula polymorpha*, *Issatchenkia orientalis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Rhizopus oryzae* или *Zygosaccharomyces bailii*. В одном воплощении грибная клетка в способе настоящего изобретения является дрожжами, например, принадлежащими к *Saccharomyces* sp., таким как *Saccharomyces cerevisiae*.

Примеры специфических дрожжевых клеткок-хозяев включают *C. sonorensis*, *K. marxianus*, *K. thermotolerans*, *C. methanisorbosa*, *Saccharomyces bulderi* (*S. bulderi*), *I. orientalis*, *C. lambica*, *C. sorboxylosa*, *C. zemlinina*, *C. geochares*, *P. membranifaciens*, *Z. kombuchaensis*, *C. sorbosivorans*, *C. vanderwaltii*, *C. sorbo-*

phila, *Z. bisporus*, *Z. lentus*, *Saccharomyces bayanus* (*S. bayanus*), *D. castellii*, *C. boidinii*, *C. etchellsii*, *K. lactis*, *P. jadinii*, *P. anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Pichia galeiformis*, *Pichia* sp. YB-4149 (обозначение NRRL), *Candida ethanolica*, *P. deserticola*, *P. membranifaciens*, *P. fermentans* and *Saccharomycopsis crataegensis* (*S. crataegensis*). Подходящие штаммы *K. marxianus* и *C. sonorensis* включая те, что описаны в WO 00/71738 A1, WO 02/42471 A2, WO 03/049525 A2, WO 03/102152 A2 и WO 03/102201A2. Подходящими штаммами *I. orientalis* являются штаммы ATCC 32196 и ATCC PTA-6648. В изобретении клетка-хозяин может быть Крэбтри-отрицательными как штамм дикого типа. Эффект Крэбтри определен как существование ферментативного метаболизма в аэробных условиях из-за ингибирования потребления кислорода микроорганизмом при культивировании при высокой удельной скорости роста (длительный эффект) в присутствии высоких концентраций глюкозы (краткосрочный эффект). Отрицательные фенотипы Крэбтри не демонстрируют этого эффекта, и таким образом, способны потреблять кислород даже в присутствии высоких концентраций глюкозы или высоких скоростей роста.

В дополнение к нуклеиновой кислоте, кодирующей вариантный полипептид FRD по изобретению, клетка-хозяин по изобретению может сверхэкспрессировать нуклеотидную последовательность, включающую последовательность, кодирующую одну или несколько из числа пируваткарбоксилазы, фосфоенолпируваткарбоксилазы, малатдегидрогеназы, фумаразы, изоцитратлиазы, малатсинтазы и транспортера дикарбоновых кислот. Предпочтительно, если один или несколько таких ферментов сверхэкспрессировано, то они являются активными в цитозоле.

Таким образом, клетка-хозяин по изобретению может сверхэкспрессировать подходящую гомологичную или гетерологичную нуклеотидную последовательность, которая кодирует эндогенный и/или гетерогенный фермент, который катализирует реакцию в клетке, приводящую к увеличенному потоку к дикарбоновой кислоте, такой как яблочная кислота, фумаровая кислота и/или янтарная кислота.

Клетка-хозяин по изобретению может сверхэкспрессировать эндогенную или гетерогенную нуклеотидную последовательность, как описано ниже в данном документе.

Клетка-хозяин может сверхэкспрессировать пируваткарбоксилазу (PYC), которая катализирует реакцию из пирувата в оксалоацетат (EC 6.4.1.1). Пируваткарбоксилаза может, например, быть активной в цитозоле, при экспрессии гена. Клетка-хозяин может сверхэкспрессировать эндогенную или гетерогенную пируваткарбоксилазу является сверхэкспрессированной.

Предпочтительно, если клетка-хозяин по изобретению экспрессирует в цитозоле нуклеотидную последовательность, кодирующую фосфоенолпируват (PEP) карбоксикиназу. Предпочтительно, если нуклеотидная последовательность, кодирующая фосфоенолпируват (PEP) карбоксикиназу, является сверхэкспрессированной. PEP-карбоксикиназа (EC 4.1.1.49) предпочтительно является гетерологичным ферментом, предпочтительно полученным из бактерий, более предпочтительно фермент, имеющий активность PEP-карбоксикиназы получен из *Escherichia coli*, *Mannheimia* sp., *Actinobacillus* sp., или *Anaerobiospirillum* sp., более предпочтительно из *Mannheimia succiniciproducens*. Ген, кодирующий PEP-карбоксикиназу, может быть сверхэкспрессирован и может быть экспрессирован и быть активным в цитозоле грибной клетки. Предпочтительно, если дрожжевая клетка по настоящему изобретению генетически модифицирована PEP-карбоксикиназой, которая имеет, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.

В другом воплощении клетка-хозяин по изобретению сверхэкспрессирует пируваткарбоксилазу (PYC), которая катализирует реакцию из пирувата в оксалоацетат (EC 6.4.1.1). Предпочтительно пируваткарбоксилаза является активной в цитозоле при экспрессии гена. Предпочтительно, если сверхэкспрессирована эндогенная или гомологичная пируваткарбоксилаза. Предпочтительно, клетка-хозяин по настоящему изобретению генетически модифицирована пируваткарбоксилазой, которая имеет, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2.

В одном воплощении клетка-хозяин модифицируется нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, кодирующую активность малатдегидрогеназы (MDH) в цитозоле при экспрессии нуклеиновой кислоты. Цитозольная экспрессия может быть получена делецией пероксисомального сигнала нацеливания. Малатдегидрогеназа может быть сверхэкспрессирована. Цитозольная MDH может быть подходящей гомологичной или гетерологичной малатдегидрогеназой, катализирующей реакцию из оксалоацетата в малат (EC 1.1.1.37), например, полученной из *S. cerevisiae*.

Предпочтительно, если MDH является MDH3 из *S. cerevisiae*, более предпочтительно, MDH, которая имеет С-концевую делецию SKL, так чтобы она была активна в цитозоле. Предпочтительно, если клетка-хозяин по настоящему изобретению включает нуклеотидную последовательность, кодирующую малатдегидрогеназу, которая имеет по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4.

В другом воплощении клетка-хозяин по настоящему описанию модифицирована с помощью гена, кодирующего фумаразу, которая катализирует реакцию из яблочной кислоты в фумаровую кислоту (EC 4.2.1.2). Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую фумаразу, может быть

получена из любого подходящего источника, предпочтительно микробного происхождения, например, дрожжей, таких как *Saccharomyces* или мицелиального гриба, такого как *Rhizopus oryzae*, или бактерий, таких как *Escherichia coli*. Клетка-хозяин настоящего изобретения может сверхэкспрессировать нуклеотидную последовательность, кодирующую фумаразу. Фумараза может быть активной в цитозоле при экспрессии нуклеотидной последовательности, например, с делецией пероксисомального нацеливающего сигнала.

Предпочтительно, если клетка-хозяин по настоящему изобретению включает нуклеотидную последовательность, кодирующую фумаразу, которая имеет по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 6.

Клетка-хозяин по изобретению может экспрессировать нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-транспортер дикарбоновых кислот, предпочтительно белок-транспортер яблочной кислоты (MAE) в цитозоль. Предпочтительно, если белок-транспортер дикарбоновой кислоты является сверхэкспрессированным. Белок-транспортер дикарбоновой кислоты может быть любым подходящим гомологичным или гетерологичным белком. Предпочтительно, если белок-транспортер дикарбоновой кислоты является гетерологичным белком. Белок-транспортер дикарбоновых кислот может быть получен из любого подходящего организма, предпочтительно из дрожжей или грибов, таких как *Schizosaccharomyces pombe* или *Aspergillus niger*. Предпочтительно белок-транспортер дикарбоновых кислот является белком-транспортером яблочной кислоты (MAE), которая имеет, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95 или 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5.

Клетка-хозяин по изобретению может сверхэкспрессировать нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую изоцитратлиазу (EC 4.1.3.1), которая может быть любым подходящим гетерологичным или гомологичным ферментом. Изоцитратлиаза может, например, быть получена из *Kluyveromyces lactis* или *Escherichia coli*.

Генетически модифицированная грибная клетка может дополнительно сверхэкспрессировать нуклеотидную последовательность, кодирующую малатсинтазу (EC 2.3.3.9). Малатсинтаза может быть сверхэкспрессирована и/или активна в цитозоле, например, путем делеции пероксисомального сигнала нацеливания. На деле малатсинтаза представляет собой *S. cerevisiae* малатсинтазу, например, нативную малатсинтазу, измененную делецией С-концевой последовательности SKL.

В другом воплощении клетка-хозяин по изобретению может включать разрушение гена, кодирующего фермент пути ферментации этанола. Ген, кодирующий фермент пути ферментации этанола может быть пируватдекарбоксилазой (EC 4.1.1.1), катализирующей реакцию из пирувата в ацетальдегид, или алкогольдегидрогеназой (EC 1.1.1.1), катализирующей реакцию из ацетальдегида в этанол. Предпочтительно, если клетка-хозяин по изобретению включает разрушение одного, двух или большего количества генов, кодирующих алкогольдегидрогеназу. На деле грибная клетка представляет собой дрожжи, например, *S. cerevisiae*, дрожжи предпочтительно включают разрушение одного или нескольких генов алкогольдегидрогеназы (*adh1*, *adh2*, *adh3*, *adh4*, *adh5*).

В ином случае или в качестве дополнения, клетка-хозяин по изобретению может включать по меньшей мере один ген, кодирующий глицерин-3-фосфат-дегидрогеназу, которая не является функциональной. Ген глицерин-3-фосфат-дегидрогеназы, который не является функциональным, используется в данном документе для описания эукариотической клетки, которая имеет пониженную активность глицерин-3-фосфат-дегидрогеназы, например, из-за мутации, разрушения или делеции гена, кодирующего глицерин-3-фосфат-дегидрогеназу, что приводит к снижению образования глицерина по сравнению с клеткой дикого типа.

Цитозольная экспрессия может быть получена делецией пероксисомального или митохондриального сигнала нацеливания. Наличие пероксисомального или митохондриального сигнала может быть, например, определено способом, описанным Schlüter et al., Nucleic Acid Research 2007, 35, D815-D822.

При использовании в данном документе, генетически модифицированные дрожжи по настоящему изобретению определяются как клетки, которые содержат, или трансформированы или генетическим модифицированы нуклеотидной последовательностью или полипептидом, который содержит дополнительную копию или дополнительные копии эндогенной нуклеотидной последовательности, или содержит делецию или разрушение эндогенной или гомологичной нуклеотидной последовательности. Эукариотическая клетка дикого типа определяется в данном документе как родительская клетка рекомбинантной клетки.

При использовании в данном документе, термины "ген" и "рекомбинантный ген" относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые включают открытую рамку считывания, кодирующую вариант FRD или другой фермент, описанные в данном документе. Ген может включать кодирующие последовательности, не кодирующие последовательности, интроны и регуляторные последовательности. Иначе говоря, "ген", при использовании в данном документе, может относиться к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, определенной в данном документе. Соответственно, термин "ген", в контексте настоящей заявки, относится не только к природным последовательностям.

