

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038136**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.12

(21) Номер заявки
201792684

(22) Дата подачи заявки
2016.06.10

(51) Int. Cl. **C12P 7/26** (2006.01)
C12P 7/66 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ОКТАКЕТИДСИНТАЗ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЕРМЕСОВОЙ КИСЛОТЫ И ФЛАВОКЕРМЕСОВОЙ КИСЛОТЫ

(31) **15171375.7**(32) **2015.06.10**(33) **EP**(43) **2018.06.29**(86) **PCT/EP2016/063242**(87) **WO 2016/198564 2016.12.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДАНМАРКС ТЕКНИСКЕ
УНИВЕРСИТЕТ; КЁБЕНХАВНС
УНИВЕРСИТЕТ; КР. ХАНСЕН
НЕЙЧЕРАЛ КОЛОРС А/С (DK)**

(72) Изобретатель:
**Мёллер Биргер Линдберг, Мадсен
Бьорн, Стерк Дан, Оккельс Финн
Тюге (DK), Андерсен-Ранберг Йохан
(US), Конгстад Кенет Терманн,
Биндеруп Ким, Беннедсен Мадс,
Нафиси Майсе, Хорсанд-Ямаль
Паиман, Каннангара Рубини Маюа,
Мортенсен Уффе Хасбро, Тране Ульф,
Франсен Расмус Йохн Норманд (DK)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) TANG, Y. ET AL.: "Engineered Biosynthesis of Regioselectively Modified Aromatic Polyketides Using Bimodular Polyketide Syntheses", PLOS BIOLOGY, vol. 2, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 0227-0238, XP002752479, cited in the application page 0230, column 2, line 30 - page 0232, column 1, line 8; figure 5A; table 1; compound 7 page 0236, column 2, line 16 - page 0237, column 1, line 16
ABE, I. ET AL.: "Engineered Biosynthesis of Plant Polyketides: Chain Length Control in an Octaketide-Producing Plant Type III Polyketide Synthase", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 127, no. 36, 17 August 2005 (2005-08-17), pages 12709-12716, XP002752480, abstract page 12710, column 1, line 18 - column 2, line 4; figure 1D, page 12711; figure 2B, page 12713, column 1, lines 6-32 page 12715; figure 6
KARPPINEN, K. ET AL.: "Octaketide-producing type III polyketide synthase from *Hypericum perforatum* is expressed in dark glands accumulating hypericins", FEBS JOURNAL, vol. 275, no. 17, 21 July 2008 (2008-07-21), pages 4329-4342, XP002752481, abstract page 4330; figure 1, page 4332, column 1, line 22 - column 2, line 9; compounds A4, A7 page 4333; figure 4, page 4336, column 2, lines 1-26

(57) Способ получения представляющего интерес ароматического соединения, которое представляет собой октакетидное производное (например, карминовую кислоту), где способ предусматривает (I) гетерологичную экспрессию рекомбинантно введенного гена поликетидсинтазы (PKS) III типа, кодирующего октакетидсинтазу (OKS), с получением невосстановленного октакетида *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине; и (II) превращение *in vivo* невосстановленного октакетида, полученного на стадии (I), в C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение, представляющее интерес (например, карминовую кислоту).

038136
B1

038136
B1

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к способу получения представляющего интерес ароматического соединения, которое представляет собой октакетидное производное (например, карминовую кислоту), где способ предусматривает (I) гетерологичную экспрессию рекомбинантно введенного гена поликетидсинтазы (PKS) III типа, кодирующего октакетидсинтазу (OKS), с получением невосстановленного октакетида *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине; и (II) превращение *in vivo* невосстановленного октакетида, полученного на стадии (I), в C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение, представляющее интерес (например, карминовую кислоту).

Уровень техники изобретения

Природный пигмент - карминовая кислота является одним из наиболее часто применяемых красителей продуктов питания, медикаментов, косметики и текстиля.

Карминовая кислота представляет собой краситель, который можно экстрагировать из тел самок насекомых *Dactylopius coccus costa* (альтернативное название *Coccus cacti* L.). Эти насекомые живут на *Nopalea cochenillifera*, *Opuntia ficus indica* и других растениях семейства Cactaceae, выращиваемых, например, в пустынных районах Мексики, Центральной и Южной Америки и Канарских островов. В зависимости от значения pH, краситель может иметь цвет в спектре от оранжевого-красного до фиолетового и обычно известен как кошениль или кошенильная краска. Карминовый краситель широко применяют в продуктах питания и напитках.

Как известно из уровня техники, *Porphyrophora polonica* также продуцирует карминовую кислоту, и ее культивируют для получения карминовой кислоты, например, в Польше.

Что касается современного промышленного производства, то карминовую кислоту собирают путем ее экстракции из высушенных тел насекомых с помощью воды или спирта.

В попытке решить проблему нежелательных изменений и колебаний цен, в документе US 5424421 (European Colour, опубликованном в 1995 г.) описан химический синтез карминовой кислоты в соответствии с путем синтеза, в котором участвуют различные промежуточные продукты.

Как рассмотрено, например, в WO 2006/056585 A1 (Chr. Hansen A/S), в процессе водной экстракции карминовой кислоты из насекомого, из насекомого также высвобождается некоторое количество белка насекомого, которое будет содержаться в экстракте краски, и при этом сообщалось, что белки кошенильной гли могут приводить к некоторым проблемам, связанным с аллергией. В WO 2006/056585 A1 описан конкретный способ уменьшения количества белка насекомого из экстрагирующего раствора из насекомых. Тем не менее, конечная полученная окрашивающая композиция/продукт по WO 2006/056585 A1 будет по-прежнему содержать некоторые количества белков насекомых *Dactylopius coccus costa*.

Структура карминовой кислоты показана в данном документе на фиг. 1. Как можно видеть на этой фигуре, она представляет собой так называемый C-глюкозид (т.е. в котором глюкоза связана/конъюгирована с аглюконом с помощью углерод-углеродной связи).

Как показано на фиг. 1, гидролиз C-глюкозида-карминовой кислоты может давать глюкозу и аглюкон-кормесовую кислоту (КА).

In vivo путь биосинтеза карминовой кислоты у насекомого (*Dactylopius coccus*) в настоящее время подробно не описан. Следовательно, исходя из предыдущего уровня техники, специалист в данной области не знает, какое именно соединение представляет собой аглюкон в ходе *in vivo* биосинтетического продуцирования карминовой кислоты у *Dactylopius coccus*.

Анализ *Dactylopius coccus* показал, что в экстрактах из *Dactylopius coccus* присутствует широкий спектр соединений, родственных карминовой кислоте, и многие из этих соединений в принципе могут быть подвергнуты глюкозилированию в ходе *in vivo* биосинтетического продуцирования карминовой кислоты.

Например, в публикации Stathopoulou et al. (*Analytica Chimica Acta* 804 (2013) 264- 272) были описаны шесть новых антрахинонов в экстракте *D. coccus*, и любой из этих шести новых антрахинонов (см., например, фиг. 1 публикации) в принципе мог быть молекулой, которая подвергается глюкозилированию в ходе *in vivo* биосинтетического продуцирования карминовой кислоты у *Dactylopius coccus*.

Дополнительно, как известно из уровня техники, первичное глюкозилированное соединение, образованное в ходе *in vivo* биосинтетического продуцирования глюкозидного конечного продукта, может представлять собой нестабильное промежуточное соединение, которое не будет выявляться в выделенном экстракте из *Dactylopius coccus*, что проанализировано например, в вышеуказанной публикации Stathopoulou et al.

Как понятно в настоящем контексте специалисту в данной области техники, исходя из предыдущего уровня техники можно предположить, что соответствующее первичное глюкозилированное соединение в ходе *in vivo* биосинтетического продуцирования карминовой кислоты у *Dactylopius coccus* может представлять собой, например, нестабильное промежуточное поликетидное соединение с примерно таким же числом атомов углерода, как, например, у флавокермесовой кислоты.

В настоящем документе соответствующая ДНК или аминокислотная последовательность гликозилтрансферазы, участвующие в *in vivo* пути биосинтеза карминовой кислоты у насекомого (*Dactylopius coccus*), в предыдущем уровне техники не описаны.

Как известно из уровня техники, у насекомых, которые накапливают низкомолекулярные химические вещества, соответствующие гены биосинтетического пути иногда отсутствуют в геноме насекомых.

Например, некоторые насекомые получают гликозиды из растений, которыми они питаются, см., например, публикацию Zagrobelny et al. (Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions; *Phytochemistry*. 2004 Feb; 65(3):293-306) или публикацию Geuder et al. (*Journal of Chemical Ecology*, Vol. 23, No 5, 1997).

Насекомые *Dactylopius coccus* питаются на растениях кактуса, и быть собой так, что насекомые *Dactylopius coccus* (как и другие насекомые) получают соответствующие гликозиды из кактусов, на которых они питаются.

Как известно из уровня техники, у насекомых, которые накапливают низкомолекулярные гликозиды, соответствующие гены биосинтетического пути иногда встречаются в микроорганизмах, живущих в этих насекомых, см. например публикацию Genta et al. (Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae), *Journal of Insect Physiology* 52 (2006) 593-601.

Следовательно, исходя из предыдущего уровня техники, специалист в данной области техники не мог знать, будет ли геном *Dactylopius coccus* действительно содержать ген, кодирующий гликозилтрансферазу, которая участвует в *in vivo* пути биосинтеза, приводящий к получению карминовой кислоты.

Поликетиды синтезируются группой ферментов, которые обычно называются поликетидсинтазами (PKS). Все PKS обладают способностью катализировать слияние ацильных групп, основанное на реакции конденсации Клайзена, путем образования углерод-углеродных связей с выделением диоксида углерода. Эта реакция катализируется бета-кетосинтазным доменом (KS). Помимо этого домена/активного участка, синтез также может зависеть, но не исключительно, от активности ацилпереносящего белка (ACP), ацилтрансферазы (AT), ацилтрансферазы-инициатора (SAT), матрицы продукта (PT), тиоэстеразы (TE), фактора длины цепи (CLF, также известного как KSP), циклазы Клайзена (CYC), кеторедуктазы (KR), дегидратазы (DH), эноилредуктазы (ER) и *S*-метилтрансферазы (Cmet). Субстраты для синтеза поликетидов обычно классифицируют на начальные звенья и удлиняющие звенья, причем начальное звено, включающее без ограничения ацетил-*CoA*, является первым добавляемым звеном растущей цепи поликетидов; а все удлиняющие звенья, например, но не исключительно, малонил-*CoA*, являются впоследствии добавляемыми звеньями, связанными углерод-углеродными связями.

На уровне первичной последовательности (аминокислотной последовательности), уровне вторичной структуры (локальная укладка), уровне третичной структуры (полная укладка) и уровне четвертичной структуры (белок-белковые взаимодействия) PKS демонстрируют очень большое разнообразие, и поэтому их подразделяют на различные типы.

Системы PKS I типа обычно встречаются у мицелиальных грибов и бактерий, где они ответственны за образование как ароматических, так и полиароматических и восстановленных поликетидов.

Члены PKS I типа обладают несколькими активными участками в одной и той же полипептидной цепи, и отдельный фермент способен катализировать повторную конденсацию двухуглеродных звеньев. Минимальный набор доменов в PKS I типа включает KS, AT и ACP. PKS I типа дополнительно подразделяют на модульные PKS и итеративные PKS, причем итеративные PKS имеют лишь одну копию активного участка каждого типа и их используют повторно до тех пор, пока растущая поликетидная цепь не достигнет своей предварительно заданной длины. В основе итеративной PKS I типа, которая образует ароматические и полиароматические соединения, обычно лежат домены PT и CYC для непосредственной укладки образовавшейся невосстановленной поликетидной цепи. Модульные PKS содержат несколько копий одних и тех же активных участков, которые организованы в виде повторяющихся последовательностей активных участков, которые называются модулями, причем каждый модуль отвечает за добавление и модификацию одного кетидного звена. Каждый активный участок в отдельных модулях используется лишь один раз во время синтеза одного поликетидов. Итеративные PKS I типа обычно встречаются у грибов, а модульные PKS I типа обычно встречаются у бактерий.