Термин "эндогенный", если используется для указания взаимоотношения между данной (рекомбинантной) нуклеиновой кислотой или полипептидной молекулой и данным организмом-хозяином или клеткой-хозяином, следует понимать как означающий, что по природе нуклеиновая кислота или полипептидная молекула продуцируется клеткой-хозяином или организмом того же вида, предпочтительно той же разновидности или штамма.

Термин "гетерологичный" если используется по отношению к нуклеиновой кислоте (ДНК или РНК) или белку относится к нуклеиновой кислоте или белку которые не существуют в природе как часть организма, клетки, генома или последовательности ДНК или РНК в которой они присутствуют, или который обнаруживается в клетке или месте или местах в геноме или в последовательности ДНК или РНК, которая отличается от той в которой они находятся в природе. Гетерологичные нуклеиновые кислоты или белки не являются эндогенным по отношению к клетке, в которую они вводятся, а получаются из другой клетки или продуцируются синтетически или рекомбинантно.

Изобретение относится к способу получения дикарбоновой кислоты. Термины "дикарбоновая кислота" и "дикарбоксилат", такие как "янтарная кислота" и "сукцинат", имеют одинаковое значение в данном документе и используются взаимозаменяемо, первая является гидрированной формой последнего.

Согласно изобретению предлагается способ получения дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота, который включает ферментацию клетки-хозяина по изобретению в условиях, подходящих для выработки дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота, и необязательно, извлечение дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота.

В способе клетка-хозяин ферментируется в сосуде, включающем подходящую ферментационную среду. Термин ферментирование, ферментация или ферментированный и т.п., при использовании в данном документе, относятся к микробной выработке соединений, в данном документе дикарбоновых кислот из углеводов.

Предпочтительно продукт ферментации представляет собой дикарбоновую кислоту, предпочтительно яблочную кислоту, фумаровую кислоту или янтарную кислоту или адипиновую кислоту, предпочтительно янтарную кислоту.

Периодическая ферментация определяется в данном документе как ферментация, при которой все питательные вещества добавляются в начале ферментации.

Периодическая ферментация с подпиткой является периодической ферментацией, в которой питательные вещества добавляются в ходе ферментации. Продукты при периодической ферментации и периодической ферментации с подкормкой могут быть собраны в подходящий момент, например, когда один или несколько питательных веществ истощены.

Непрерывная ферментация является ферментацией, при которой питательные вещества непрерывно добавляются в ферментацию и в которой продукты непрерывно удаляются из ферментации.

В одном воплощении ферментация клетки-хозяина в способе изобретения проводится в условиях с ограничением углеводов. При использовании в данном документе, условия с ограничением углеводов определены как поддерживающие концентрацию углеводов ниже 10 г/л, например около 5 г/л.

Способ выработки дикарбоновой кислоты по настоящему изобретению может быть проведен в любом подходящем объеме и масштабе, предпочтительно в промышленном масштабе. Промышленный масштаб определяется в данном документе как объем, по меньшей мере 10 или 100 л, предпочтительно по меньшей мере 1 м³, предпочтительно по меньшей мере 10 или 100 м³, предпочтительно по меньшей мере 1000 м³, как правило, меньше 10 000 м³.

Ферментация клетки-хозяина в способе изобретения может быть проведена в любой подходящей среде для ферментации, включающей подходящий источник азота, углевода и других питательных веществ, необходимых для роста и выработки дикарбоновой кислоты в способе изобретения. Подходящий углевод в способе ферментации по изобретению может быть глюкозой, галактозой, ксилозой, арабинозой, сахарозой или мальтозой.

В одном воплощении способ ферментации проводится в условиях парциального давления CO₂ от 5 до 60%, предпочтительно около 50%.

pH способа получения дикарбоновой кислоты, как правило, понижается по мере выработки дикарбоновой кислоты. Предпочтительно, если pH в способе получения дикарбоновой кислоты находится в диапазоне от 1 до 5, предпочтительно от 1,5 до 4,5, более предпочтительно от 2 до 4.

В другом предпочтительном воплощении способ по настоящему изобретению включает стадию предварительного культивирования клетки-хозяина в аэробных условиях в присутствии углевода. Предпочтительно, если ферментация клетки-хозяина в ходе предварительного культивирования проводится при pH от 4 до 6. Предпочтительно углеводы в ходе предварительного культивирования являются нерепрессирующими углеводами, предпочтительно галактозой. Было обнаружено преимущество предварительного культивирования клеток-хозяев на нерепрессирующем углеводе, поскольку это предотвращает репрессию глюкозой, которая оказывает отрицательное воздействие на количество выработанной биомассы. Кроме того, было обнаружено, что стадия предварительного культивирования клеток-хозяев в аэробных условиях дает более высокий выход биомассы и более быстрый рост. Предпочтительно, если предварительное культивирование проводится в периодическом режиме.

Как правило, проводится стадия размножения для выработки увеличенного количества биомассы, предпочтительно в условиях ограничения углеводов.

Способ получения дикарбоновой кислоты может быть проведен при любой подходящей температуре. Подходящая температура может составлять, например, от около 10 до около 40°C, например, от около 15 до около 30°C.

Способ получения дикарбоновой кислоты может дополнительно включать выделение дикарбоновой кислоты. Выделение дикарбоновой кислоты может быть проведено любым подходящим способом.

В одном воплощении дикарбоновая кислота, которую получают способом, описанным в данном документе, извлекают из ферментационной среды. Высвобождение дикарбоновой кислоты может быть проведено с помощью подходящего способа, известного в данной области, например, кристаллизацией, осаждением с аммонием, ионообменной технологией, центрифугированием или фильтрацией или любой подходящей комбинацией этих способов.

В предпочтительном воплощении извлечение дикарбоновой кислоты включает кристаллизацию дикарбоновой кислоты и образование кристаллов дикарбоновой кислоты. Предпочтительно, если кристаллизация дикарбоновой кислоты включает удаление части ферментационной среды, предпочтительно выпариванием, для получения концентрированной среды.

Согласно настоящему изобретению, дикарбоновая кислота, такая как янтарная кислота, может быть выделена кристаллизацией дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота, из водного раствора, имеющего pH от 1 до 5, и содержащего янтарную кислоту, включающего удаление части водного раствора выпариванием для получения концентрированного раствора, понижение температуры концентрированного раствора до значения от 5 до 35°C, при котором образуются кристаллы янтарной кислоты. Предпочтительно, если кристаллизация включает приведение температуры концентрированной среды к температуре от 10 до 30°C, предпочтительно от 15 до 25°C. Предпочтительно, если ферментационная среда имеет pH от 1,5 до 4,5, предпочтительно - от 2 до 4.

Было обнаружено, что кристаллизация дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота, при более высоких температурах, например, от 10 до 30°C дает кристаллы кислоты, например янтарной кислоты, с малым количеством примесей, таких как органическая кислота, белок, цвет и/или запах, по сравнению с кристаллами дикарбоновой кислоты, такой как янтарной кислоты, которые были кристаллизованы при более низкой температуре ниже 10°.

Другое преимущество кристаллизации янтарной кислоты при более высокой температуре заключается в том, что требуется меньшее количество энергии для охлаждения водного раствора по сравнению со способом, в котором кристаллизация дикарбоновой кислоты проводится ниже 10 или 5°C, что дает более экономичный или сбалансированный способ.

Предпочтительно, если кристаллизация дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота, включает стадию отмывки кристаллов дикарбоновой кислоты. Дикарбоновая кислота, такая как янтарная кислота, может быть кристаллизована напрямую из ферментационной среды, имеющей pH от 1 до 5, до чистоты по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, 96, 97 или по меньшей мере 98%, или 99-100% мас./мас.

Предпочтительно, если извлечение дикарбоновой кислоты, предпочтительно янтарной кислоты, включает удаление биомассы из ферментационной среды и кристаллизацию дикарбоновой кислоты, предпочтительно кристаллизацию, которая описана в данном документе выше. Предпочтительно, если удаление биомассы проводят фильтрацией.

В предпочтительном воплощении способ выработки дикарбоновой кислоты дополнительно включает применение дикарбоновой кислоты в промышленном способе. Промышленный способ для дикарбоновой кислоты может быть применением в качестве косметической добавки, антиобледеителя, пищевой добавки или строительного блока для (био)полимеров.

В предпочтительном воплощении ферментационная среда включает количество янтарной кислоты от 1 до 150 г/л, предпочтительно от 5 до 100 г/л, более предпочтительно от 10 до 80 г/л, или от 15 до 60 г/л янтарной кислоты. В любом случае клетка-хозяин по изобретению, как правило, будет способна аккумулировать больше янтарной кислоты в ферментационной среде по сравнению с эквивалентной клеткой-хозяином, которая экспрессирует эталонный полипептид.

В другом аспекте настоящего изобретения изобретение относится к способу кристаллизации янтарной кислоты из водного раствора, имеющего pH от 1 до 5 и содержащего янтарную кислоту, включающего удаление части водного раствора выпариванием для получения концентрированного раствора, понижение температуры концентрированного раствора до значения от 10 до 30°C, при котором образуются кристаллы янтарной кислоты. Предпочтительно, если кристаллизация включает приведение температуры концентрированного раствора к температуре от 15 до 25°C, предпочтительно от 18 до 22°C. Предпочтительно, если водный раствор имеет pH от 1,5 до 4,5, предпочтительно от 2 до 4. Водный раствор может быть любым подходящим раствором, включающим янтарную кислоту. Водный раствор может включать растворимые составляющие и нерастворимые составляющие и, например (фрагменты) микробные клетки, белки, лигноцеллюлозу растительной биомассы, целлюлозу и т.п. Предпочтительно, если водный

раствор является ферментационной средой, предпочтительно, если ферментационная среда получена способом выработки дикарбоновой кислоты, который описан в данном документе.

Предпочтительно, если дикарбоновая кислота, такая как янтарная кислота, полученная способом по настоящему изобретению, дополнительно преобразуется в искомый продукт. Искомый продукт может быть, например, полимером, таким как полибутилен сукцинат (PBS), противообледенитель или поверхностно-активное вещество. Иначе говоря, в изобретении предлагается способ получения продукта, например полимера, такого как полибутилен сукцинат (PBS), противообледенитель или поверхностно-активное вещество, который включает получение карбоновой кислоты, как описано в данном документе; и применение указанной дикарбоновой кислоты при получении указанного продукта.

Для цели данного изобретения термин определяется в данном документе в целях определения процента гомологии двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот, последовательности выравниваются в целях оптимального сравнения. В целях оптимизации выравнивания между двумя последовательностями в любую из двух сравниваемых последовательностей могут быть внесены разрывы. Такое выравнивание может быть проведено по всей длине сравниваемых последовательностей. В ином случае, выравнивание может быть проведено на более коротком участке, например, длиной около 20, около 50, около 100 или более остатков нуклеиновых кислот или аминокислот. Идентичность является процентом полных совпадений между двумя последовательностями по всей представленной выровненной области.

Стандартные генетические методы, такие как сверхэкспрессия ферментов в клетках-хозяевах, генетическая модификация клеток-хозяев, или методы гибридизации, хорошо известны в данной области техники, и, например, описаны в Sambrook and Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, or F. Ausubel et al., eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987). Способы трансформации и генетической модификации грибных клеток-хозяев известны, например, из EP-A-0635574, WO 98/46772, WO 99/60102 и WO 00/37671, WO90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635574 и US 6265186.

Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть осуществлено с помощью математических алгоритмов. Специалистам известно, что для выравнивания двух последовательностей и определения гомологии между двумя последовательностями доступны несколько различных компьютерных программ (Kruskal J. B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, pp. 1-44 Addison Wesley). Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша для сравнения двух последовательностей. (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Как аминокислотные, так и нуклеотидные последовательности могут быть выровнены алгоритмом. Алгоритм Нидлмана-Вунша был реализован в компьютерной программе "NEEDLE". Для цели настоящего изобретения была использована программа "NEEDLE" из пакета "EMBOSS" (версия 2.8.0 или выше, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp.276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Для белковых последовательностей в качестве подстановочной матрицы использовалась EBLOSUM62. Для нуклеотидной последовательности использовалась EDNAFULL. Используемыми дополнительными параметрами являются штраф за открытие делеции равный 10 и штраф за продолжение делеции равный 0,5. Специалистам понятно, что все эти различные параметры дадут несколько различающиеся результаты, но общий процент идентичности двух последовательностей при использовании различных алгоритмов значительно не изменится.

После описанного выше выравнивания программой "NEEDLE" процент идентичности между последовательностью запроса и последовательностью изобретения подсчитывается следующим образом: Количество соответствующих положений в выравнивании, показывающее совпадающие аминокислоты или нуклеотиды в обеих последовательностях, делится на общую длину выравнивания после вычитания общего количества разрывов в выравнивании. Определенная в данном документе идентичность может быть получена "NEEDLE" с помощью опции "NOBRIEF" и отмечается в выходных данных программы как "longest-identity" (идентичность на участке с наибольшей длиной).

Последовательности нуклеиновых кислот и белков настоящего изобретения могут дополнительно использоваться в качестве "последовательности запроса" для осуществления поиска в публичных базах данных, например, для выявления других членов семейства или родственных последовательностей. Такие поиски могут быть осуществлены с помощью программ "NBLAST" и "XBLAST" (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Нуклеотидный поиск "BLAST" может быть осуществлен с помощью программы "NBLAST" (сумма баллов = 100, размера "слова" = 12) для получения нуклеотидных последовательностей гомологичных молекулам нуклеиновых кислот по изобретению. Белковый поиск "Blast" может быть осуществлен с помощью программы "XBLAST" (сумма баллов = 50, размер "слова" = 3) для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам по изобретению. Для осуществления выравнивания, содержащего разрывы, для целей сравнения, может

использоваться "Gapped BLAST", описанный в работе Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402. При использовании программ "BLAST" и "Gapped BLAST" могут использоваться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, "XBLAST" и "NBLAST"). См. домашнюю страницу Национального Центра Биотехнологической Информации по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

В данном документе ссылка на патентный документ или другой материал, которые приведены в качестве предшествующего уровня техники, не следует понимать как признание того, что документ или материал был известен или что информация, которую они содержат, была частью общедоступных знаний на момент даты приоритета любого из пунктов формулы изобретения.

Описание каждой ссылки, представленной в данном документе, включено сюда ссылкой в полном объеме.

Изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами:

Примеры

Пример 1. Конструирование штамма SUC-1099

Получение ПЦР-фрагментов

Фрагмент ПЦР получали с помощью полимеразы "Phusion® DNA polymerase" (New England Biolabs, США), согласно инструкциям производителя.

Последовательности праймеров, приведенные в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, были использованы для получения ПЦР-фрагмента 1, состоящего из 5' INT59 участка интеграции, с помощью геномной ДНК штамма *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D (MATa HIS3 LEU2 TRP1 MAL2-8 SUC2), описанного Daran-Lapujade et al., (*TEMS Yeast Res* (2003) 4: 285-296) в качестве матрицы.

ПЦР-фрагмент 2 получали с помощью последовательностей праймеров, приведенных в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, с использованием SEQ ID NO: 1 в качестве матрицы. SEQ ID NO: 1 кодирует фосфоенолпируват-карбоксикиназу (PCKa) из *Actinobacillus succinogenes*, как описано в родительской заявке WO 2009/065780. Эта синтетическая последовательность, которая включает последовательность промотор-ген-терминатор, включая соответствующие участки рестрикции, была синтезирована с помощью DNA 2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США). Генная последовательность была оптимизирована по кодоновым парам для экспрессии в *S. cerevisiae*, как раскрыто в родительской заявке WO 2008/000632. Синтетический ген находится под контролем (или функционально связан) промотора из *S. cerevisiae*, т.е. TPI1-промотор контролирует экспрессию PCKa-гена. Точная терминация контролируется последовательностью терминатора из *S. cerevisiae*, т.е. GND2-терминатором.

ПЦР-фрагмент 3 получали с помощью последовательностей праймеров, приведенных в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, с использованием SEQ ID NO: 2 в качестве матрицы. SEQ ID NO: 2 кодирует пируваткарбоксилазу (PYC2) из *Saccharomyces cerevisiae*, как описано в родительской заявке WO 2009/065780. Эта синтетическая последовательность, которая включает последовательность промотор-ген-терминатор, включая соответствующие участки рестрикции, была синтезирована с помощью DNA 2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США). Генная последовательность была оптимизирована по кодоновым парам для экспрессии в *S. cerevisiae*, как раскрыто в родительской заявке WO 2008/000632. Синтетический ген находится под контролем (или функционально связан) промотора из *S. cerevisiae*, т.е. PGK1-промотор контролирует экспрессию PYC2-гена. Точная терминация контролируется последовательностью терминатора из *S. cerevisiae*, т.е. ADH1-терминатором.

ПЦР-фрагмент 4 получали с помощью последовательностей праймеров, приведенных в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, с использованием SEQ ID NO: 3 в качестве матрицы. SEQ ID NO: 3 кодирует селективный маркер KanMX, функциональный в *Saccharomyces cerevisiae*, который был амплифицирован из плазмиды pUG7-EcoRV. pUG7-EcoRV является вариантом плазмиды pUG6, описанной Gueldener et al., (*Nucleic Acids Res.* 1996 Jul 1;24(13):2519-24), в котором сайты loxP, присутствующие в pUG6, были заменены на участки lox66 и lox71 (Lambert et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 2007 Feb;73(4):1126-35. Epub 2006 Dec 1.)

ПЦР-фрагмент 5 получали с помощью последовательностей праймеров, приведенных в SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, с использованием SEQ ID NO: 4 в качестве матрицы. SEQ ID NO: 4 кодирует предполагаемый транспортер дикарбоновых кислот из *Aspergillus niger*, как описано в EP 2495304. Эта синтетическая последовательность, которая включает последовательность промотор-ген-терминатор, включая соответствующие участки рестрикции, была синтезирована с помощью DNA 2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США). Генная последовательность была оптимизирована по кодоновым парам для экспрессии в *S. cerevisiae*, как раскрыто в родительской заявке WO2008/000632. Синтетический ген находится под контролем (или функционально связан) промотора из *S. cerevisiae*, т.е. ENO1-промотор контролирует экспрессию DCT_02-гена. Точная терминация контролируется последовательностью терминатора из *S. cerevisiae*, т.е. TEF2-терминатором.

ПЦР-фрагмент 6 получали с помощью последовательностей праймеров, приведенных в SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, с использованием SEQ ID NO: 5 в качестве матрицы. SEQ ID NO: 5 кодирует малатдегидрогеназу (MDH3) из *Saccharomyces cerevisiae*, как описано в родительской заявке WO 2009/065778. Эта синтетическая последовательность, которая включает последовательность промотор-ген-терминатор, включая соответствующие участки рестрикции, была синтезирована с помощью DNA 2.0 (Менло-Парк,

Калифорния, США). Генная последовательность была оптимизирована по кодоновым парам для экспрессии в *S. cerevisiae*, как раскрыто в родительской заявке WO2008/000632. Синтетический ген находится под контролем (или функционально связан) промотора из *S. cerevisiae*, т.е. FBA1-промотор контролирует экспрессию MDH3-гена. Точная терминация контролируется последовательностью терминатора из *S. cerevisiae*, т.е. GPM1-терминатором.

ПЦР-фрагмент 7 получали с помощью последовательностей праймеров, приведенных в SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, с использованием SEQ ID NO: 6 в качестве матрицы. SEQ ID NO: 6 кодирует фумаразу (*fumB*) из *Escherichia coli* (E.C. 4.2.1.2, учетный номер UniProt: P14407). Генная последовательность была оптимизирована по кодоновым парам для экспрессии в *S. cerevisiae*, как раскрыто в родительской заявке WO 2008/000632. Эта синтетическая последовательность, которая включает последовательность промотор-ген-терминатор, включая соответствующие участки рестрикции, была синтезирована с помощью DNA 2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США). Синтетический ген находится под контролем (или функционально связан) промотора из *Kluyveromyces lactis*, т.е. промотор глицеральдегид 3-фосфат-дегидрогеназы контролирует экспрессию гена *fumB*. Точная терминация контролируется последовательностью терминатора из *S. cerevisiae*, т.е. TDH1-терминатором.

Последовательности праймеров, приведенные в SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, были использованы для получения ПЦР-фрагмента 8, состоящего из 3' участка интеграции INT59, с помощью геномной ДНК штамма CEN.PK 113-7D в качестве матрицы.

ПЦР-фрагменты 1-8 очищали с помощью набора DNA Clean & Concentrator™-25 (Zymo Research, Ирвин, Калифорния, США) согласно инструкциям производителя.

Трансформация в CEN.PK113-7D для получения штамма-SUC-1099

Трансформация дрожжей была проведена способом, который известен специалистам в данной области. Штамм *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D трансформировали с помощью очищенных фрагментов 1-8. ПЦР-фрагменты 2 и 7 содержат перекрытия на их 5' и 3'-концах, а ПЦР-фрагменты 1 и 8 на их 3' и 5' концах соответственно, так что это делает возможной гомологичную рекомбинацию всех восьми ПЦР-фрагментов. 5'-конец ПЦР-фрагмента 1 и 3'-конец ПЦР-фрагмента 8 гомологичными локусу INT59 что позволяет осуществить интеграцию всех восьми ПЦР-фрагментов в локусе INT59 (см. фиг. 1). Это дает один линейный фрагмент, включающий ПЦР-фрагменты 1-8, интегрированные в локус INT59. Этот способ интеграции описан в патентной заявке WO 2013076280. Локус INT59 расположен на хромосоме XI, на 923 п.о. ниже YKR092C, и на 922 п.о. выше YKR093W.