Системы PKS II типа отвечают за образование ароматических и полиароматических соединений у бактерий.

PKS II типа представляют собой белковые комплексы, в которых отдельные ферменты взаимодействуют с образованием функционального фермента PKS. Отдельные ферменты обладают видами активности, характерными для KS, CLF и ACP.

Этот тип PKS характеризуется тем, что он состоит из нескольких различных ферментов, образующих белковый комплекс, который в совокупности называют активной PKS. PKS II типа образуют невосстановленные поликетиды, которые спонтанно укладываются в сложные ароматические/циклические соединения. Тем не менее, в бактериальных системах укладка поликетидных остовов чаще всего сопровождается/управляется ферментами различных классов, действующих *in trans* (независимо от фермента PKS), способствуя прохождению неспонтанной укладки. Такие классы участвующих ферментов называют ароматазами и циклазами. Биосинтез одного полиароматического соединения в этих системах обычно предусматривает последовательное действие нескольких различных ароматаз/циклаз. Ароматазы и циклазы можно разделить на две группы на основе того, на каких типах субстратов они действуют: причем первая группа действует только на линейных поликетидных цепях и катализирует образование первой

ароматической/циклической группы, вторая же группа ферментов воспринимает только те субстраты, которые включают в себя ароматические или циклические группы (=продукты из первой группы ароматаз/циклаз). Была доказана невозможность функциональной экспрессии систем PKS II типа в подходящем для продуцирования хозяине (*E. coli*, *Bacillus*, дрожжи), вероятно из-за того, что они представляют собой мультиферментные комплексы, которые нуждаются в сбалансированном уровне экспрессии и могут зависеть от неизвестных факторов.

PKS III типа обычно состоят только из домена KS, который в литературе может называться, например, как KASIII или халконсинтазный домен, который действует независимо от домена ACP. Была описана PKS III типа от бактерий, растений и грибов.

PKS III типа уже давно известны в растениях, где они ответственны за образование таких соединений, как флавоноиды (пигменты/антиоксиданты) и стилбены, которые встречаются у многих различных видов растений. Продукты PKS III типа часто спонтанно укладываются в сложные ароматические/циклические соединения.

В публикации Yu et al. (2012) приведен обзор поликетидсинтаз III типа в природном биосинтезе продуктов. В публикации Yu et al. (2012) сказано: "PKS III типа являются автономными ферментами, которые образуют гомодимеры. Их единственный активный участок в каждом мономере итерационно катализирует реакции примирования, удлинения цепи и циклизации с образованием поликетидных продуктов. Несмотря на их структурную простоту, от PKS III типа производится широкий спектр соединений, таких как халконы, пироны, акридоны, флорглюцины, стилбены и резорциновые липиды. В последние годы PKS типа III привлекли больше внимания из-за их разнообразных продуктов, широкого распространения, относительно простых структур и легкой генетической манипулируемости. В данной публикации авторы системно рассматривают PKS III типа из растений, бактерий и грибов, а также последний прогресс в исследовании PKS III типа".

Вкратце, если исходить из предыдущего уровня техники, то специалист в данной области техники знает, является ли конкретная PKS, представляющая интерес, PKS I типа, II типа или III типа.

В дополнение к классификации PKS на основе структурной и функциональной организации белков альтернативная классификация основана на уровне модификаций, встречающихся в конечном поликетидном продукте. Следует отметить, что эти модификации могут быть введены либо самими PKS, либо ферментами, оказывающими действие впоследствии. В данной схеме классификации продукты делят на две группы: (I) невосстановленные и (II) восстановленные поликетиды. Невосстановленный тип характеризуется наличием кетонных групп в кетидах ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$), происходящих из начального или удлиняющего звена, либо в виде кетонов, либо в форме двойных связей в ароматических группах. В восстановленных поликетидных группах один или все кетоны были восстановлены до спиртовых ($-\text{CH}_2-\text{CHOH}-$) групп с помощью домена/фермента KR, или далее до алкеновой группой ($-\text{C}=\text{C}-$) с помощью домена/фермента DH, или еще далее до алканогруппы ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) с помощью домена/фермента ER. Исходя из этих химических свойств образовавшихся продуктов, участвующие в синтезе PKS подразделяют либо на невосстанавливающие PKS, либо на восстанавливающие PKS.

Укладка образовавшейся поликетидной цепи в сложные структуры с циклическими мотивами обычно представляет собой процесс, направляемый и катализируемый ферментами, оказывающими свое действие после PKS. Ответственные за это ферменты относятся к нескольким различным семействам ферментов, обычно ароматазам и/или циклазам. Итеративные PKS I типа у грибов являются особенными в том, что имеют домен PT, который отвечает за образование ароматических колец, в то время как домены CYS ответственны за высвобождение продукта, связанного с образованием ароматических колец. Ароматазы и циклазы, оказывающие действие на поликетиды, были описаны из таковых бактериальных и растительных систем. Кроме того, существует несколько примеров, когда укладка поликетидов является спонтанным процессом, например, в случае флавоноидов в растениях.

Были выделены и функционально охарактеризованы PKS от бактерий, грибов и растений. Тем не менее, не была описана ни одна PKS животного происхождения, а синтез поликетидов у насекомых в нескольких случаях был связан с метаболической активностью эндосимбиотических бактерий.

В публикации Tang, Y., et al. (2004) описано, что экспрессия в штамме CN999 бактерий *Streptomyces coelicolor*, который содержит хромосомную делению, затрагивающую весь кластер генов Act, ответственный за биосинтез актинородина. Мини-PKS (Act PKS=Act_KS, Act_CLF и Act_ACP), принадлежащая к PKS II типа, дает на выходе флавокермесовую кислоту (FK) (называемую TMAC в публикациях, посвященных исследованию бактерий) в случае сочетания с гетерологичной экспрессией ароматазы/циклазы ZhuI и циклазы ZhuJ из кластера генов zhu у *Streptomyces* sp. R1128.

Следовательно в данной публикации описано рекомбинантное введение гена PKS *Streptomyces* в клетку-хозяина *Streptomyces*, поэтому PKS не происходит из рода, отличного от рода клетки-хозяина.

На фиг. 2 настоящего документа показана фиг. 5A из публикации Tang, Y., et al. (2004). Как можно видеть на фигуре и как описано дополнительно в данной публикации, Act PKS (называемая октакетидсинтазой (OKS)) производит невосстановленный октакетид, и этот октакетид с помощью ароматазы/циклазы ZhuI и циклазы ZhuJ превращается в флавокермесовую кислоту (FK) (называемую TMAC). Соединения SEK4 и SEK4B также образуются спонтанно (структуры, показанные на фиг. 2, в данном

документе могут называться побочными продуктами).

Было показано, что в растении *Aloe arborescens* выявленные PKS производят поликетиды различной длины, в том числе октакетиды, см., например, Mizuuchi et al. (2009), где на фиг. 1 проиллюстрировано, что октакетидсинтазы (OKS), называемые PKS4 и PKS5, могут производить невосстановленный октакетид с использованием малонил-СоА в качестве удлиняющих звеньев. Также спонтанно образуются побочные соединения SEK4 и SEK4B.

Растение *Hypericum perforatum* (зверобой) также содержит октакетидсинтазы, см., например, Karpinen et al. (2008), где описано, что PKS, называемая HpPKS2, была экспрессирована у *E. coli* с последующей очисткой и биохимической характеристикой *in vitro* этого фермента. На фиг. 1 данной публикации проиллюстрировано, что PKS, называемая HpPKS2, образует невосстановленный октакетид (с использованием ацетил-СоА в качестве начального звена и малонил-СоА в качестве удлиняющих звеньев), а побочные продукты SEK4 и SEK4B образуются спонтанно.

В публикации Yu et al. (2012) приведен обзор роли поликетидсинтаз III типа в природном биосинтезе продуктов; в публикации на с. 293 сказано: "Были сконструированы различные PKS III типа в *E. coli* для создания новых поликетидов. Продуктирование специфичных для растений куркуминоидов было воспроизведено в *E. coli* путем совместной экспрессии CUS с фенилаланинаммиаклиазой из *Rhodotorula rubra* и 4-кумарат:СоА-лигазой (4CL) из *Lithospermum erythrorhizon*". Как поясняется в данной публикации, PKS, называемая "CUS", синтезирует дикетид-СоА, а следовательно CUS не является октакетидсинтазой.

В публикации Jadhav et al. (2014) описано, что гексакетидную PKS III типа из *Plumbago zeylanica* (PzPKS) клонировали и экспрессировали в растениях табака для изучения того, синтезируют ли трансгенные растения табака, экспрессирующие PzPKS, фармакологически важный поликетид плюмбагин.

Ни в одной из вышеупомянутых публикаций, посвященных PKS, продуцирование карминовой кислоты не рассматривалось.

Не ограничиваясь теорией, полагают, что в предыдущем уровне техники не описано, что относящиеся к настоящему изобретению PKS III типа, октакетидсинтазы (OKS), могут быть активны *in vivo* в гетерологичной продуцирующей клетке-хозяине другого рода, например OKS типа III от растения может вырабатывать невосстановленные октакетиды *in vivo* в гетерологичной продуцирующей клетке-хозяине, например, такой как рекомбинантная продуцирующая клетка-хозяин *Aspergillus*.

Патентная заявка PCT/EP 2014/078540 была подана 18 декабря 2014 г. На дату подачи/приоритета настоящей патентной заявки заявка PCT/EP 2014/078540 опубликована не была. В ней описана гликозилтрансфераза (GT), выделенная из насекомого *Dactylopius coccus costa*, которая способна (I) конъюгировать глюкозу с флавокермесовой кислотой (FK) и/или (II) конъюгировать глюкозу с кермесовой кислотой (KA), а также применение такой GT, например, для получения карминовой кислоты.

В PCT/EP 2014/078540 отсутствует непосредственное и недвусмысленное описание рассматриваемых в данном документе целевых невосстановленных октакетидов и/или поликетидсинтаз (PKS).

Краткое описание изобретения

Задача, подлежащая решению с помощью настоящего изобретения, относится к созданию подходящего пути биосинтеза, который может привести к получению карминовой кислоты.

Преимущество создания такого подходящего пути биосинтеза, который описан в данном документе, заключается в том, что оно открывает возможность для гетерологичного продуцирования (например, у *Aspergillus* или дрожжей) карминовой кислоты без необходимости экстракции из насекомых и получения тем самым окрашивающей композиции/продукта на основе карминовой кислоты, которая не содержит нежелательных белков насекомых *Dactylopius coccus costa*.

Одна часть решения относится к тому, что авторами настоящего изобретения был найден экстракт *Dactylopius coccus* (в том числе экстракты эндосимбионтов, присутствующих в *Dactylopius coccus*) с относящейся к настоящему изобретению гликозилтрансферазной активностью GT. Как рассмотрено в данном документе, авторами настоящего изобретения проанализирована GT и выявлено, что она способна (I) конъюгировать глюкозу с флавокермесовой кислотой (FK) и/или (II) конъюгировать глюкозу с кермесовой кислотой (KA). Следовательно эту GT можно применять, например, для получения карминовой кислоты.

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая описанную в данном документе выделенную/клонированную новую гликозилтрансферазу *Dactylopius coccus costa*, показана в данном документе под SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность полипептида показана в данном документе под SEQ ID NO: 2.