Трансформационные смеси помещали на YEPH-агар (на литр: 10 грамм дрожжевого экстракта, 20 г PhytonePeptone, 20 г галактозы, 20 г агара), содержащий 100 мкг G418 (Sigma Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды) на мл. Через три дня роста при 30°C, индивидуальные трансформанты повторно рассеивали штрихом на планшеты с YEPH-агаром, содержащим 20 г галактозы на литр и 100 мкг G418 на мл. Присутствие введенных генов было подтверждено с помощью ПЦР с использованием последовательностей праймеров, которые могут отжигаться на кодирующих последовательностях ORF, кодируемых SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6. Полученный штамм назвали SUC-1099.

Пример 2. Трансформация фумаратредуктазы в штамм SUC-1099 и выработка янтарной кислоты в полученных трансформантах

Получение ПЦР-фрагментов

Фрагмент ПЦР получали с помощью полимеразы "Phusion® DNA polymerase" (New England Biolabs, США), согласно инструкциям производителя.

Последовательности праймеров, приведенные в SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, использовали для получения ПЦР-фрагмента 9, состоящего из 5' участка интеграции INT1, с помощью геномной ДНК штамма CEN.PK 113-7D в качестве матрицы.

ПЦР-фрагмент 10 получали с помощью последовательностей праймеров, приведенных в SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, с использованием SEQ ID NO: 7 в качестве матрицы. SEQ ID NO: 7 кодирует селективный маркер ноурсетрицина функциональный в *Saccharomyces cerevisiae*, который был амплифицирован из модифицированной версии плазмиды pUG7-Nat. pUG7-Nat является вариантом плазмиды pUG6, описанной Gueldener et al., (Nucleic Acids Res. 1996 Jul 1; 24(13):2519-24), в котором сайты loxP, присутствующие в pUG6, были заменены на участки lox66 и lox71 (Lambert et al., Appl. Environ. Microbiol. 2007 Feb; 73(4): 1126-35. Epub 2006 Dec 1) и в котором маркер KanMX был заменен на маркер к ноурсетрицину (Goldstein and McCusker, Yeast. 1999 Oct; 15(14):1541-53).

ПЦР-фрагмент 11 получали с помощью последовательностей праймеров, приведенных в SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32, с использованием SEQ ID NO: 8 в качестве матрицы. SEQ ID NO: 8 кодирует фумаратредуктазы (FRDg) из *Trypanosoma brucei*, как описано в родительской заявке WO 2009/065778. Эта синтетическая последовательность, которая включает последовательность промотор-ген-терминатор, включая соответствующие участки рестрикции, была синтезирована с помощью DNA 2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США). Генная последовательность была оптимизирована по кодоновым парам для экспрессии в *S. cerevisiae*, как раскрыто в родительской заявке WO 2008/000632. Синтетический ген находится под контролем (или функционально связан) промотора из *S. cerevisiae*, т.е. TDH3-промотор контролирует

экспрессию гена FRDg. Точная терминация контролируется последовательностью терминатора из *S. cerevisiae*, т.е. TAL1-терминатором.

Последовательности праймеров, приведенные в SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, были использованы для получения ПЦР-фрагмента 12, состоящего из 3' участка интеграции INT1, с помощью геномной ДНК штамма CEN.PK 113-7D в качестве матрицы.

ПЦР-фрагменты 9-12 очищали с помощью набора DNA Clean & Concentrator™-25 (Zymo Research, Ирвин, Калифорния, США) согласно инструкциям производителя.

Трансформация SUC-1099

Трансформация дрожжей была проведена способом, известным специалистам в данной области. Штамм *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D трансформировали с помощью очищенных фрагментов 9-12. ПЦР-фрагменты 10 и 11 содержат перекрытия на их 5' и 3'-концах, а ПЦР-фрагменты 9 и 12 содержат перекрытия на их 3' и 5' концах соответственно, так что это делает возможной гомологичную рекомбинацию всех четырех ПЦР-фрагментов. 5'-конец ПЦР-фрагмента 9 и 3'-конец ПЦР-фрагмента 12 были гомологичными к локусу INT1 что позволяет осуществить интеграцию всех четырех ПЦР-фрагментов в локусе INT1 (см. фиг. 2). Это дает один линейный фрагмент, включающий ПЦР-фрагменты 9-12, интегрированные в локус INT1. Этот способ интеграции описан в родительской заявке WO 2013076280. Локус INT1 расположен на хромосоме XV, на 659 п.о. ниже YOR071c, и на 998 п.о. выше YOR070c. Этот подход дает экспрессию белка фумаратредуктазы длиной 1139 аминокислот, как указано в SEQ ID NO: 33, утратившего С-концевые аминокислоты SKI, по сравнению с нативной последовательностью из *T. brucei*.

Трансформационные смеси были помещены на YEPH-агар (на литр: 10 г дрожжевого экстракта, 20 г PhytonePeptone, 20 г галактозы, 20 г агара), содержащего 100 мкг ноурсетрицина (Jena Bioscience, Германия) на мл. Через три дня роста при 30°C, индивидуальные трансформанты повторно рассеивали штрихом на планшеты с YEPH-агаром, содержащим 20 г галактозы на литр и 100 мкг ноурсетрицина на мл. Присутствие введенных генов было подтверждено с помощью ПЦР с использованием последовательностей праймеров, которые могут отжигаться на кодирующих последовательностях ORF, кодируемых SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8. Три полученные индивидуальные колонии были названы PS107#1_#02, PS107#1_#03 и PS107#1_#04.

Получение янтарной кислоты

Для определения выработки янтарной кислоты штамм SUC-1099 выращивали в трех повторах и трансформанты PS107#1_#02, PS107#1_#03 и PS107#1_#04 выращивали в титровальных микропланшетах с использованием галактозы в качестве источника углерода. После фазы роста для получения биомассы, начинали эксперимент по продуцированию путем ресуспендирования клеток в среде для культивирования. 30 г/л янтарной кислоты вносили в среду для культивирования в начале эксперимента по продуцированию. Образцы надосадочной жидкости забирали после 96 ч культивирования.

Образцы для проточного ЯМР получали следующим образом: Из каждой лунки 600 мкл культуры забирали и центрифугировали в течение 1 мин при 14000 об./мин. 50 мкл надосадочной жидкости переносили в 96-луночные МТР-планшеты с глубокими лунками. 450 мкл внутреннего стандарта (20 г/л малеиновой кислоты, 40 г/л EDTA в D2O) и 500 мкл 80:20 H₂O/D₂O добавляли в каждый образец. Дикарбоновую кислоту, включая концентрации янтарной кислоты и других соединений, таких как глюкоза в ферментационной надосадочной жидкости, определяли с помощью спектрометра Bruker BEST avance II 500 MHz. Спектры ЯМР записывали с помощью импульсного метода с подавлением сигнала воды при 27°C с релаксационной задержкой 30 с.

В надосадочной жидкости SUC-1099 был измерен средний титр янтарной кислоты 30,9 г/л. Когда FRDg был введен и сверхэкспрессирован в SUC-1099, измеренный средний титр составил 54,5 г/л янтарной кислоты.

Пример 3. Трансформация вариантов фумаратредуктазы в штамм SUC-1099 и выработка янтарной кислоты в полученных трансформантах

Получение ПЦР-фрагментов

ПЦР-фрагменты 9, 10 и 12 были получены, как описано в примере 2.

Синтетическая последовательность, кодирующая различные белковые варианты последовательности эталонной фумаратредуктазы, которая описана SEQ ID NO: 33, были синтезированы с помощью DNA 2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США). Синтетические нуклеотидные последовательности кодируют мутированную аминокислоту относительно эталонной последовательности FRDg (SEQ ID NO: 33) в положениях, указанных в табл. 2. За исключением кодируемого указанными мутантными аминокислотами в табл. 2, варианты синтетической нуклеотидной последовательности идентичны SEQ ID NO: 8. Синтетический ген находится под контролем (или функционально связан) промотора из *S. cerevisiae*, т.е. TDH3-промотор контролирует экспрессию мутированного гена FRD (FCC). Точная терминация контролируется последовательностью терминатора из *S. cerevisiae*, т.е. TAL1-терминатором.

Последовательности синтетического гена, содержащие помимо прочего TDH3-промотор - мутированная FRD - TAL1-терминатор, были амплифицированы ПЦР с помощью праймеров SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32, для получения ПЦР-фрагментов с 13 по 22 (см. табл. 2).

ПЦР-фрагменты 9, 10, 12 и 13-22 очищали с помощью набора DNA Clean & Concentrator™-25 (Zymo Research, Ирвин, Калифорния, США) согласно инструкциям производителя.

Трансформация SUC-1099

Штамм SUC-1099 трансформировали с помощью очищенных ПЦР-фрагментов 9, 10 и 12 в комбинации с ПЦР-фрагментами 13-22 по отдельности. ПЦР-фрагменты 10 и ПЦР-фрагменты 13-22 содержат перекрытия на их 5' и 3'-концах, а ПЦР-фрагменты 9 и 12 содержат перекрытия на их 3' и 5' концах, соответственно, что делает возможной гомологичную рекомбинацию всех четырех ПЦР-фрагментов. 5'-конец ПЦР-фрагмента 9 и 3'-конец ПЦР-фрагмента 12 гомологичны к локусу INT1, что позволяет осуществить интеграцию всех четырех ПЦР-фрагментов в локусе INT1 (фиг. 2). Трансформация и отбор трансформантов описаны в Примере 2.

Получение янтарной кислоты

Для определения выработки янтарной кислоты, четыре независимых трансформанта SUC-1099, экспрессирующих последовательности мутированной фумаратредуктазы, выращивали в микротитровальных планшетах, а титры янтарной кислоты измеряли, как описано в примере 2. Средние титры янтарной кислоты отображены в табл. 2. Средняя выработка янтарной кислоты нескольких трансформантов SUC-1099, экспрессирующих последовательности мутированной фумаратредуктазы, превышала 55 г/л янтарной кислоты. Это значимо больше, чем средний титр янтарной кислоты в SUC-1099, трансформированном эталонной последовательностью FRDg. Под значимо больше подразумевается, что не перекрываются 95% доверительные области титров янтарной кислоты для штаммов с эталоном и с последовательностями улучшенной мутированной фумаратредуктазы.

Таблица 2. Средние титры янтарной кислоты, измеренные в надосадочной жидкости среды для продуцирования после 4 дней культивирования штамма SUC-1099, экспрессирующего фосфоенолпируваткарбоксикиназу (PCKa), пируваткарбоксилазу (PYC2), малатдегидрогеназу (MDH3), фумаразу (fumB), транспортер дикарбоновой кислоты (DCT_02), трансформированного эталонной фумаратредуктазой (SEQ ID NO: 33) или мутированными фумаратредуктазами, которые содержат мутации, относительно эталонной последовательности в аминокислотных положениях, указанных ниже

Фрагмент ПЦР	Клон	Положение мутации					Средний титр янтарной кислоты (г/л)
		1042	1071	1072	1082	1083	
11	Эталон	E	N	R	G	F	53,5
13	FCC 040	R	T	R	K	Y	58,2
14	FCC 045	R	T	K	K	F	57,1
15	FCC 046	R	T	K	K	Y	58,2
16	FCC 048	R	T	K	R	Y	58,9
17	FCC 065	K	T	R	R	F	59,9
18	FCC 069	K	T	K	K	F	58,5
19	FCC 070	K	T	K	K	Y	59,7
20	FCC 075	Q	S	R	K	F	56,3
21	FCC 076	Q	S	R	K	Y	61,3
22	FCC 078	Q	S	R	R	Y	64,5

Введение положительно заряженного остатка (лизина или аргинина; K или R) в аминокислотном положении 1082 является уникальным, потому что эталонная последовательность фумаратредуктазы содержит в этом положении малый незаряженный глицин. Более того, ранее описанный природный вариант или публично доступный мутант фумаратредуктазы не содержат заряженный остаток в положении номер 1082. Как показано в табл. 2, замена глицина в эталонной последовательности FRDg заряженным остатком является преимуществом при достижении повышенных титров янтарной кислоты.