Гликозилтрансферазный фермент под SEQ ID NO: 2, относящийся к настоящему изобретению, в данном документе может называться "DcUGT2" или просто "DcUGT".

На фиг. 1 приведено схематическое представление относящейся к настоящему изобретению гликозилтрансферазной активности описанной в данном документе выделенной/клонированной гликозилтрансферазы DcUGT, приведенной в данном документе под SEQ ID NO: 2, при этом, как проиллюстрировано на фигуре, было установлено, что она способна конъюгировать глюкозу с агликонами флавокермесовой кислоты (FK) и кермесовой кислоты (KA).

Исходя из предыдущего уровня техники, специалист в данной области техники не знает, какое именно соединение представляет собой первичное гликозилированное соединение в ходе биосинтетического продуцирования карминовой кислоты *in vivo* у *Dactylopius coccus*.

Авторами настоящего изобретения было продемонстрировано, что *Dactylopius coccus* содержит GT, которая способна С-гликозилировать флавокермесовую кислоту (FK) и/или кермесовую кислоту (КА). Соответственно и не ограничиваясь теорией вполне вероятно, что флавокермесовая кислота (FK) и/или кермесовая кислота (КА) являются подходящими аглюконами, например, для гетерологичного биосинтеза *in vivo*, например карминовой кислоты.

Исходя из этих фактов, можно предположить, что флавокермесовая кислота (FK) и/или кермесовая кислота (КА) являются подходящими агликонами, например, для гетерологичного биосинтеза *in vivo*, например карминовой кислоты, авторами настоящего изобретения было определено, что относящиеся к настоящему изобретению гликозилтрансферазы также могут быть выявлены в растениях *Aloe*, растениях *Haworthia* и растениях *Sorghum* или риса.

Выявив возможные подходящие аглюконы, авторы настоящего изобретения смогли вернуться назад и попытаться выявить подходящие предварительные промежуточные соединения, которые могут подойти для биосинтеза *in vivo* соответствующих аглюконов (например, FK/КА).

Как обсуждалось в демонстрационном примере 6, авторами настоящего изобретения были рекомбинантно экспрессированы растительные (*Aloe arborescens* (AaOKS) и/или *Hypericum perforatum* (HrPKS2)) поликетидсинтазы (PKS) III типа, октакетидсинтазы (OKS) у *Aspergillus nidulans*, и было выявлено, что OKS действительно функционировали у гетерологичного хозяина, при этом были получены невосстановленные октакетиды *in vivo* в клетках *Aspergillus nidulans*. Невосстановленные октакетиды являются нестабильными, и выявление того, что невосстановленные октакетиды присутствовали *in vivo*, верифицировали по накоплению побочных продуктов/продуктов распада SEK4 и SEK4B (см. фиг. 2 в данном документе и вышеприведенное рассмотрение предыдущего уровня техники+пример 6 в данном документе).

Как рассмотрено в заключительном абзаце демонстрационного примера 6 данного документа, экспрессия PKS III типа (HrPKS2 или AaOKS) приводила к продуцированию различных соединений, в том числе соединения SEK4, SEK4B и флавокермесовой кислоты (FK) *in vivo* у *Aspergillus nidulans*. Поскольку в этом примере 6 в штаммы *Aspergillus* не были включены с помощью вставки гетерологичные циклазы и/или ароматазы и при этом было выявлено соединение FK, то это указывает на то, что штаммы *Aspergillus* могут содержать гомологичные циклазы и/или ароматазы, способные превращать невосстановленный октакетид в соединение FK *in vivo*.

Как рассмотрено в заключительном абзаце демонстрационного примера 8 настоящего документа, авторами настоящего изобретения была осуществлена коэкспрессия гетерологичной растительной PKS (AaOKS) и гликозилтрансферазы (DcUGT2) в *Aspergillus nidulans*, и это привело к *in vivo* продуцированию карминовой кислоты (CA) и DcII.

Что касается экспериментальной работы авторов настоящего изобретения в отношении гетерологичной экспрессии/продуцирования в растении *Nicotiana benthamiana* (близком родственнике растения табака), то как рассмотрено в заключительном абзаце демонстрационного примера 11 в данном документе, результаты этого примера 11 продемонстрировали, что:

(i) ген AaOKS PKS растения *Aloe arborescens* был транзистентно экспрессирован у *N. benthamiana* и *in vivo*, что привело к образованию SEK4 и SEK4B, которое продемонстрировало, что AaOKS может функционировать как активная октакетидсинтаза *in vivo* в *N. benthamiana*;

(ii) поскольку антрон флавокермесовой кислоты (FK) или FK не наблюдался в случае если была агроинфильтрована только AaOKS, то *N. benthamiana* может не иметь эндогенных ферментов для дальнейшей метаболизации невосстановленного октакетид в эти соединения;

(iii) гены циклаз ZhuI и ZhuJ *Streptomyces* sp. R1128 были совместно агроинфильтрованы (т.е. они коэкспрессировались *in vivo*) с AaOKS, и наблюдали *in vivo* продуцирование/накопление различных соединений, в том числе FK. Следовательно, гетерологичная экспрессия генов циклаз *Streptomyces* R1128 приводила к *in vivo* продуцированию различных соединений, в том числе FK;

(iv) *in vivo* продуцирование DcII и карминовой кислоты (CA) обнаруживали в случае если DcUGT2_ коэкспрессировался с AaOKS, ZhuI и ZhuJ у *N. benthamiana*.

Следовательно, авторами настоящего изобретения было продемонстрировано, что:

(I) рекомбинантно введенный ген поликетидсинтазы, подобной поликетидсинтазе III типа (PKS), кодирующий октакетидсинтазу (OKS) (например, такую как *Aloe arborescens* (AaOKS) и/или *Hypericum perforatum* (HrPKS2)), и где OKS происходит из рода, отличного от рода клетки-хозяина (например, такого как клетка-хозяин гриба *Aspergillus nidulans* или клетка-хозяин растения *Nicotiana benthamiana*), способен превращать подходящие начальные звенья и удлиняющие звенья в невосстановленный октакетид в условиях, подходящих для роста, а затем происходит *in vivo* продуцирование невосстановленного октакетид; и

(II) невосстановленный октакетид, полученный на стадии (I), можно превратить *in vivo* в растущей рекомбинантной клетке-хозяине в C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение агликона (например, флавокерме-

совую кислоту (FK) или кермесовую кислоту (КА)), представляющие интерес, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, не является SEK4 и/или SEK4B (т.е. SEK4 и/или SEK4B получаются спонтанно из невосстановленного октакетида и могут в данном документе называться побочными продуктами);

(III) если рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит ген гликозилтрансферазы, кодирующий гликозилтрансферазу, то полученное на стадии (II) ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, может быть подвергнуто *in vivo* гликозилированию гликозилтрансферазой с получением представляющего интерес C_{14} - C_{34} -ароматического соединения гликозида (например, карминовой кислоты (CA) или DcII).

Полагают, что вышеуказанную стадию (II) саму по себе можно рассматривать как новый значительный вклад с помощью настоящего изобретения в существующий уровень техники, поскольку из предыдущего уровня техники специалист в данной области техники не мог знать наверняка, что на стадии (I) полученный невосстановленный октакетид будет "свободно" доступен *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине другого рода для фактического превращения в другое ароматическое соединение агликона, представляющее интерес (например, флавокермесовую кислоту (FK)), а не только в спонтанно образующиеся соединения SEK4 и/или SEK4B.

Как обсуждалось в данном документе, может быть предпочтительным, чтобы *in vivo* превращение невосстановленного октакетида осуществлялось посредством участия действующих *in trans* (независимо от фермента PKS) ароматаз/циклаз.

Как обсуждалось выше, экспериментальная работа авторов настоящего изобретения, рассматриваемая в демонстрационных примерах данного документа, продемонстрировала, что является возможным производить гетерологичное *in vivo* продуцирование, например, карминовой кислоты (CA) насекомого *Dactylopius costa* в различных рекомбинантных продуцирующих клетках-хозяевах, таких как клетки гриба *Aspergillus nidulans* или клетки растения *Nicotiana benthamiana* (близкого родственника растения табака).

Как обсуждалось выше, в настоящее время карминовую кислоту (CA) можно получить лишь путем непосредственного выделения из тел насекомых *Dactylopius* или посредством химического синтеза карминовой кислоты путем, в котором участвуют различные промежуточные продукты (US 5424421).

Следовательно его можно рассматривать в качестве основного вклада в уровень техники, поскольку в данном документе продемонстрировано, что можно осуществлять *in vivo* гетерологичное продуцирование карминовой кислоты (CA), например, в клетках гриба *Aspergillus* или в клетках растения *Nicotiana*.

Как понятно в настоящем контексте специалисту в данной области техники, на основе новой технической информации, раскрытой в данном документе, нет оснований полагать, что не будет возможным осуществить *in vivo* гетерологичное продуцирование в рекомбинантной клетке различных соединений, представляющих интерес, которые являются октакетидными производными, например, таких как C_{14} - C_{34} -ароматические соединения, представляющие интерес, где примерами такого C_{14} - C_{34} -ароматического соединения могут являться, например, мутакин (см., например, фиг. 2 в вышерассмотренной публикации Tang, Y. et al. (2004)); эмодин, гиперидин или псевдогиперидин (см., например, фиг. 1 в вышерассмотренной публикации Karppinen et al. (2008)) или барбалоин (см., например, фиг. 1 и 4 в вышерассмотренной публикации Mizuuchi et al. (2009)); или карминовая кислота (CA).

Как понятно в настоящем контексте специалисту в данной области техники, на стадии (II) способа согласно первому аспекту, который описан в данном документе, конкретные типы *in vivo* полученных конкретных C_{14} - C_{34} ароматических соединений аглюконов (таких как, например, флавокермесовая кислота (FK) или кермесовая кислота (КА)) в целом будут зависеть от ферментов, оказывающих свое действие после PKS (например, гомологичных или гетерологичных ароматаз и/или циклаз), присутствующих в используемой рекомбинантной клетке-хозяине.

Например, в предыдущем уровне техники описано множество различных ароматаз и/или циклаз, которые специалист в данной области техники может применять для создания представляющего интерес конкретного C_{14} - C_{34} ароматического агликона на стадии (II) способа согласно первому аспекту, который описан в данном документе.

Исходя из результатов, рассмотренных в данном документе, на фиг. 3 данного документа представлен пример модели подходящего пути биосинтеза, который может приводить к получению карминовой кислоты.

Вкратце, пример модели пути биосинтеза предусматривает следующие стадии:

- (i) применение октакетидсинтазы PKS III типа для получения невосстановленного октакетида;
- (ii) превращение невосстановленного октакетида с помощью действующих *in trans* (независимо от фермента PKS) ароматаз/циклаз в флавокермесовую кислоту (FK) и/или кермесовую кислоту (КА); и
- (iii) (1) аглюкон-кермесовую кислоту (КА) подвергают гликозилированию с получением карминовой кислоты CA; или
- (2) FK подвергают гликозилированию с получением DcII, который дополнительно подвергают гидроксиглированию с получением карминовой кислоты (CA).

Как обсуждалось выше, и не ограничиваясь теорией, полагают, что в предыдущем уровне техники

не описано то, что относящиеся к настоящему изобретению октакетидсинтазы (OKS) PKS III типа могут быть активны *in vivo* в гетерологичной продуцирующей клетке-хозяине другого рода, например, OKS типа III от растения способна создавать невосстановленные октакетиды *in vivo* в гетерологичной продуцирующей клетке-хозяине, например, такой как рекомбинантная продуцирующая клетка-хозяин *Aspergillus*.

Как обсуждалось выше, из предыдущего уровня техники известно, что невосстановленные октакетиды могут быть *in vivo* превращены в различные ароматические соединения, представляющие интерес, которые являются октакетидными производными, причем конкретный тип ароматического соединения, представляющего интерес, обычно будет зависеть от конкретных ферментов, оказывающих свое действие после PKS (например, ароматазы и/или циклазы), присутствующих *in vivo* в клетке-хозяине.

Например, на фиг. 1 вышерассмотренной публикации Karppinen et al. (2008) показано, что невосстановленные октакетиды могут у *H. perforatum* быть *in vivo* превращены в ароматические соединения эмоидина - антрон и/или эмодин (антрахинон).

На фиг. 1 вышерассмотренной публикации Mizuuchi et al. (2009) показано, что невосстановленный октакетид может у *A. arborescens* быть *in vivo* превращен в ароматическое октакетидное соединение антрона барбалоина.

Соответственно первый аспект настоящего изобретения относится к способу получения представляющего интерес ароматического соединения, являющегося октакетидным производным, где способ предусматривает следующие стадии:

(I) приведение в контакт *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине, содержащей рекомбинантно введенный ген поликетидсинтазы (PKS) III типа, кодирующий октакетидсинтазу (OKS), и где OKS происходит из рода, отличного от рода клетки-хозяина:

(i) подходящего начального звена и удлиняющих звеньев с рекомбинантно введенной OKS, способной превращать начальное и удлиняющие звенья в невосстановленный октакетид в подходящих условиях, где обеспечивают образование невосстановленного октакетида *in vivo*; и

(II) превращение *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине невосстановленного октакетида, полученного на стадии (I), в C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, не является SEK4 и/или SEK4B; и

(III) необязательно рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит ген гликозилтрансферазы, кодирующий гликозилтрансферазу, и полученное на стадии (II) ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, подвергается *in vivo* гликозилированию гликозилтрансферазой с получением C₁₄-C₃₄-ароматического соединения гликозида, представляющего интерес; и

(IV) выделение представляющего интерес ароматического соединения агликона, полученного на стадии (II), и/или представляющего интерес ароматического соединения гликозида, полученного на стадии (III), с получением композиции, где композиция содержит менее 1% вес./вес. сухого вещества материала рекомбинантной клетки-хозяина.

Как обсуждалось выше, авторами настоящего изобретения были рекомбинантно экспрессированы растительные (*Aloe arborescens* и/или *Hypericum perforatum*) поликетидсинтазы (PKS) III типа, октакетидсинтазы (OKS) у *Aspergillus nidulans*, и при этом было выявлено, что OKS действительно функционировали у гетерологичного хозяина. Соответственно примером клетки-хозяина из стадии (I) может являться, например, *Aspergillus nidulans*, а примером PKS/OKS III типа, полученного на стадии (I), может являться, например, OKS из *Aloe arborescens* и/или *Hypericum perforatum*.

Как обсуждалось выше и как известно из уровня техники, невосстановленные октакетиды могут *in vivo* спонтанно превращаться в соединения SEK4 и SEK4B (структуры, показанные на фиг. 2, могут называться побочными продуктами).

Как понятно в настоящем контексте специалисту в данной области техники, выявление SEK4 и/или SEK4B *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине демонстрирует, что невосстановленный октакетид присутствует *in vivo*.

Соответственно и как понятно специалисту в данной области, октакетидсинтаза (OKS) III типа, полученного на стадии (I), может быть определена как OKS, которая *in vitro* способна производить октакетидные побочные продукты SEK4 и/или SEK4B.

Испытание такого анализа *in vitro* описано, например, в демонстрационном примере 9 данного документа.

Как обсуждалось выше, термин "поликетидсинтаза (PKS) III типа" хорошо известен специалисту в данной области техники, и следовательно специалист в данной области техники сможет согласно обычной практике выявить, должна ли под PKS, представляющей интерес, пониматься PKS III типа, а следовательно, не PKS I типа или II типа.

Как обсуждалось выше, из предыдущего уровня техники известно, что невосстановленные октакетиды могут быть *in vivo* превращены в различные октакетидные ароматические соединения, представляющие интерес, и это обычно будет зависеть от конкретных ферментов, оказывающих свое действие после PKS (например, ароматазы и/или циклазы), присутствующих *in vivo* в клетке-хозяине.

Соответственно и как понятно в настоящем контексте специалисту в данной области, превращение

на стадии (II) невосстановленного октакетиды в C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, обычно происходит с участием подходящих ферментов, оказывающих свое действие после PKS (например, ароматазы и/или циклазы), присутствующих *in vivo* в клетке-хозяине.

Ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, полученного на стадии (II), в принципе может представлять собой любое относящееся к настоящему изобретению C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, например, такое как ароматическое соединение антрахинона или ароматическое соединение антрона (подробнее см. ниже).

Как обсуждалось выше, авторами настоящего изобретения было выявлено, что флавокермесовая кислота (FK) присутствовала в клетках *Aspergillus nidulans*, содержащих рекомбинантно введенные OKS III типа из *Aloe arborescens* и/или *Hupericum perforatum*.

Как флавокермесовая кислота (FK), так и кермесовая кислота (КА) имеют 16 атомов углерода (С), они подразумеваются как примеры C₁₆-ароматических соединений агликона и в качестве примеров таких C₁₄-C₃₄-ароматических соединений агликона, представляющих интерес, на стадии (II).

Как обсуждалось в данном документе, если на стадии (IV) выделенным ароматическим соединением агликона, представляющим интерес, является FK, то оно может быть, например, *in vitro*, посредством гликозилирования превращено в DcII, а затем в карминовую кислоту (СА) (см., например, фиг. 3 в данном документе).

Как обсуждалось в данном документе, другим необязательным альтернативным примером может являться то, что клетка-хозяин также *in vivo* экспрессирует гликозилтрансферазу, относящуюся к настоящему изобретению, и на стадии (III) *in vivo* в клетке-хозяине продуцируют, например, DcII и/или карминовую кислоту (СА). Это можно рассматривать как пример необязательной стадии (III) согласно первому аспекту.

В демонстрационных примерах в данном документе показаны предпочтительные примеры этой необязательной альтернативы.

Как DcII, так и/или карминовая кислота (СА) представляют собой гликозиды, и агликоновая часть (т.е. не включающая в себя глюкозу) этих соединений имеет 16 атомов углерода (С).

Соответственно оба этих соединения DcII и/или карминовая кислота (СА) в данном документе подразумеваются как примеры C₁₆ ароматических соединений гликозидов и в качестве примеров таких C₁₄-C₃₄ ароматических соединений гликозидов, представляющих интерес, на необязательной стадии (III).

Как понятно в настоящем контексте специалисту в данной области техники, стадия выделения (IV) фактически относится к стадии выделения/очистки ароматического соединения, представляющего интерес, из материала рекомбинантной клетки-хозяина (или среды культивирования/выращивания, если клетка-хозяин представляет собой, например, клетку гриба/микроорганизма).

Авторами настоящего изобретения было выявлено, что флавокермесовая кислота (FK) присутствовала в клетках *Aspergillus nidulans*, содержащих рекомбинантно введенные OKS III типа из *Aloe arborescens* и/или *Hupericum perforatum*.

Можно сказать, что довольно неожиданным является то, что в предыдущем уровне техники не описано, что относящиеся к настоящему изобретению PKS III типа октакетидсинтазы (OKS) могут быть активны *in vivo* в гетерологичной продуцирующей клетке-хозяине другого рода, например, OKS типа III от растения может вырабатывать невосстановленные октакетиды *in vivo* в гетерологичной продуцирующей клетке-хозяине, например, такой как рекомбинантная продуцирующая клетка-хозяин *Aspergillus*.

Как обсуждалось выше, в предыдущем уровне техники описаны многочисленные примеры тестов *in vitro* на различных ферментах OKS. Тем не менее, нигде в предыдущем уровне техники не описано, что OKS функционирует *in vivo* в клетке-хозяине другого рода.

Не ограничиваясь теорией, OKS III типа может функционировать в гетерологичном хозяине, в случае если OKS защищена *in vivo* от распада (например, посредством образования метаболитов/комплексов с другими белками). Такой механизм распада отсутствует *in vitro*.

Тот факт, что OKS функционирует в клетках растений *Aspergillus nidulans* и *Nicotiana* демонстрирует, что клетки растений способны защищать гетерологичную рекомбинантную введенную OKS.

Полагают, что это можно рассматривать как общий момент, т.е. эти защитные системы также будут присутствовать во многих других типах клеток-хозяев (например, таких как дрожжи, растения табака и т.д.).

Кроме того, октакетидный продукт OKS спонтанно распадается на SEK4 и/или SEK4B, что может ингибировать фермент в *in vivo* концентрациях. В случае присутствия метаболизирующего октакетиды PKS не будут ингибироваться с помощью SEK4 и/или SEK4B и остаются активными.

В заключение, подходящим способом получения активной OKS является ее экспрессия вместе с ферментами, метаболизирующими октакетиды и/или образующими комплексы с ферментами. Эти ферменты могут исходно присутствовать в клетках, экспрессирующих введенную OKS, или могут быть введены рекомбинантно.

Описанный в данном документе факт, что флавокермесовая кислота (FK) присутствовала в клетках *Aspergillus nidulans*, содержащих рекомбинантно введенную OKS III типа из *Aloe arborescens* и/или *Hupericum perforatum*, демонстрирует, что клетки *Aspergillus nidulans* содержат ферменты (например, аро-

матазы/циклазы), метаболизирующие полученный невосстановленный октакетид.

Не ограничиваясь теорией, полагают, что это можно рассматривать как общий момент, т.е. такие циклазы и/или ароматазы также будут присутствовать во многих других типах клеток-хозяев (например, таких как дрожжи, растения табака и т.д.).

Определения.

Все определения терминов, относящихся к настоящему изобретению, соответствуют тому, что будет пониматься специалистом в данной области техники применительно к техническому контексту, относящемуся к настоящему изобретению.

Термин "агликон" означает неуглеводную часть соответствующей гликозилированной формы агликона. В случае если сахар представляет собой глюкозу, то агликон может называться аглюконом. Дополнительно, в случае если сахар представляет собой глюкозу, то вместо термина "гликозилированный" можно применять термин "гликозилированный".

В случае если агликон гликозилирован по гидроксигруппе, то обычно образуется так называемая O-гликозидная связь, т.е. так называемый O-гликозид (или O-глюкозид, если сахар представляет собой глюкозу).

В случае если агликон гликозилирован с участием углерод-углеродной связи, она может в данном документе называться C-гликозидной связью, т.е. так называемым C-гликозидом (или C-глюкозидом, если сахар представляет собой глюкозу).

Термин "гликозид" означает соединение, которое при гидролизе может давать сахар и несакхарный (агликоновый) остаток, например глюкозиды могут давать глюкозу, галактозиды могут давать галактозу.

Термин "гликозилтрансфераза" означает фермент, способный конъюгировать сахар, активированный нуклеотидом, с соединением (например, соединением агликона). Сахар может представлять собой, например, D- и L-изомеры галактозы, глюкозамина, N-ацетилглюкозамина, ксилозы, глюкуроновой кислоты, рамнозы, арабинозы, маннозы или глюкозы. Как альтернатива, сахар может представлять собой производное углевода, например, такое как инозит, оливоза, родиноза и т.д., доступные в виде нуклеотидных дифосфатов. Дополнительно сахар может представлять собой, например, моносахарид, дисахарид или трисахарид. В случае олиго- и полисахаридов сахара связываются друг с другом, например, с участием одной или нескольких гликозилтрансфераз. Если сахар представляет собой глюкозу, то гликозилтрансфераза может называться глюкозилтрансферазой.