Пример 4. Измерение NADH- и NADPH-специфической активности вариантов фумаратредуктазы (FRD).

Трансформанты, полученные в примере 3, растили, как описано в примере 2. Биомассу собирали центрифугированием (4000 об./мин, 10 мин, 4°C) и отмывали дважды с помощью PBS (фосфатно-солевой буфер, Sigma Aldrich), после которой клеточные осадки замораживали -20°C. Клетки разрушали в 96-луночных титрационных микропланшетах (MTP) с квадратными лунками, с помощью 0,5 мм промытых кислотой стеклянных шариков в комбинации с TissueLyser II из Qiagen (3000 об./мин. в течение 2×10 с). Стеклянные шарики, занимающие объем 600 мкл, добавляли к клеточному осадку перед добавлением 1 мл in vivo подобной тестовой среды, описанной в van Eunen et al. (FEBS Journal 277: 749-760), содержащие 0,5 mM BEE (дитиотреитол, Sigma-Aldrich) и 0,1 mM PMSF (фенилметансульфонилфторид, Amresco). Стеклянные шарики добавляли путем переворачивания MTP с глубокими лунками, содержащими замороженные осадки, над стандартными MTP, в которых каждая лунка полностью заполнена стеклянными шариками (=объем 300 мкл) с последующим переворачиванием обоих планшетов, так, чтобы стеклянные шарики упали на клеточные осадки. Этот способ повторяли для получения 600 мкл стеклянных шариков в клеточном осадке. После клеточного разрушения, клеточный дебрис осаждали цен-

трифугированием (4000 об./мин, 30 мин, 4°C). Надосадочную жидкость (растворимые клеточные экстракты) собирали и хранили на льду. Концентрацию белка экстрактов определяли по Бредфорд, с использованием бычьего сывороточного альбумина (BSA) в качестве стандарта.

Активность фумаратредуктазы (FRD) тестировали спектрофотометрически по снижению поглощения при 340 нм, вызванного окислением NADH или NADPH в NAD⁺ или NADP⁺. Тестовые смеси содержали 150 µM NADH или NADPH, 1 mM фумаровой кислоты, 0,5 мг мл⁻¹ растворимые клеточные экстракты в *in vivo*-подобной тестовой среде в конечном объеме 200 мкл. Реакции начинали добавлением фумаровой кислоты, затем выдерживали 9 мин при 30°C и крутизну использовали для измерения NADH или NADPH-зависимой активности FRD. Поглощение измеряли с помощью планшетного ридера Tecan Infinite M1000. NADH-зависимую активность каждого варианта сравнивали с активностью NADPH. Соотношение NADPH:NADH-зависимой активности для каждого варианта рассчитывали для ранжирования вариантов. Фиг. 3а и 3b демонстрируют NADPH и NADH-зависимые активности FRD для всех вариантов, которые содержат благоприятные мутации для увеличения янтарной кислоты, описанной в примере 3.

Пример 5. Конструирование штамма SUC-501

Штамм SUC-501 сконструировали путем замены двух транспортеров дикарбоновых кислот SpMAE1 в штамме SUC-401, описанном в WO 2013/004670, на транспортеры дикарбоновых кислот также, как описано для SUC-489 в WO 2013/004670. SUC-401 трансформировали очищенным 7.7 тыс. п.о. фрагментом плазмиды pSUC174, рестрицированной Bsu36I и FseI. Плазмида pSUC174 описана в WO 2013/004670. 7,7 тыс. п.о. фрагмент содержит 5'-конец синтетического гена FUMR, транспортер DCT02 и селективный маркер KanMX, фланкированные сайтами lox66/lox71 (Lambert JM, Bongers RS, Kleerebezem M., Appl Environ Microbiol. 2007 Feb;73(4): 1126-35), и 3'-конец синтетического гена MDH3.

Корректные трансформанты изначально выбирали по их устойчивости к G418, из-за интеграции маркера устойчивости KanMX. Затем проводили диагностический ПЦР на промежуточном штамме SUC-461 для подтверждения замены синтетического гена SpMAE1 синтетическим геном DCT_02. Маркер KanMX, фланкированный сайтами lox66 и lox71, удаляли из штамма SUC-461 трансформацией Cre-рекомбиназы (Güldener U., Heck S., Fielder T., Beinhauer J., Hegemann JH., Nucleic Acids Res. 1996 Jul 1;24(13):2519-2524) с помощью плазмиды pSH65, содержащей маркер устойчивости к флеомицину. Затем плазмиду pSH65 устранили из клеток ростом на неселективной среде (YEP с 2% галактозой), оставляющий один lox72 в геномной ДНК.

Полученный штамм назвали SUC-464.

Затем заменяли вторую копию гена SpMAE1, присутствующего в геномной ДНК SUC-401. SUC-464 трансформировали с помощью очищенного 7.7 тыс. п.о. фрагмента плазмиды pSUC174, рестрицированной Bsu36I и FseI. Корректные трансформанты изначально выбирали по их устойчивости к G418, из-за интеграции маркера устойчивости KanMX. Фрагмент из pSUC174 может либо заменять оставшийся ген SpMAE1, либо вводить ген DCT02. Диагностический ПЦР на трансформантах осуществляли для подтверждения замены обоих синтетических генов SpMAE1 на синтетический ген DCT_02. Один трансформант, содержащий две копии гена DCT_02, назвали SUC-467. Маркер KanMX, фланкированный сайтами lox66 и lox71, удаляли из штамма SUC-467 трансформацией Cre-рекомбиназы (Güldener U., Heck S., Fielder T., Beinhauer J., Hegemann JH., Nucleic Acids Res. 1996 Jul 1;24(13):2519-2524) с помощью плазмиды pSH65, содержащей маркер устойчивости к флеомицину. Затем плазмиду pSH65 устранили из клеток ростом на неселективной среде (YEP с 2% галактозой), оставляющий один lox72 в геномной ДНК.

Полученный штамм назвали SUC-501 (MATa ura3,52 HIS3 LEU2 TRP1 sit2::TPI1p-PCKa-PMA1t;TDH3p-FRDg-TDH3tsit4::TDH3p-MDH3-TDH3t;ENO1p-DCT_02-ENO1t;TPI1p-FUMR-PMA1t; lox72 adh1::PGK1p-PYC2-PGK1t;URA3p-URA3-URA3t MAL2-8 SUC2).

Пример 6. Отбор штамма SUC-723 адаптивной эволюцией SUC-501

SUC-501 выращивали в 1,5 л ауксостат-культуры в 2-литровом ферментере, содержащем среду с концентрацией янтарной кислоты 50 г/л при pH 3 и 30°C. Скорость мешалки установили равным 150 об./мин., а поток воздуха 2 Nl/ч. Размер инокулюма составлял 150 г биомассы (выращенной во встряхиваемой колбе в среде Verduyn (Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Yeast, 1992 Jul;8(7):501-517)) с галактозой в качестве источника углерода). Скорость подкормки среды ауксостат-культуры постепенно повышалась в течение 60 дневного периода. Исходная скорость подкормки была установлена по скорости разведения 0,05 ч⁻¹, конечная скорость подкормки была установлена по скорости разведения 0,16 ч⁻¹. Скорость подкормки была максимизирована для поддержки культуры при максимальной возможной скорости роста, избегая при этом образование этанола и вымывания культуры.

Питающая среда была основана на Verduyn et al. (Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Yeast, 1992 Jul; 8(7):501-517), с модификациями в источниках углерода и азота, как описано ниже (см. табл. 3). pH установили равным 3 (с помощью 1M KOH/1M H₂SO₄).

Выработка янтарной кислоты была измерена в нескольких временных точках, в течение 60 дневного роста ауксостат-культуры, с помощью способа, описанного в примере 2 в WO 2013/004670. Через 30 дней титры янтарной кислоты, выработанные ауксостат-культурой, были схожими с титрами неэволюционированного SUC-501. Через 60 дней адаптивной эволюции ауксостат-культура демонстрировала

снижение титра янтарной кислоты более чем на 50% по сравнению с SUC-501.

Изолят одиночной колонии, полученный из культуры SUC-501 через 60 дней роста в ауксостат-культуре, назвали SUC-723. Анализ ПЦР с праймерами, специфичными к интегрированному открытым рамкам считывания с использованием способа, известного специалистам в данной области, генов янтарной кислоты, которые присутствуют в штамме SUC-501 (FUMR, MDH3, PCKa, FRDg, PYC2, DCT02) выявил, что ген FRDg отсутствует в SUC-723. Наличие всех других генов янтарной кислоты, которые присутствуют в SUC-501, может быть продемонстрировано в штамме SUC-723.

Таблица 3. Композиция среды для подкормки, используемой при адаптивной эволюции SUC-501, описанной в Примере 6. Питательная среда была основана на Verduyn et al. (Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Yeast, 1992 Jul; 8(7):501-517)

Исходный материал		Концентрация (г/кг)
Декстроза	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	27,5
Сульфат аммония	$(NH_4)_2SO_4$	5
Дигидрофосфат калия	KH_2PO_4	3,0
Сульфат магния	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
Раствор редких элементов		1
Витаминный раствор		1
Янтарная кислота	$C_4H_6O_4$	50

Пример 7. Трансформация фумаратредуктазы в штамм SUC-723 и выработка янтарной кислоты полученными трансформантами

Для того чтобы проверить, происходит ли снижение выработки янтарной кислоты SUC-723 исключительно из-за отсутствия гена FRDg (и что SUC-723, следовательно, может быть использован для оценки функциональных вариантов гена FRDg по выработке янтарной кислоты) конструкция, экспрессирующая FRDg, была интегрирована в штамм SUC-723.

Получение ПЦР-фрагментов

Фрагмент ПЦР получали с помощью полимеразы "Phusion® DNA polymerase" (New England Biolabs, США), согласно инструкциям производителя.

Последовательности праймеров, приведенные в SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35, были использованы для получения ПЦР-фрагмента 23, состоящего из 5' участка интеграции INT12, с использованием геномной ДНК штамма CEN.PK113-7D в качестве матрицы.

ПЦР-фрагменты 10 и 1 были получены, как описано в примере 2.

Последовательности праймеров, приведенные в SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37, были использованы для получения ПЦР-фрагмента 24, состоящего из участка интеграции 3' INT12, с помощью геномной ДНК штамма CEN.PK 113-7D в качестве матрицы.