В случае если гликозилтрансфераза конъюгирует сахар, активированный нуклеотидом, с соединением посредством C-гликозидной связи, то в данном документе она может называться C-гликозилтрансферазой.

В случае если гликозилтрансфераза конъюгирует сахар с аглюконом с помощью O-гликозидной связи, то в данном документе она может называться O-гликозилтрансферазой.

Термин "гибридируется" применительно к полинуклеотиду, который гибридизуется в условиях по меньшей мере средней жесткости с (i) нуклеотидами 1-1548 из SEQ ID NO: 1 или (ii) комплементарной (i) цепью, относится к нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется с меченным зондом нуклеиновой кислоты, соответствующим нуклеотидной последовательности, показанной под SEQ ID NO: 1, или комплементарной ей цепи, в условиях от средней до очень высокой жесткости. Молекулы, с которыми в этих условиях гибридизуется зонд нуклеиновой кислоты, могут быть обнаружены, например, с помощью рентгеновской пленки.

Условия жесткости при гибридизации, относящиеся к настоящему изобретению, представляют собой условия жесткости, которые специалист в данной области обычно будет понимать как соответствующие, т.е. для условий средней жесткости условия, которые специалист в данной области техники будет понимать как условия средней жесткости. Специалист в данной области знает условия жесткости при гибридизации, относящиеся к настоящему изобретению, см. например (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York).

В соответствии с известным уровнем техники в случае длинных зондов, длина которых составляет по меньшей мере 100 нуклеотидов, условия от очень низкой до очень высокой жесткости определяют как предгибридизацию и гибридизацию при 42°C в 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 мкг/мл дегидратированной в результате гидродинамического сдвига и денатурированной ДНК спермы лосося, а также либо 25% формамида для очень низкой и низкой жесткости, либо 35% формамида для средней и средне-высокой жесткости, либо 50% формамида для высокой и очень высокой жесткости в соответствии со стандартными процедурами Саузерн-блоттинга, оптимально в течение 12-24 ч.

В случае длинных зондов, длина которых составляет по меньшей мере 100 нуклеотидов, материал-носитель по окончании промывают трижды каждый раз в течение 15 мин с помощью 2X SSC, 0,2% SDS предпочтительно по меньшей мере при 45°C (очень низкая жесткость), более предпочтительно по меньшей мере при 50°C (низкая жесткость), более предпочтительно по меньшей мере при 55°C (средняя жесткость), еще более предпочтительно по меньшей мере при 60°C (средне-высокая жесткость), еще более предпочтительно по меньшей мере при 65°C (высокая жесткость) и наиболее предпочтительно по меньшей мере при 70°C (очень высокая жесткость).

Термин "in vitro" (латинское: в лабораторном сосуде) относится к исследованиям, которые проводят

с использованием компонентов организма, которые были выделены из их обычного биологического окружения, с целью обеспечения более подробного или более удобного анализа, чем это можно сделать с целыми организмами. В разговорной речи эти эксперименты обычно называют "экспериментами в пробирках". Напротив, исследования *in vivo* представляют собой исследования, которые проводят с живыми организмами в их нормальном интактном состоянии.

Термин "*in vivo*" (латинское: "внутри живого существа") относится к проведению эксперимента с использованием целого живого организма, в отличие от частичного или мертвого организма или контролируемой среды *in vitro* ("в лабораторном сосуде", например в пробирке или чашке Петри).

Термин "выделенный полинуклеотид" фактически относится в данном документе в том отношении, что полинуклеотид выделен из его природной среды. Другими словами, что полинуклеотидный препарат фактически не содержит другого полинуклеотидного материала, с которым он исходно связан. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая описанную в данном документе выделенную/клонированную новую гликозилтрансферазу, показана под SEQ ID NO: 1 и была выделена из насекомого *Dactylopius coccus*. Соответственно, как понятно специалисту в данной области, используемый в данном документе термин "выделенный полинуклеотид" не охватывает полинуклеотида под SEQ ID NO: 1, поскольку в норме он присутствует в геноме *Dactylopius coccus*. Термин "выделенный полинуклеотид" фактически относится к тому, что выделенный полинуклеотид имеет форму, подходящую для применения в генетически сконструированных системах для продуцирования белка. Таким образом, выделенный полинуклеотид содержит не более 10 вес.%, предпочтительно не более 8 вес.%, более предпочтительно не более 6 вес.%, более предпочтительно не более 5 вес.%, более предпочтительно не более 4 вес.%, более предпочтительно не более 3 вес.%, еще более предпочтительно не более 2 вес.%, наиболее предпочтительно не более 1 вес.% и еще наиболее предпочтительно не более 0,5 вес.% другого полинуклеотидного материала, с которым он изначально связан. В данном документе термин "выделенный полинуклеотид" может, в качестве альтернативы, называться "клонированным полинуклеотидом".

Термин "выделенный полипептид" фактически относится в данном документе к тому, что полипептид выделен из его природной среды. Новый полипептид гликозилтрансферазы, описанный в данном документе, который показан в данном документе под SEQ ID NO: 2, был выделен из насекомого *Dactylopius coccus*. Соответственно, как понятно в настоящем контексте специалисту в данной области техники, используемый в данном документе термин "выделенный полипептид" не охватывает полипептид гликозилтрансферазы под SEQ ID NO: 2, поскольку в норме он присутствует в геноме *Dactylopius coccus*. Термин "выделенный полипептид" означает в данном документе полипептидный препарат, который содержит не более 10 вес.%, предпочтительно не более 8 вес.%, более предпочтительно не более 6 вес.%, более предпочтительно не более 5 вес.%, более предпочтительно не более 4 вес.%, не более 3 вес.%, еще более предпочтительно не более 2 вес.%, наиболее предпочтительно не более 1 вес.% и еще наиболее предпочтительно не более 0,5 вес.% другого полипептидного материала, с которым он изначально связан, как понятно в настоящем контексте специалисту в данной области, термин "другой полипептидный материал, с которым он изначально связан" может относиться к описанному в данном документе новому полипептиду гликозилтрансферазы, который показан под SEQ ID NO: 2, наблюдаемому в связи с другим полипептидным материалом, с которым он изначально связан у *Dactylopius coccus*. В некотором случае может быть предпочтительным, чтобы "выделенный полипептид" относился к полипептиду, который характеризуется по меньшей мере 20% чистотой, предпочтительно по меньшей мере 40% чистотой, более предпочтительно по меньшей мере 60% чистотой, еще более предпочтительно по меньшей мере 80% чистотой, наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% чистотой и еще наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% чистотой, как определено с помощью SDS-PAGE.

Термин "невосстановленный октакетид" означает невосстановленный октакетид, причем невосстановленный тип характеризуется наличием изначально присутствующих кетоновых групп в кетидях ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$), происходящих из начального или удлиняющего звеньев, либо в виде кетонов, либо в виде двойных связей в ароматических группах. В восстановленных поликетидях один или все кетоны были восстановлены до спиртовых ($-\text{CH}_2-\text{CHOH}-$) групп, например, с помощью домена/фермента KR, или далее до алкеновой группы ($-\text{C}=\text{C}-$), например, с помощью домена/фермента DH, или еще далее до алканогруппы ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), например, с помощью домена/фермента ER. Исходя из этих химических свойств образовавшихся продуктов, участвующие в синтезе PKS подразделяют либо на невосстанавливающие PKS, либо на восстанавливающие PKS.

Термин "невосстанавливающая PKS" или "невосстанавливающая поликетидсинтаза" означает PKS, который не восстанавливает кетоновые группы в образованной поликетидной цепи. Отсутствие восстановлений может быть обусловлено, например, (I) отсутствием необходимых кеторедуктазных (KR) активных участков в ферменте и/или (II) отсутствием обслуживающих ферментов, способных катализировать реакцию кетовосстановления.

Термин "конструкция нуклеиновой кислоты", используемый в данном документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, либо одно-, либо двухцепочечной, которая выделена из гена, встречающегося в природе, или которая модифицирована таким образом, чтобы она содержала сегменты нуклеиновых кислот, которые в ином случае не существовали бы в природе. Термин "конструкция нуклеиновой

кислоты" является синонимом термина "кассета экспрессии", в случае если конструкция нуклеиновой кислоты содержит управляющие последовательности, необходимые для экспрессии кодирующей последовательности по настоящему изобретению. Как известно из уровня техники, управляющие последовательности включают все компоненты, которые необходимы или целесообразны для экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид по настоящему изобретению. Каждая управляющая последовательность может быть нативной или чужеродной для нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид. Эти управляющие последовательности предусматривают без ограничения лидер, последовательность полиаденилирования, последовательность пропептида, промотор, последовательность сигнального пептида и терминатор транскрипции. Как минимум к управляющим последовательностям относятся промотор и сигналы остановки транскрипции и трансляции. Управляющие последовательности могут быть снабжены линкерами с целью введения конкретных сайтов рестрикции, облегчающих лигирование управляющих последовательностей с кодирующей областью нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид.

Термин "октакетид" (греческий: "восемь") означает поликетидную цепь, состоящую из восьми кетидных звеньев; это означает, что поликетидный остов состоит из 16 атомов углерода. Термин "кетид" относится к звену $-CH_2-CO-$ или модификации этой группы.

Термин "рекомбинантный вектор экспрессии" относится к рекомбинантным векторам экспрессии, содержащим полинуклеотид по настоящему изобретению, промотор и сигналы остановки транскрипции и трансляции. Различные вышеописанные нуклеиновые кислоты и управляющие последовательности могут быть соединены друг с другом с получением рекомбинантного вектора экспрессии, который может включать в себя один или более подходящих сайтов рестрикции для обеспечения возможности вставки или замены в таких сайтах нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид.

В данном документе термин "рекомбинантная клетка-хозяин" следует понимать в соответствии с его значением в соответствии с известным уровнем техники.

Как известно в данной области техники, рекомбинантные полинуклеотидные (например, ДНК) молекулы представляют собой полинуклеотидные (например, ДНК) молекулы, полученные с помощью лабораторных способов генетической рекомбинации (таких как молекулярное клонирование) для объединения генетического материала из нескольких источников с получением последовательностей, которые в противном случае не встречались бы в биологических организмах. Как понятно специалисту в данной области, рекомбинантная клетка-хозяин содержит рекомбинантные полинуклеотидные (например, ДНК) молекулы, и поэтому рекомбинантная клетка-хозяин не будет подразумеваться как охватывающая природную клетку дикого типа как таковую, как например, природную клетку *Dactylopius coccus* дикого типа.

Термин "идентичность последовательности" относится к родству между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями.

В контексте настоящего изобретения степень идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями определяют с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), который реализован в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), предпочтительно версии 3.0.0 или более поздней. Необязательными параметрами являются штраф за открытие гэпа, равный 10, штраф за продление гэпа, равный 0,5, и матрица замен EBLOSUM62 (EMBOSS версия BLOSUM62). Результат программы Needle, отмеченный как "наиболее длинная идентичность" (полученная с использованием опции `-nobrief`), используют как процент идентичности и рассчитывают следующим образом:

$(\text{идентичные остатки} \times 100) / (\text{длина выравнивания} - \text{общее количество гэпов в выравнивании})$.

В контексте настоящего изобретения степень идентичности последовательностей между двумя нуклеотидными последовательностями определяют с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, выше), который реализован в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, выше), предпочтительно версии 3.0.0 или более поздней. Необязательными параметрами являются штраф за открытие гэпа, равный 10, штраф за продление гэпа, равный 0,5, и матрица замен EDNAFULL (EMBOSS версия NCBI NUC4.4). Результат программы Needle, отмеченный как "наиболее длинная идентичность" (полученная с использованием опции `-nobrief`), используют как процент идентичности и рассчитывают следующим образом:

$(\text{идентичные дезоксирибонуклеотиды} \times 100) / (\text{длина выравнивания} - \text{общее количество гэпов в выравнивании})$.

Как понятно в настоящем контексте специалисту в данной области, как для "идентичности последовательности между двумя нуклеотидными последовательностями", так и для "идентичности последовательности между двумя аминокислотными последовательностями" термин "длина выравнивания" следует понимать как фактическую длину выравнивания между двумя последовательностями, сравниваемыми в отношении идентичности последовательности.

Например, если эталонная последовательность представляет собой конкретную SEQ ID, например,

из 100 аминокислот, а другая последовательность представляет собой идентичную последовательность, которая на 25 аминокислот короче на одном конце (т.е. другая последовательность имеет длину 75 аминокислот), тогда "длина выравнивания" будет составлять 75 аминокислот, а процент идентичности будет составлять 100%.

Другим примером является, например, если эталонная последовательность представляет собой конкретную SEQ ID, например, из 100 аминокислот, а другая последовательность представляет собой идентичную последовательность, которая на 25 аминокислот длиннее на одном конце (т.е. другая последовательность имеет длину 125 аминокислот), тогда "длина выравнивания" будет составлять 100 аминокислот, а процент идентичности будет составлять 100%.

Как обсуждалось в данном документе, термин "поликетидсинтаза (PKS) III типа" является термином, хорошо известным для специалиста в данной области, и специалист в данной области будет знать, является ли конкретная PKS, представляющая интерес, PKS III типа. Как обсуждалось в обзорной публикации Yu et al. (2012), PKS III типа являются автономными ферментами, которые образуют гомодимеры. Их единственный активный участок в каждом мономере итерационно катализирует реакции примирования и удлинения цепи с образованием поликетидных продуктов.

Варианты осуществления настоящего изобретения описаны ниже только в качестве примеров.

Графические материалы

Фиг. 1 - схематическое представление относящейся к данному изобретению гликозилтрансферазной активности выделенной/клонированной новой гликозилтрансферазы SEQ ID NO: 2 по настоящему изобретению, описанной в данном документе. Как проиллюстрировано на фигуре, было обнаружено, что она способна конъюгировать глюкозу с агликонами флавокермесовой кислоты (FK) и кермесовой кислоты (KA).

Фиг. 2 - демонстрируется фиг. 5A из публикации Tang, Y., et al. (2004). Как можно видеть на фигуре и как описано дополнительно в публикации, Акт PKS (называемая октакетидсинтазой (OKS)) производит невосстановленный октакетид, и этот октакетид с помощью ароматазы/циклазы ZhuI и циклазы ZhuJ превращается в флавокермесовую кислоту (FK) (называемую ТМАС). Соединения SEK4 и SEK4B образуются также спонтанно (структуры, показанные на фиг. 2, могут называться побочными продуктами).

Фиг. 3 - демонстрируется пример модели подходящего пути биосинтеза, который может привести к получению карминовой кислоты.

Фиг. 4 - демонстрируется 9,10-антрахиноновый каркас, антроновый каркас и структура соединения антрон FK.

Подробное описание изобретения

Рекомбинантная клетка-хозяин, например стадия (I).

Например, исходя из информации о последовательности, раскрытой в данном документе, для специалиста в данной области будет простой задачей получение соответствующей рекомбинантной клетки-хозяина. В качестве примера, исходя из предыдущего уровня техники, специалисту в данной области известно множество различных подходящих рекомбинантных клеток-хозяев, которые в течение многих лет применялись в качестве рекомбинантных клеток-хозяев, например для экспрессии различных полипептидов, представляющих интерес.

В способе согласно первому аспекту рекомбинантная клетка-хозяин может представлять собой растущую рекомбинантную клетку-хозяина или, например, рекомбинантную клетку-хозяина в так называемой стационарной фазе.

Предпочтительно рекомбинантная клетка-хозяин в способе согласно первому аспекту представляет собой растущую рекомбинантную клетку-хозяина и при этом стадией (I) и стадией (II) первого аспекта являются:

(I) приведение в контакт *in vivo* в растущей рекомбинантной клетке-хозяине, содержащей рекомбинантно введенный ген поликетидсинтазы (PKS) III типа, кодирующий октакетидсинтазу (OKS), и где OKS происходит из рода, отличного от рода клетки-хозяина:

(i) подходящего начального звена и удлиняющих звеньев с рекомбинантно введенной OKS, способной превращать начальное и удлиняющие звенья в невосстановленный октакетид в условиях, подходящих для роста, где обеспечивают образование невосстановленного октакетида *in vivo*; и

(II) превращение *in vivo* в растущей рекомбинантной клетке-хозяине невосстановленного октакетида, полученного на стадии (I), в C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, не является SEK4 и/или SEK4B.

Рекомбинантная клетка-хозяин может представлять собой любую подходящую клетку, такую как любая эукариотическая клетка [например, клетки млекопитающих (такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO)) или клетка растения] или любая прокариотическая клетка.

Может быть предпочтительным, чтобы рекомбинантная клетка-хозяин представляла собой клетку растения, причем предпочтительно клетка растения являлась клеткой растения, выбранной из группы, состоящей из *Nicotiana* sp. (например, клеток *Nicotiana benthamiana*), ревеня, растения, относящегося к виду *Isoglossa woodii*, *Hypericum* и *Aloe* sp.

Предпочтительно клетка растения происходит из *Nicotiana* sp., более предпочтительно клетка рас-

тения происходит из *Nicotiana benthamiana*.

Рекомбинантная клетка-хозяин может представлять собой клетку, выбранную из группы, состоящей из клетки мицелиального гриба и клетки микроорганизма.

К мицелиальным грибам относятся все мицелиальные формы подраздела Eumycota и Oomycota (согласно определению в Hawksworth et al., 1995, выше). Мицелиальные грибы характеризуются вегетативным мицелием, состоящим из хитина, целлюлозы, глюкана, хитозана, маннана и других сложных полисахаридов. Вегетативный рост обусловлен удлинением гиф, а катаболизм углерода является облигатно-аэробным. В отличие от этого вегетативный рост у дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, заключается в почковании одноклеточного таллома, а катаболизм углерода может быть ферментативным.

Может быть предпочтительным, чтобы клетка мицелиального гриба представляла собой клетку вида, выбранного из группы, состоящей без ограничения из *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolyposcladium* и *Trichoderma* или их телеоморфа или синонима.

Предпочтительной клеткой *Aspergillus* является *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* или *Aspergillus nidulans*.

Наиболее предпочтительной клеткой *Aspergillus* является *Aspergillus nidulans*.

В данном документе предпочтительной клеткой микроорганизма является клетка микроорганизма, выбранная из группы, состоящей из дрожжевой клетки и прокариотической клетки.

Предпочтительной дрожжевой клеткой является дрожжевая клетка типа, выбранного из группы, состоящей из *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* и несовершенных грибов. Предпочтительно дрожжевая клетка относится к типу *Ascomycetes*.

Предпочтительная дрожжевая клетка *Ascomycetes* относится к роду, выбранному из группы, состоящей из *Ashbya*, *Botryosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluveromyces*, *Lipomyces*, *Saccharomyces*, такого как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* и *Schizosaccharomyces*.

Предпочтительной дрожжевой клеткой является дрожжевая клетка рода, выбранного из группы, состоящей из *Saccharomyces*, как например *Saccharomyces cerevisiae*, и *Pichia*.

Предпочтительная прокариотическая клетка выбрана из группы, состоящей из *Bacillus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, молочнокислой бактерии и клетки *E. coli*.

Предпочтительной клеткой *Bacillus* является *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* или *Bacillus licheniformis*.

Предпочтительной клеткой *Streptomyces* является *Streptomyces setonii* или *Streptomyces coelicolor*.

Предпочтительной клеткой *Corynebacterium* является *Corynebacterium glutamicum*.

Предпочтительной клеткой *Pseudomonas* является *Pseudomonas putida* или *Pseudomonas fluorescens*.

Ген поликетидсинтазы (PKS), кодирующий октакетидсинтазу (OKS), например стадия (I).

Стадия (I) согласно первому аспекту относится к "гену поликетидсинтазы (PKS) III типа, кодирующему октакетидсинтазу (OKS), и где OKS происходит из рода, отличного от рода клетки-хозяина".

Как обсуждалось выше и как известно из уровня техники, невосстановленные октакетиды могут спонтанно превращаться *in vivo* в соединения SEK4 и SEK4B (структуры, показанные в данном документе на фиг. 2, могут называться в данном документе побочными продуктами).

Как понятно в настоящем контексте специалисту в данной области техники, выявление SEK4 и/или SEK4B *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине демонстрирует, что невосстановленный октакетид присутствует *in vivo*.

Соответственно октакетидсинтаза (OKS) III типа из стадии (I) может быть определена как OKS, которая *in vitro* способна производить октакетидные побочные продукты SEK4 и/или SEK4B.

Испытание такого анализа *in vitro* описано, например, в демонстрационном примере 9 данного документа.

Как обсуждалось выше, специалисту в данной области известно, является ли конкретная PKS, представляющая интерес, PKS III типа.

Как обсуждалось выше, из предыдущего уровня техники известно несколько различных PKS III типа из растений, бактерий и/или грибов.

Следовательно, может быть предпочтительным, чтобы ген поликетидсинтазы (PKS) III типа из стадии (I) представлял собой ген PKS из растения, бактерии или гриба.

Предпочтительно, чтобы ген поликетидсинтазы (PKS) III типа из стадии (I) представлял собой ген PKS из растения.

Если ген поликетидсинтазы (PKS) III типа из стадии (I) представляет собой ген PKS из растения, то предпочтительно, чтобы растение представляло собой растение, выбранное из группы, состоящей из *Alloe spp.* (предпочтительно *Alloe arborescens*), *Hypericum spp.* (предпочтительно *Hypericum perforatum*), ревеня, растения, относящегося к виду *Isoglossa woodii*, и *Hawortia spp.*

Предпочтительно растение представляет собой растение, выбранное из группы, состоящей из *Alloe spp.* и *Hypericum spp.*

Более предпочтительно растение представляет собой растение, выбранное из группы, состоящей из *Alloe arborescens* и *Hypericum perforatum*.

Если ген поликетидсинтазы (PKS) III типа из стадии (I) представляет собой ген PKS из бактерии, то предпочтительно, чтобы бактерия представляла собой бактерию, выбранную из группы, состоящей из *Streptomyces* spp. (предпочтительно *Streptomyces coelicolor*).

Если ген поликетидсинтазы (PKS) III типа из стадии (I) представляет собой ген PKS из гриба, то предпочтительно, чтобы гриб представлял собой гриб, выбранный из группы, состоящей из *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* и *Trichoderma*.

Предпочтительным *Aspergillus* является *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* или *Aspergillus nidulans*.

Наиболее предпочтительным *Aspergillus* является *Aspergillus nidulans*.

Как известно из уровня техники, PKS I типа и/или PKS II типа могут быть мутированы с удалением соответствующих элементов (например, активных сайтов), что превращает их в то, что в настоящем контексте специалист в данной области будет рассматривать с функциональной точки зрения как PKS III типа. Под PKS, которую специалист в данной области рассматривает с функциональной точки зрения как PKS III типа, в данном документе понимается PKS III типа.

Как обсуждалось в данном документе выше и в демонстрационных примерах, авторами настоящего изобретения были рекомбинантно экспрессированы растительные (*Aloe arborescens* и/или *Hypericum perforatum*) поликетидсинтазы (PKS) III типа, октакетидсинтазы (OKS) у *Aspergillus nidulans*, и при этом было выявлено, что OKS действительно функционировали у гетерологичного хозяина, т.е. были получены невосстановленные октакетиды *in vivo* в клетках *Aspergillus nidulans*.