ПЦР-фрагменты 10, 11, 23 и 24 очищали с помощью набора DNA Clean & Concentrator™-25 (Zymo Research, Ирвин, Калифорния, США) согласно инструкциям производителя.

Трансформация SUC-723

Трансформация дрожжей была проведена способом, известным специалистам в данной области. S. cerevisiae штамм SUC-723 трансформировали с помощью очищенных фрагментов 10, 11, 23 и 24. ПЦР-фрагменты 10 и 11 содержат перекрытия на их 5' и 3'-концах, а ПЦР-фрагменты 9 и 12 содержат перекрытия на их 3' и 5' концах соответственно, что делает возможной гомологичную рекомбинацию всех четырех ПНП-фрагментов (см. фиг. 4). 5'-конец ПЦР-фрагмента 23 и 3'-конец ПЦР-фрагмента 24 были гомологичными к локусу INT12 что позволяет осуществить интеграцию всех четырех ПЦР-фрагментов в локусе INT12 (см. фиг. 4). Это дает один линейный фрагмент, включающий ПЦР-фрагменты 10, 11, 23 и 24, интегрированные в локусе INT12. Этот способ интеграции описан в родительской заявке WO2013076280. Локус INT12 расположен на хромосоме II, на 743 п.о. выше ATG YOR071c, и на 618 п.о. ниже ATG YBL029C-A. Этот подход дает экспрессию белка фумаратредуктазы длиной 1139 аминокислот, как указано в SEQ ID NO: 33, утратившего С-концевые аминокислоты SKI, по сравнению с нативной последовательностью из T. brucei, в штамме SUC-723.

Трансформационные смеси помещали на YEPh-агар (на литр: 10 г дрожжевого экстракта, 20 г PhytonePeptone, 20 г галактозы, 20 г агара), содержащего 100 мкг ноурсетрицина (Jena Bioscience, Германия) на мл. Через три дня роста при 30°C, индивидуальные трансформанты повторно рассеивали штрихом на планшеты с YEPh-агаром, содержащим 20 грамм галактозы на литр и 100 мкг ноурсетрицина на мл. Присутствие введенных генов было подтверждено с помощью ПНП с использованием последовательностей праймеров, которые могут отжигаться на кодирующих последовательностях ORF, кодируемых SEQ ID NO: 7 (маркер ноурсетрицин) и SEQ ID NO: 8 (ген фумаратредуктазы). Полученный штамм назвали SUC-723-FRDg.

Выработка янтарной кислоты SUC-723 и SUC-723-FRDg

Для определения выработки янтарной кислоты штаммы SUC-723 и SUC-723-FRDg выращивали в трех повторах в микротитровальных планшетах с использованием галактозы в качестве источника угле-

рода. После фазы роста для получения биомассы, начинали эксперимент по продуцированию путем ресуспендирования клеток в среде для культивирования. 30 г/л янтарной кислоты вносили в среду для культивирования в начале эксперимента по продуцированию. Образцы надосадочной жидкости забирали после 96 ч культивирования.

Образцы для проточного ЯМР получали следующим образом: Из каждой лунки 600 мкл культуры забирали и центрифугировали в течение 1 мин при 14000 об./мин. 50 мкл надосадочной жидкости переносили в 96-ти луночные МТР-планшеты с глубокими лунками. 450 мкл внутреннего стандарта (20 г/л малеиновой кислоты, 40 г/л EDTA в D₂O) и 500 мкл 80:20 H₂O/D₂O добавляли в каждый образец. Дикарбоновую кислоту, включая концентрации янтарной кислоты и других соединений, таких как глюкоза в ферментационной надосадочной жидкости, определяли с помощью спектрометра 2Bruker BEST avance II 500 MHz. Спектры ЯМР записывали с помощью импульсного метода с подавлением сигнала воды при 27°C с релаксационной задержкой 30 с.

В надосадочной жидкости SUC-723 был измерен средний титр янтарной кислоты 37,4 г/л. Когда FRDg был введен и сверхэкспрессирован в SUC-723, как в SUC-723-FRDg, измеренный средний титр составил 49,5 г/л янтарной кислоты.

Пример 8. Трансформация вариантов фумаратредуктазы в штамм SUC-723 и выработка янтарной кислоты полученными трансформантами

Получение ПЦР-фрагментов

ПЦР-фрагмент 10 был получен, как описано в примере 2.

ПЦР-фрагменты 23 и 24 были получены, как описано в примере 7.

Синтетическая последовательность, кодирующая различные белковые варианты последовательности эталонной фумаратредуктазы, которая описана SEQ ID NO: 33, были синтезированы с помощью DNA 2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США). Синтетические нуклеотидные последовательности кодируют мутированную аминокислоту относительно эталонной последовательности FRDg (SEQ ID NO: 33) в положениях, указанных в табл. 4. За исключением кодируемого указанными мутантными аминокислотами в табл. 4 варианты синтетической нуклеотидной последовательности идентичны SEQ ID NO: 8. Синтетический ген находится под контролем (или функционально связан) промотора из *S. cerevisiae*, т.е. TDH3-промотор контролирует экспрессию мутированного FRDg-гена (FCC). Точная терминация контролируется последовательностью терминатора из *S. cerevisiae*, т.е. TAL1-терминатором.

Последовательности синтетического гена, содержащие помимо прочего TDH3-промотор - мутированная FRD - TAL1-терминатор, были амплифицированы ПЦР с помощью праймеров SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32, для получения ПЦР-фрагментов с 13, 16, 17, 19, 21 и 22 (см. табл. 4).

ПЦР-фрагменты 10, 12, 13, 16, 17, 19, 21, 22, 23 и 24 очищали с помощью набора DNA Clean & Concentrator™-25 (Zymo Research, Ирвин, Калифорния, США) согласно инструкциям производителя.

Трансформация SUC-723

Штамм SUC-723 трансформировали очищенными ПЦР-фрагментами 23, 10 и 24 в комбинации с ПЦР-фрагментами 13, 16, 17, 19, 21 и 22 по отдельности. ПЦР-фрагменты 10, 13, 16, 17, 19, 21 и 22 содержат перекрытия на их 5' и 3'-концах, а ПЦР-фрагменты 23 и 24 содержат перекрытия на их 3' и 5' концах соответственно, что делает возможной гомологичную рекомбинацию всех четырех ПЦР-фрагментов. 5'-конец ПЦР-фрагмента 23 и 3'-конец ПЦР-фрагмента 24 были гомологичными к локусу INT12, что позволяет осуществить интеграцию всех четырех ПЦР-фрагментов в локусе INT12 (фиг. 4). Трансформация и отбор трансформантов описан в примере 2.

Для каждой трансформации три колонии были проверены с помощью ПЦР с использованием праймеров, гибридизующихся с геном FRDg, и праймеров, гибридизующихся с геномной ДНК в 5' области, гомологичной ПЦР-фрагменту 23, и в 3' области, гомологичной ПЦР-фрагменту 24. Во всех трансформациях был идентифицирован по меньшей мере один корректный трансформант. Колонии штаммов, трансформированных ПЦР-фрагментами 13, 16, 17, 19, 21 и 22 были названы SUC-723-FCC_40, SUC-723-FCC_48, SUC-723-FCC_65, SUC-723-FCC_70, SUC-723-FCC_76 и SUC-723-FCC_78 соответственно.

Выработка янтарной кислоты

Для определения выработки янтарной кислоты SUC-723-FCC_40, SUC-723-FCC_48, SUC-723-FCC_65, SUC-723-FCC_70, SUC-723-FCC_76 и SUC-723-FCC_78 выращивали в трех повторах в титровальных микропланшетах и измеряли титры янтарной кислоты, как описано в примере 2. Средние титры янтарной кислоты отображены в табл. 4. Средняя выработка янтарной кислоты нескольких трансформантов SUC-723, экспрессирующих последовательности мутированной фумаратредуктазы, превышала 54 г/л янтарной кислоты. Это значительно больше, чем средний титр янтарной кислоты в SUC-723, трансформированных эталонной последовательностью FRDg, которая продуцирует 49,5 г/л янтарной кислоты. Под значительно больше подразумевается, что не перекрываются 95% доверительные области титров янтарной кислоты для штаммов с эталоном и с последовательностями улучшенной мутированной фумаратредуктазы.

Таблица 4. Средние титры янтарной кислоты, измеренные в надосадочной жидкости среды для продуцирования после 4 дней культивирования штамма SUC-723, экспрессирующего фосфоенолпируват-карбоксикиназу (PCKa), пируваткарбоксилазу (PYC2), малатдегидрогеназу (MDH3), фумаразу (fumB), транспортер дикарбоновой кислоты (DCT_02), трансформированного эталонной фумаратредуктазой (SEQ ID NO: 33) или мутированными фумаратредуктазами, которые содержат мутации, относительно эталонной последовательности в аминокислотных положениях, указанных ниже

Фрагмент ПЦР	Клон	Мутация в позиции					Средний титр янтарной кислоты (г/л)
		1042	1071	1072	1082	1083	
-	контроль SUC-723						37,4
11	Эталон	E	N	R	G	F	49,5
13	FCC_040	R	T	R	K	Y	55,4
16	FCC_048	R	T	K	R	Y	54,9
17	FCC_065	K	T	R	R	F	53,7
19	FCC_070	K	T	K	K	Y	54,9
21	FCC_076	Q	S	R	K	Y	58,1
22	FCC_078	Q	S	R	R	Y	54,6

Введение положительно заряженного остатка (лизина или аргинина; K или R) в аминокислотном положении 1082 является уникальным, потому что эталонная последовательность фумаратредуктазы содержит в этом положении малый незаряженный глицин. Более того, ранее описанный природный вариант или публично доступный мутант фумаратредуктазы не содержат заряженный остаток в положении номер 1082. Как изображено в табл. 4, замена глицина в положении 1082 в эталонной последовательности FRDg заряженным остатком является преимуществом при достижении повышенных титров янтарной кислоты. В примере 3 это показано в штамме SUC-1099, в данном примере тот же самый эффект показан на другом штаммовом фоне, а именно в штамме SUC-723.

Пример 9. Измерение NADH- и NADPH-специфической активности вариантов фумаратредуктазы (FRD), экспрессированных в штамме SUC-723

Трансформанты, полученные в примере 7 & 8, растили, как описано в примере 2. Биомассу собирали, клетки разрушали и определяли концентрацию белка, как в примере 4. Активность фумаратредуктазы (FRD) тестировали спектрофотометрически, в трех повторях, как в примере 5. Фиг. 5a и 5b демонстрируют NADPH- и NADH-зависимые активности FRD для FCC-вариантов_40, FCC_48, FCC_65, FCC_70, FCC_76, FCC_78 и эталонной FRD, которые экспрессировались в штамме SUC-723. Штамм SUC-723, не трансформированный FRD, был взят вместе в качестве контроля. Шесть протестированных вариантов FRD, были теми, которые содержали благоприятные мутации для повышенной выработки янтарной кислоты, описаны в примерах 3 и 8.