Как обсуждалось в данном документе, в клетках *Aspergillus nidulans* также была выявлена флавокермесовая кислота (FK).

Общедоступные последовательности OKS *Aloe arborescens* в данном документе показаны под следующими номерами SED ID:

называемая в данном документе AaOKS: SEQ ID NO: 6 [идентификационный номер в Genbank AY567707 (нуклеотидная последов.) и SEQ ID NO: 7: [идентификационный номер в Genbank AAT48709 (полипептидная последов.)];

называемая в данном документе AaOKS2 (PKS4): SEQ ID NO: 8 [идентификационный номер в Genbank FJ536166] (нуклеотидная последов.) и SEQ ID NO: 9 [идентификационный номер в Genbank ARC19997] (полипептидная последов.);

называемая в данном документе AaOKS3 (PKS5): SEQ ID NO: 10 [идентификационный номер в Genbank FJ536167] (нуклеотидная последов.) и SEQ ID NO: 11 [идентификационный номер в Genbank ARC19998] (полипептидная последов.);

называемая в данном документе AaPKS2_A207G: SEQ ID NO: 12 (нуклеотидная последов.) и SEQ ID NO: 13: (полипептидная последов.).

Общедоступная аминокислотная последовательность OKS *Hypericum perforatum* в данном документе показана под следующими номерами SED ID:

называемая в данном документе HpPKS2: SEQ ID NO: 14 [идентификационный номер в Genbank HQ529467] (нуклеотидная последов.) и SEQ ID NO: 15: [идентификационный номер в Genbank AEE69029] (полипептидная последов.);

Уровень идентичности (%) между PKS III типа на аминокислотном уровне

	AaOKS	AaPKS2	AaOKS3	HpPKS2	AaPKS2_A207G
AaOKS	-	96,28%	89,88%	43,07%	91,32%
AaOKS2		-	90,12%	43,81%	91,07%
AaOKS3			-	45,07%	85,93%
HpPKS2				-	43,56%
AaPKS2_A207G					-

Может быть предпочтительным, чтобы октакетидсинтаза (OKS) на стадии (I) первого аспекта представляла собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-403 из SEQ ID NO: 7.

Может быть предпочтительным, чтобы октакетидсинтаза (OKS) на стадии (I) первого аспекта представляла собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-403 из SEQ ID NO: 9.

Может быть предпочтительным, чтобы октакетидсинтаза (OKS) на стадии (I) первого аспекта представляла собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по

меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-405 из SEQ ID NO: 11.

Может быть предпочтительным, чтобы октакетидсинтаза (OKS) на стадии (I) первого аспекта представляла собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-403 из SEQ ID NO: 13.

Может быть предпочтительным, чтобы октакетидсинтаза (OKS) на стадии (I) первого аспекта представляла собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-393 из SEQ ID NO: 15.

Стадия (I): прочие вопросы.

Как обсуждалось выше, для стадии (I) (i) первого аспекта сказано: "подходящие начальные звенья и удлиняющие звенья с рекомбинантно введенными OKS, способными превращать начальные звенья и удлиняющие звенья в невосстановленный октакетид в подходящих условиях, где обеспечивают образование невосстановленного октакетида *in vivo*".

Как обсуждалось выше, подходящие начальные звенья и удлиняющие звенья известны из уровня техники.

В соответствии с известным уровнем техники, подходящие начальные звенья могут представлять собой, например, ацетил-СоА или малонил-СоА, а подходящие удлиняющие звенья могут представлять собой, например, малонил-СоА.

Для специалиста в данной области будет простой задачей определение подходящих условий роста, при которых *in vivo* продуцируется невосстановленный октакетид, при этом, как известно специалисту в данной области, такие подходящие условия роста обычно будут зависеть от конкретной используемой рекомбинантной клетки-хозяина.

Рекомбинантная клетка-хозяин и OKS из другого рода.

Как обсуждалось выше, для стадии (I) первого аспекта сказано: "приведение в контакт *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине, содержащей рекомбинантно введенный ген поликетидсинтазы (PKS) III типа, кодирующий октакетидсинтазу (OKS), и где OKS происходит из рода, отличного от рода клетки-хозяина".

В данном случае наиболее предпочтительно применять предпочтительную рекомбинантную клетку-хозяина, которая обсуждалась в данном документе, и предпочтительную OKS из другого рода, которая обсуждалась в данном документе.

Например, предпочтительный вариант осуществления в данном случае относится к варианту, где рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина, выбранную из группы, состоящей из *Aspergillus* (предпочтительно *Aspergillus nidulans*) и *Nicotiana* sp. (предпочтительно *Nicotiana benthamiana*); и

OKS, происходящая из рода, отличного от рода клетки-хозяина, представляет собой OKS, выбранную из группы, состоящей из OKS из *Aloe* spp. (предпочтительно *Aloe arborescens*) и *Hypericum* spp. (предпочтительно *Hypericum perforatum*).

Предпочтительно октакетидсинтаза (OKS) из *Aloe* spp представляет собой

OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-403 из SEQ ID NO: 7; или

OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-403 из SEQ ID NO: 9; или

OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-405 из SEQ ID NO: 11; или

OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-403 из SEQ ID NO: 13.

Предпочтительно октакетидсинтаза (OKS) из *Hypericum* spp. представляет собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по

меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-393 из SEQ ID NO: 15.

Ароматическое соединение агликона, представляющее интерес: стадия (II) первого аспекта.

Как обсуждалось выше, для стадии (II) первого аспекта сказано: "превращение *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине невосстановленного октакетида из стадии (I), в C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, не является SEK4 и/или SEK4B".

В предпочтительном варианте осуществления ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, является C₁₄-C₁₈-ароматическим соединением агликона, представляющим интерес.

Предпочтительно ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из соединения антрахинона и соединения антрона.

В указанной выше группе предпочтительно, чтобы ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, полученное на стадии (II), представляло собой соединение антрахинона.

В соответствии с известным уровнем техники, антрахиноны (также известные как антрахиноноиды) представляют собой класс фенольных соединений, в основе которых лежит 9,10-антрахиноновый каркас (см. фиг. 4 в данном документе).

Например, и как понятно специалисту в данной области, флавокермесовая кислота (FK) и кермесовая кислота (KA) являются примерами антрахинонов.

Антроны представляют собой класс фенольных соединений на основе антронового каркаса (см. фиг. 4 в данном документе).

На фиг. 4 показана структура соединения антрона FK, т.е. пример относящегося к настоящему изобретению соединения антрона.

Предпочтительно ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, является C₁₆-ароматическим соединением агликона, представляющим интерес.

В предпочтительном варианте осуществления C₁₆-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, является флавокермесовой кислотой (FK) или кермесовой кислотой (KA).

Как обсуждалось выше, превращение на стадии (II) невосстановленного октакетида в C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение агликона (предпочтительно C₁₄-C₁₈), представляющее интерес, обычно происходит с участием подходящих ферментов, оказывающих свое действие после PKS (например, ароматазы и/или циклазы), присутствующих *in vivo* в клетке-хозяине.

Следовательно, может быть предпочтительным, чтобы превращение *in vivo* на стадии (II) способа согласно первому аспекту невосстановленного октакетида в C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, происходило с участием по меньшей мере одной ароматазы/циклазы.

Предпочтительно это происходит с участием по меньшей мере одной действующей *in trans* (независимо от фермента PKS) ароматазы/циклазы.

Может быть предпочтительным, чтобы стадия (II) способа согласно первому аспекту представляла собой:

(II) превращение *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине невосстановленного октакетида, полученного на стадии (I), в ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, причем превращение *in vivo* невосстановленного октакетида в ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, происходит с участием по меньшей мере одной действующей *in trans* (независимо от фермента PKS) ароматазы/циклазы, и где ароматаза/циклаза происходят из гриба или бактерии, и являются гетерологичными по отношению к рекомбинантной клетке-хозяину, и происходят из рода, отличного от рода PKS.

SEQ ID NO: 17 в данном документе представляет собой общедоступную аминокислотную последовательность ароматазы/циклазы ZhuI Streptomyces (номер доступа в Genbank AAG30197), а SEQ ID NO: 19 в данном документе представляет собой общедоступную аминокислотную последовательность ароматазы/циклазы ZhuJ Streptomyces (номер доступа в Genbank AAG30196) (см., например, обсуждаемую в данном документе публикацию Tang, Y. et al. (2004)).

Как обсуждается ниже, эти ароматазы/циклазы были успешно использованы в демонстрационных примерах, приведенных в данном документе.

Может быть предпочтительным, чтобы ароматаза/циклаза представляли собой ароматазу/циклазу, содержащие аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-169 из SEQ ID NO: 17.

Может быть предпочтительным, чтобы ароматаза/циклаза представляли собой ароматазу/циклазу, содержащие аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-256 из SEQ ID NO: 19.

Ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес: стадия (III) первого аспекта.

Как обсуждалось выше, для необязательной стадии (III) первого аспекта сказано: "рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит ген гликозилтрансферазы, кодирующий гликозилтрансферазу, и

полученное на стадии (II) ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, подвергается *in vivo* гликозилированию гликозилтрансферазой с получением C₁₄-C₃₄-ароматического соединения гликозида, представляющего интерес".

Может быть предпочтительным, чтобы данная стадия (III) выполнялась (т.е. являлась необязательной).

В предпочтительном варианте осуществления ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является C₁₄-C₁₈ ароматическим соединением гликозида, представляющим интерес.

Как понятно в настоящем контексте специалисту в данной области, предпочтительное ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, которое получено на стадии (II), на стадии (III) может быть превращено в соответствующее предпочтительное ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес.

Предпочтительно ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из соединения антрахинона, соединения антраона.

В указанной выше группе предпочтительно, чтобы ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, полученное на стадии (III), представляло собой соединение антрахинона.

Например, и как понятно специалисту в данной области, DcII и карминовая кислота (CA) являются примерами антрахинонов.

Предпочтительно ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является C₁₆ ароматическим соединением гликозида, представляющим интерес.

В предпочтительном варианте осуществления C₁₆ ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является гликозидом флавокермесовой кислоты или гликозидом кермесовой кислоты.

В предпочтительном варианте осуществления гликозид флавокермесовой кислоты представляет собой DcII.

В предпочтительном варианте осуществления гликозид кермесовой кислоты представляет собой карминовую кислоту (CA).

Гликозилтрансфераза (GT) из стадии (III) может быть, например, описана в данном документе как GT от *Dactylopius coccus*.

Как альтернатива, в данном документе могут быть рассмотрены, например, гликозилтрансферазы из растений *Aloe*, растений *Haworthia*, растений *Sorghum* и/или риса.

Предпочтительно гликозилтрансфераза представляет собой полипептид гликозилтрансферазы, способный:

- (I) конъюгировать глюкозу, активированную нуклеотидом, с флавокермесовой кислотой (FK); и/или
- (II) конъюгировать глюкозу, активированную нуклеотидом, с кермесовой кислотой (KA).

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая описанную в данном документе выделенную/клонированную новую гликозилтрансферазу *Dactylopius coccus costa*, показана в данном документе под SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность полипептида показана в данном документе под SEQ ID NO: 2.

Гликозилтрансферазный фермент под SEQ ID NO: 2, относящийся к настоящему изобретению, в данном документе может называться "DcUGT2".