Пример 10. Трансформация фумаратредуктазы в штамм CEN.PK113-7D

Получение ПЦР-фрагментов

ПЦР-фрагмент 25 получали ПЦР-амплификацией SEQ ID NO: 38 с помощью праймеров, амплифицирующих целую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 38. SEQ ID NO: 38 описывает фланкирующий участок интеграции 5' INT09.01. SEQ ID NO: 38 включает 50 п.о. участок гомологии к ПЦР-фрагменту 26, расположенному на 3' конце SEQ ID NO: 38. Сайт интеграции INT09.01 расположен на 359 п.о. ниже YIL009W ORF на хромосоме IX.

ПЦР-фрагмент 26 получали ПЦР-амплификацией SEQ ID NO: 39 с помощью праймеров, амплифицирующих целую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 39. SEQ ID NO: 39 кодирует селективный маркер ноурсетрицина, функциональный в *Saccharomyces cerevisiae*, который был амплифицирован из модифицированной версии плазмиды pUG7-Nat. pUG7-Nat является вариантом плазмиды pUG6, описанной Gueldener et al., (Nucleic Acids Res. 1996 Jul 1;24(13):2519-24), в котором сайты loxP, присутствующие в pUG6, были заменены на участки lox66 и lox71 (Lambert et al., Appl. Environ. Microbiol. 2007 Feb;73(4):1126-35. Epub 2006 Dec 1) и в котором маркер KanMX был заменен на маркер ноурсетрицин (Goldstein and McCusker, Yeast. 1999 Oct;15(14):1541-53).

ПЦР-фрагмент 27 получали ПЦР-амплификацией SEQ ID NO: 40 с помощью праймеров, амплифицирующих целую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40.

SEQ ID NO: 40 кодирует фумаратредуктазу (FRDg) из *Trypanosoma brucei*, как описано в родительской заявке WO 2009/065778 и описано в SEQ ID NO: 33. Эта синтетическая последовательность, которая включает последовательность промотор-ген-терминатор, включая соответствующие участки рестрикции, была синтезирована с помощью DNA 2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США). Генная последовательность была оптимизирована по кодоновым парам для экспрессии в *S. cerevisiae*, как раскрыто в родительской заявке WO 2008/000632. Синтетический ген находится под контролем (или функционально связан) промотора из *Kluyveromyces lactis*, т.е. промотор PGK1 3-фосфат дегидрогеназы (учетный номер uniprot P14828) контролирует экспрессию гена FRDg. Точная терминация контролируется последовательностью терминатора из *S. cerevisiae*, т.е. ADH1-терминатором.

ПЦР-фрагмент 28 получали ПЦР-амплификацией SEQ ID NO: 41 с помощью праймеров, амплифи-

цирующих целую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41. SEQ ID NO: 41 описывает фланкирующий участок интеграции 3' INT09.01. 5'-конец ПЦР-фрагмента 28 содержит 50 п.о. участок гомологии к 3'-концу ПЦР-фрагмента 27 и фрагментов 29-58.

ПЦР-фрагменты с 29 по 58 были получены таким же образом, как и ПЦР-продукт 27. Вместо SEQ ID NO: 40 в качестве мишени ПЦР-фрагмента 27, синтетические нуклеотидные последовательности использовали так, чтобы кодировать различные белковые варианты последовательности эталонной фумаратредуктазы, то есть описанной в SEQ ID NO: 33. Синтетическая последовательность была синтезирована с помощью DNA 2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США). Синтетические нуклеотидные последовательности кодируют мутированную аминокислоту относительно эталонной последовательности FRDg (SEQ ID NO: 33) в положениях, указанных в табл. 5.

За исключением кодируемого указанными мутантными аминокислотами в табл. 5, варианты синтетической нуклеотидной последовательности идентичны SEQ ID NO: 40. Последовательности были амплифицированы ПЦР с помощью праймеров, использованных для амплификации ПЦР-фрагмента 27 для получения ПЦР-фрагментов 29-58 (см. табл. 5).

Таблица 5. Мутации, присутствующие в мутированных вариантах фумаратредуктазы, присутствуют в ПЦР-фрагментах 29-58, по сравнению с эталонной фумаратредуктазой на ПЦР-фрагменте 27 (SEQ ID NO: 33). В ПЦР-фрагментах 29-60 мутации представлены в аминокислотных положениях 1042, 1071, 1072, 1082 и 1083, как указано ниже

Фрагмент ПЦР	Клон	1042	1071	1072	1082	1083
27	FRDg	E	N	R	G	F
29	FCC_097	R	G	R	R	Y
30	FCC_098	Q	G	R	R	Y
31	FCC_099	R	G	R	K	Y
32	FCC_100	Q	G	R	K	Y
33	FCC_101	R	S	R	R	I
34	FCC_102	R	G	R	R	I
35	FCC_103	Q	S	R	R	I
36	FCC_104	Q	G	R	R	I
37	FCC_105	R	S	R	K	I
38	FCC_106	R	G	R	K	I
39	FCC_107	Q	S	R	K	I
40	FCC_108	Q	G	R	K	I
41	FCC_109	R	S	R	R	A
42	FCC_110	R	G	R	R	A
43	FCC_111	Q	S	R	R	A
44	FCC_112	Q	G	R	R	A
45	FCC_113	R	S	R	K	A
46	FCC_114	R	G	R	K	A
47	FCC_115	Q	S	R	K	A
48	FCC_116	Q	G	R	K	A
49	FCC_117	R	S	R	R	S
50	FCC_118	R	G	R	R	S
51	FCC_119	Q	S	R	R	S
52	FCC_120	Q	G	R	R	S
53	FCC_121	R	S	R	K	S
54	FCC_122	R	G	R	K	S
55	FCC_123	Q	S	R	K	S
56	FCC_124	Q	G	R	K	S
57	FCC_030	R	S	R	R	Y
58	FCC_028	R	S	R	K	Y

Трансформация в CEN.PK113-7D для конструирования штамма CPK-FRDg

Трансформация дрожжей была проведена способом, известным специалистам в данной области. Штамм *S. cerevisiae* CENPK.113-7D (МАТа HIS3 LEU2 TRP1 MAL2-8 SUC2) трансформировали очищенными ПЦР-фрагментами 25-28. ПЦР-фрагменты 26 и 27 содержат перекрытия на их 5' и 3'-концах, а ПЦР-фрагменты 25 и 26 содержат перекрытия на их 3' и 5' концах соответственно, так что это делает возможной гомологичную рекомбинацию всех четырех ПЦР-фрагментов. 5'-конец ПЦР-фрагмента 25 и 3'-конец ПЦР-фрагмента 28 были гомологичными к локусу INT09.01, что позволяет осуществить интеграцию всех четырех ПЦР-фрагментов в локус INT09.01 (см. фиг. 6).

Трансформационные смеси были помещены на YEPH-агар (на литр: 10 г дрожжевого экстракта, 20 г PhytonePeptone, 20 г галактозы, 20 г агара), содержащего 100 мкг ноурсетрицина (Jena Bioscience, Германия) на мл. Через три дня роста при 30°C, индивидуальные трансформанты повторно рассеивали штрихом на планшеты с YEPH-агаром, содержащим 20 г галактозы на литр и 100 мкг ноурсетрицина на мл. При отсутствии введенных генов было подтверждено с помощью ПЦР с использованием последовательностей праймеров, которые могут отжигаться на кодирующих последовательностях ORF, кодируемых SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40. Индивидуальные колонии были отобраны и названы CPK-FRDg.

Трансформация CEN.PK113-7D для конструирования штамма CPK-FCC_097 в CPK-FCC_124 и CPK-FCC_030 и CPK-FCC_028

Трансформация дрожжей была проведена способом, известным специалистам в данной области. Штамм *S. cerevisiae* CENPK.113-7D (МАТа HIS3 LEU2 TRP1 MAL2-8 SUC2) трансформировали очищенными ПЦР-фрагментами 25, 26, 28, и фрагментами 29-58 по отдельности. ПЦР-фрагменты 26 и фрагменты 29-58 содержат перекрытия на их 5' и 3'-концах и ПЦР-фрагменты 25 и 28 на их 3' и 5' концах, соответственно, так что это делает возможной гомологичную рекомбинацию на всех четырех ПЦР-фрагментах, как указано на фиг. 6. 5'-конец ПЦР-фрагмента 25 и 3'-конец ПЦР-фрагмента 28 были гомологичными к локусу INT09.01, что позволяет осуществить интеграцию всех четырех ПЦР-фрагментов в локус INT09.01 (см. фиг. 6).

Трансформационные смеси были помещены на YEPH-агар (на литр: 10 г дрожжевого экстракта, 20 г PhytonePeptone, 20 г галактозы, 20 г агара), содержащего 100 мкг ноурсетрицина (Jena Bioscience, Германия) на мл. Через три дня роста при 30°C, индивидуальные трансформанты повторно рассеивали штрихом на планшеты с YEPH-агаром, содержащим 20 г галактозы на литр и 100 мкг ноурсетрицина на мл. Наличие введенных генов было подтверждено измерением ферментативной активности фумаратредуктазы.

Пример 11. Измерение NADH- и NADPH-специфической активности вариантов фумаратредуктазы (FRD), экспрессированных в штамме CEN.PK113-7D

Трансформанты, созданные в примере 10, были выращены в 24-луночных планшетах с глубокими лунками (Axugen) в среде Verduyn (Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Yeast, 1992 Jul;8(7):501-517) с галактозой в качестве источника углерода и содержащего 150 мкг ноурсетрицина (Jena Bioscience, Германия) на мл. Биомассу собирали, клетки разрушали и определяли концентрацию белка, как в примере 4. Активность фумаратредуктазы (FRD) была протестирована спектрофотометрически как в примере 4, со следующими незначительными модификациями: 400 μ M NADH или NADPH использовали вместо 150 μ M. Измеренные активности нормализовали по присутствующему общему белку путем деления на общую концентрацию белка в тесте, определенную по Бредфорд с помощью бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. В табл. 6 перечислены соотношения специфичности для каждого варианта; соотношение NADPH:NADH зависимой активности (крутизна при 340 нм с NADPH)/(крутизна при 340 нм с NADH). Это соотношение было рассчитано так, чтобы варианты могли быть рассчитаны на измененной специфичности к кофактору (см. табл. 6). Увеличенное значение для соотношения по сравнению с эталонным клоном указывает на то, что специфичность к кофактору была изменена. Это может указывать на сниженную специфичность NADH, повышенную активность NADPH или комбинацию того и другого. На фиг. 7 представлено NADPH- и NADH-зависимые активности FRD для вариантов FRD, экспрессированных в CEN.PK113-7D. Штамм CEN.PK113-7D не трансформированный FRD, был взят в качестве отрицательного контроля.

Таблица 6. Соотношение специфичности NADPH : NADH для вариантов FRD, экспрессированных в штамме CEN.PK113-7D. С помощью вычисления соотношения между NADPH- и NADH-специфичной активностями FRD, варианты могут быть ранжированы и легко сравнены с эталонной последовательностью. Неожиданно оказалось, все варианты демонстрируют измененную кофакторную специфичность, многие, при сравнении с эталонным FRD, весьма сильно, свидетельством чему является различное соотношение специфичности

Фрагмент ПЦР	Клон	Мутация в позиции					Соотношение NADH:NADPH зависимой активности
		1042	1071	1072	1082	1083	
-	CEN.PK113-7D контроль						н.а.
27	Эталон	E	N	R	G	F	0,01
59	FCC_028	R	S	R	K	Y	0,6
57	FCC_030	R	S	R	R	Y	0,8
29	FCC_097	R	G	R	R	Y	3,9
30	FCC_098	Q	G	R	R	Y	5,5
31	FCC_099	R	G	R	K	Y	0,04
32	FCC_100	Q	G	R	K	Y	0,5
33	FCC_101	R	S	R	R	I	0,2
34	FCC_102	R	G	R	R	I	0,1
35	FCC_103	Q	S	R	R	I	2,3
36	FCC_104	Q	G	R	R	I	0,4
37	FCC_105	R	S	R	K	I	4
38	FCC_106	R	G	R	K	I	12,7
39	FCC_107	Q	S	R	K	I	2,2
40	FCC_108	Q	G	R	K	I	1,5
41	FCC_109	R	S	R	R	A	1,8
42	FCC_110	R	G	R	R	A	0,7
43	FCC_111	Q	S	R	R	A	0,2
44	FCC_112	Q	G	R	R	A	0,4
45	FCC_113	R	S	R	K	A	0,9
46	FCC_114	R	G	R	K	A	0,2
47	FCC_115	Q	S	R	K	A	0,2
48	FCC_116	Q	G	R	K	A	0,2
49	FCC_117	R	S	R	R	S	0,8
50	FCC_118	R	G	R	R	S	0,2
51	FCC_119	Q	S	R	R	S	0,5
52	FCC_120	Q	G	R	R	S	0,2
53	FCC_121	R	S	R	K	S	0,6
54	FCC_122	R	G	R	K	S	0,5
55	FCC_123	Q	S	R	K	S	0,2
56	FCC_124	Q	G	R	K	S	0,1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариантный полипептид, имеющий активность фумаратредуктазы, который имеет модифицированную NADP(H)-зависимую активность и/или модифицированную NAD(H)-зависимую активность по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность фумаратредуктазы и содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33,

где вариантный полипептид характеризуется увеличением NADP(H)-зависимой активности относительно NAD(H)-зависимой активности по сравнению с эталонным полипептидом,

где вариантный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая при выравнивании с фумаратредуктазой, имеющей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотных остатков, соответствующих любой из аминокислот 1042, 1071, 1072, 1082 или 1083, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 33,

где вариантный полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33.

2. Вариантный полипептид по п.1, который имеет повышенную NADP(H)-зависимую активность по сравнению с эталонным полипептидом.

3. Вариантный полипептид по п.1 или 2, который имеет пониженную NADP(H)-зависимую активность по сравнению с эталонным полипептидом.

4. Вариантный полипептид по любому из предшествующих пунктов, где модифицированная NADP(H)-зависимая активность является увеличенной NADP(H)-зависимой активностью и модифицированная NAD(H)-зависимая активность является сниженной NAD(H)-зависимой активностью.

5. Вариантный полипептид по любому из предшествующих пунктов, где вариантный полипептид является не встречающимся в природе полипептидом.

6. Вариантный полипептид по любому из предшествующих пунктов, определенный в табл. 1.

7. Вариантный полипептид по любому из предшествующих пунктов, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 33.

8. Вариантный полипептид по любому из предшествующих пунктов, где вариантный полипептид содержит:

a) R, K или Q в положении 1042, определенном относительно SEQ ID NO: 33;

b) G, T или S в положении 1071, определенном относительно SEQ ID NO: 33;

- с) К в положении 1072, определенном относительно SEQ ID NO: 33;
 д) К или R в положении 1082, определенном относительно SEQ ID NO: 33; и/или
 е) S, Y, I или A в положении 1083, определенном относительно SEQ ID NO: 33

9. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариантный полипептид, имеющий активность фумаратредуктазы, где нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую вариантный полипептид по любому из предшествующих пунктов.

10. Нуклеотидная конструкция для экспрессии вариантного полипептида, имеющего активность фумаратредуктазы, где нуклеотидная конструкция содержит нуклеотидную последовательность по п.9, функционально связанную с одной или несколькими контрольными последовательностями, способными направлять экспрессию фумаратредуктазы в подходящем экспрессирующем хозяине.

11. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.9 или нуклеотидную конструкцию по п.10.

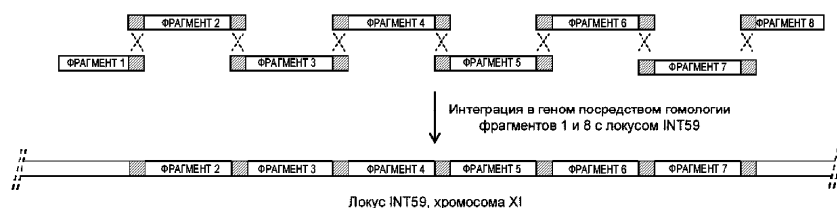
12. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.9, нуклеотидную конструкцию по п.10 или экспрессирующий вектор по п.11.

13. Клетка-хозяин по п.12, которая является прокариотической клеткой, такой как бактериальная клетка, или эукариотической клеткой, например дрожжевой клеткой или клеткой мицелиального гриба.

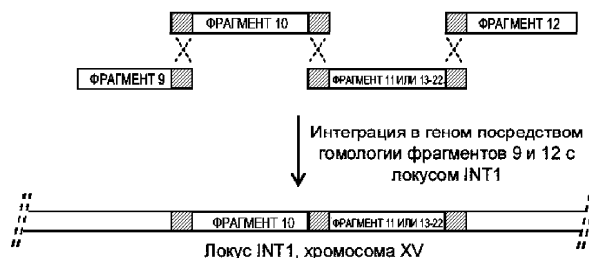
14. Клетка-хозяин по п.13, где дрожжевая клетка представляет собой клетку-хозяин *Saccharomyces cerevisiae*.

15. Способ получения фумаратредуктазы, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп.12-14, в условиях, подходящих для выработки фумаратредуктазы и извлечения фумаратредуктазы.

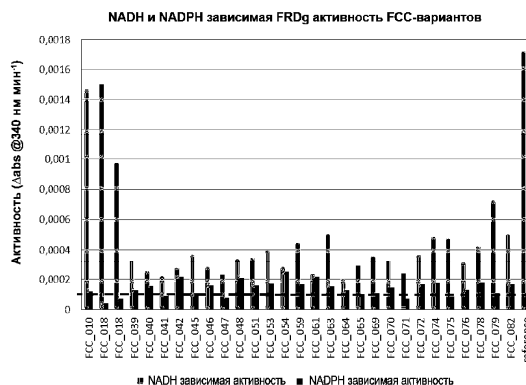
16. Способ получения дикарбоновой кислоты, такой как янтарная кислота, который включает ферментацию клетки-хозяина по любому из пп.12-14, в условиях, подходящих для выработки янтарной кислоты и, необязательно, извлечения янтарной кислоты.



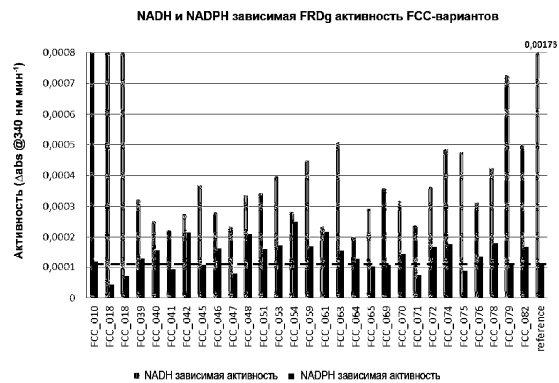
Фиг. 1



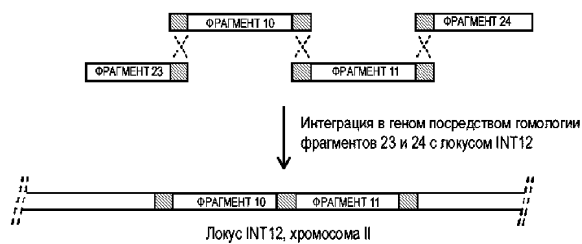
Фиг. 2



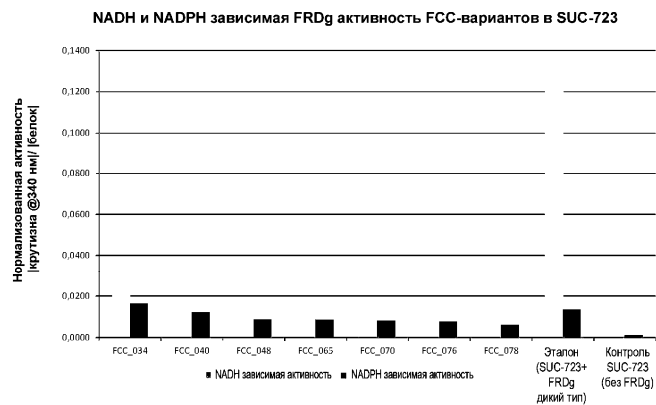
Фиг. 3А



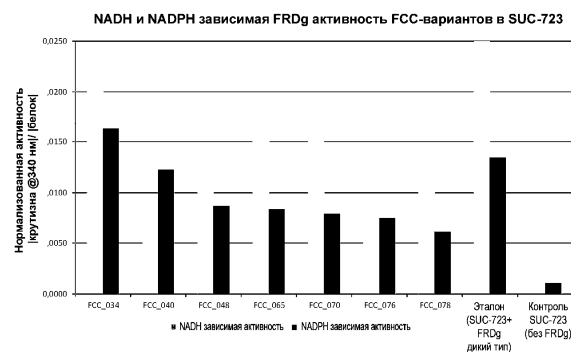
Фиг. 3В



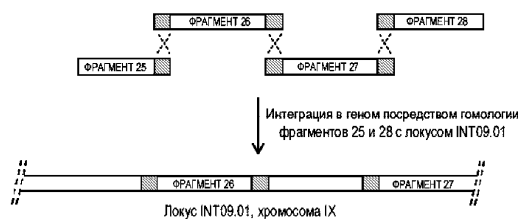
Фиг. 4



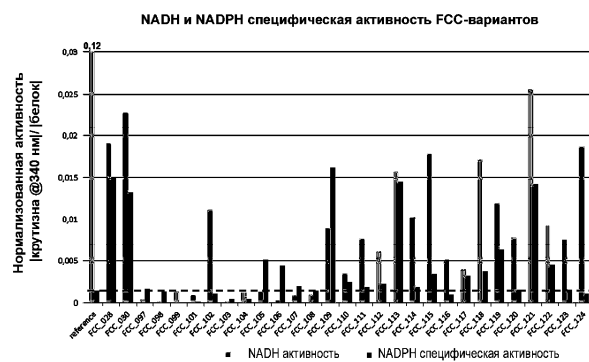
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 6



Фиг. 7