Следовательно, может быть предпочтительным, чтобы гликозилтрансфераза представляла собой полипептид гликозилтрансферазы, способный:

- (I) конъюгировать глюкозу, активированную нуклеотидом, с флавокермесовой кислотой (FK); и/или
- (II) конъюгировать глюкозу, активированную нуклеотидом, с кермесовой кислотой (KA);

и где полипептид гликозилтрансферазы представляет собой по меньшей мере один полипептид, выбранный из группы, состоящей из:

(a) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью с аминокислотами 1-515 из SEQ ID NO: 2;

(b) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью с аминокислотами 1-468 из SEQ ID NO: 2;

(c) полипептида, который кодируется полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях по меньшей мере средней жесткости с (i) нуклеотидами 1-1548 из SEQ ID NO: 1 или (ii) комплементарной (i) цепью; и

(d) фрагмента из аминокислот 1-515 из SEQ ID NO: 2, который обладает гликозилтрансферазной активностью, как указано в (I) и/или (II).

Предпочтительный вариант осуществления относится к варианту, где полипептид гликозилтрансферазы представляет собой:

(a) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотами 1-515 из SEQ ID NO: 2; более предпочтительно

(a) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотами 1-515 из SEQ ID NO: 2; еще более предпочтительно

(а) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотами 1-515 из SEQ ID NO: 2; и наиболее предпочтительно

(а) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью с аминокислотами 1-515 из SEQ ID NO: 2.

Может быть предпочтительным, чтобы полипептид гликозилтрансферазы согласно первому аспекту представлял собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность с аминокислотами 1-515 из SEQ ID NO: 2.

Как обсуждалось в данном документе, из полученных данных/результатов демонстрационного примера 4 видно, что относящиеся к настоящему изобретению ферменты GT могут быть выявлены, например, в растениях Sorghum и риса.

Полипептидная последовательность Sorghum (идентификационный номер в Genbank: AAF17077.1) показана под SEQ ID NO: 4.

Полипептидная последовательность риса (идентификационный номер в Genbank: CAQ77160.1) показана под SEQ ID NO: 5.

Может быть уместным, чтобы гликозилтрансфераза представляла собой гликозилтрансферазу, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-492 из SEQ ID NO: 4.

Может быть уместным, чтобы гликозилтрансфераза представляла собой гликозилтрансферазу, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-471 из SEQ ID NO: 5.

Как альтернатива, гликозилтрансферазы могут также представлять собой гликозилтрансферазу из растения Haworthia.

Выделение представляющего интерес ароматического соединения: стадия (IV).

Как обсуждалось выше, для стадии (IV) первого аспекта сказано: "выделение представляющего интерес ароматического соединения агликона, полученного на стадии (II), и/или представляющего интерес ароматического соединения гликозида, полученного на стадии (III), с получением композиции, где композиция содержит менее 1% вес./вес. сухого вещества материала рекомбинантной клетки-хозяина".

В настоящем контексте специалисту в данной области из обычной практики известно, как выделить конкретное ароматическое соединение в связи со стадией (IV), относящееся к настоящему изобретению и представляющее интерес, т.е. в данном документе не считается необходимым подробно разбирать данный вопрос.

В предпочтительном варианте осуществления описываемого в данном документе способа, где выделенная композиция на стадии (IV) содержит ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, и где ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является гликозидом флавокермесовой кислоты (предпочтительно DcII) и/или гликозидом кермесовой кислоты (предпочтительно карминовой кислоты (CA)).

Может быть предпочтительным получение относительно чистой композиции, соответственно может быть предпочтительным, что композиция содержит по меньшей мере 10% вес./вес. сухого вещества ароматического соединения, представляющего интерес, и где композиция содержит менее 0,5% вес./вес. сухого вещества материала рекомбинантной клетки-хозяина; или эта композиция содержит по меньшей мере 50% вес./вес. сухого вещества ароматического соединения, представляющего интерес, и где композиция содержит менее 0,1% вес./вес. сухого вещества материала рекомбинантной клетки-хозяина.

Если на стадии (IV) получают композицию, содержащую выделенное ароматическое соединение агликона (например, флавокермесовую кислоту (FK) или кермесовую кислоту (KA)), то способ согласно первому аспекту может предусматривать дополнительную стадию (IVa) гликозилирования ароматического соединения агликона, представляющего интерес, с получением ароматического соединения гликозида, представляющего интерес.

Данную стадию можно осуществить с помощью химического синтеза в соответствии с известным уровнем техники.

Как альтернатива, ее можно осуществить с использованием гликозилтрансферазы, способной гликозировать агликон в подходящих условиях, при этом продуцируется гликозид агликокона.

Вариант осуществления настоящего изобретения относится к варианту, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, выделенной композиции из стадии (IV) представляет собой флавокермесовую кислоту (FK) и/или кермесовую кислоту (KA), и способ согласно первому аспекту предусматривает дополнительную стадию (IVa) приведения в контакт:

(a1) флавокермесовой кислоты (FK) с гликозилтрансферазой, способной гликозировать флавокермесовую кислоту в подходящих условиях, при этом продуцируется гликозид флавокермесовой кислоты; и/или

(a2) кермесовой кислоты (KA) с гликозилтрансферазой, способной гликозировать кермесовую

кислоту в подходящих условиях, при этом продуцируется гликозид кермесовой кислоты.

В предпочтительном варианте осуществления гликозид флавокермесовой кислоты представляет собой DcII.

В предпочтительном варианте осуществления гликозид кермесовой кислоты представляет собой карминовую кислоту (CA).

Как обсуждалось в данном документе, гликозилтрансфераза (GT) на данной стадии может представлять собой, например, описанную в данном документе GT от *Dactylopius coccus*.

Как альтернатива, в данном документе могут быть рассмотрены, например, гликозилтрансферазы из растений *Aloe*, растений *Haworthia*, растений *Sorghum* и/или риса.

Аспекты и предпочтительные варианты осуществления - в так называемом формате/формулировке формулы изобретения.

Аспект(-ы) и предпочтительные варианты их осуществления, описанные в данном документе, могут быть представлены в так называемых формате/формулировке формулы изобретения. Это сделано ниже для некоторых аспектов и предпочтительных вариантов их осуществления, описанных в данном документе.

1. Способ получения представляющего интерес ароматического соединения, являющегося октакетидным производным, где способ предусматривает следующие стадии:

(I) приведение в контакт *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине, содержащей рекомбинантно введенный ген поликетидсинтазы (PKS) III типа, кодирующий октакетидсинтазу (OKS), и где OKS происходит из рода, отличного от рода клетки-хозяина:

(i) подходящего начального звена и удлиняющих звеньев с рекомбинантно введенной OKS, способной превращать начальное и удлиняющие звенья в невосстановленный октакетид в подходящих условиях, где обеспечивают образование невосстановленного октакетида *in vivo*; и

(II) превращение *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине невосстановленного октакетида из стадии (I), в C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, не является SEK4 и/или SEK4B; и

(III) необязательно рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит ген гликозилтрансферазы, кодирующий гликозилтрансферазу, и полученное на стадии (II) ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, подвергается *in vivo* гликозилированию гликозилтрансферазой с получением C₁₄-C₃₄-ароматического соединения гликозида, представляющего интерес; и

(IV) выделение ароматического соединения агликона, представляющего интерес, полученного на стадии (II), и/или ароматического соединения гликозида, представляющего интерес, полученного на стадии (III), с получением композиции, где композиция содержит менее 1% вес./вес. сухого вещества материала рекомбинантной клетки-хозяина.

2. Способ по п.1, где рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку растения, клетку мицелиального гриба, дрожжевую клетку или прокариотическую клетку.

3. Способ по п.2, где рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку растения.

4. Способ по п.3, где клетка растения представляет собой клетку растения, выбранную из группы, состоящей из *Nicotiana* sp. (например, клеток *Nicotiana benthamiana*); ревеня, растения, относящегося к виду *Isoglossa woodii*, *Hypericum* и *Aloe* sp.

5. Способ по п.4, где клетка растения происходит из *Nicotiana* sp.

6. Способ по п.5, где клетка растения происходит из *Nicotiana benthamiana*.

7. Способ по п.2, где рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку мицелиального гриба.

8. Способ по п.7, где клетка мицелиального гриба происходит из *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Muceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolyposcladium* или *Trichoderma*.

9. Способ по п.8, где клетка мицелиального гриба представляет собой клетку *Aspergillus*.

10. Способ по п.9, где клетка *Aspergillus* происходит из *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* или *Aspergillus nidulans*.

11. Способ по п.10, где клетка *Aspergillus* происходит из *Aspergillus nidulans*.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, где ген поликетидсинтазы (PKS) III типа из стадии (I) представляет собой ген PKS из растения, бактерии или гриба.

13. Способ по п.12, где ген поликетидсинтазы (PKS) III типа из стадии (I) представляет собой ген PKS из растения.

14. Способ по п.13, где растение представляет собой растение, выбранное из группы, состоящей из *Aloe* spp. (предпочтительно *Aloe arborescens*), *Hypericum* spp. (предпочтительно *Hypericum perforatum*), ревеня, растения, относящегося к виду *Isoglossa woodii*, и *Haworthia* spp.

15. Способ по п.14, где растение представляет собой растение, выбранное из группы, состоящей из *Aloe* spp. и *Hypericum* spp.

16. Способ по п.15, где растение представляет собой растение, выбранное из группы, состоящей из *Aloe arborescens* и *Hypericum perforatum*.

17. Способ по п.13, где октакетидсинтаза (OKS) из стадии (I), определенной в п.1, представляет со-

бой OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-403 из SEQ ID NO: 7.

18. Способ по п.13, где октакетидсинтаза (OKS) из стадии (I), определенной в п.1, представляет собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-403 из SEQ ID NO: 9.

19. Способ по п.13, где октакетидсинтаза (OKS) из стадии (I), определенной в п.1, представляет собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-405 из SEQ ID NO: 11.

20. Способ по п.13, где октакетидсинтаза (OKS) из стадии (I), определенной в п.1, представляет собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-403 из SEQ ID NO: 13.

21. Способ по п.13, где октакетидсинтаза (OKS) из стадии (I), определенной в п.1, представляет собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-393 из SEQ ID NO: 15.

22. Способ по любому из предыдущих пунктов, где подходящее начальное звено представляет собой ацетил-СоА и/или малонил-СоА.

23. Способ по любому из предыдущих пунктов, где подходящие удлиняющие звенья представляют собой малонил-СоА.

24. Способ по любому из предыдущих пунктов, где рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина, выбранную из группы, состоящей из: *Aspergillus* (предпочтительно *Aspergillus nidulans*) и *Nicotiana* sp. (предпочтительно *Nicotiana benthamiana*); и

OKS, происходящая из рода, отличного от рода клетки-хозяина, представляет собой OKS, выбранную из группы, состоящей из OKS из *Aloe* spp. (предпочтительно *Aloe arborescens*) и *Hypericum* spp. (предпочтительно *Hypericum perforatum*).

25. Способ по любому из предыдущих пунктов, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, является C_{14} - C_{18} -ароматическим соединением агликона, представляющим интерес.

26. Способ по п.25, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из соединения антрахинона и соединения антраона.

27. Способ по п.26, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, является антрахиноном, и антрахинон представляет собой флавокермесовую кислоту (FK) или кермесовую кислоту (КА).

28. Способ по п.25, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, является C_{16} -ароматическим соединением агликона, представляющим интерес.

29. Способ по п.28, где C_{16} -ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, является флавокермесовой кислотой (FK) или кермесовой кислотой (КА).

30. Способ по любому из предыдущих пунктов, где превращение *in vivo* на стадии (II), определенной в п.1, невосстановленного октакетида в C_{14} - C_{34} -ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, происходит с участием по меньшей мере одной ароматазы/циклазы.

31. Способ по п.30, где превращение *in vivo* на стадии (II), определенной в п.1, невосстановленного октакетида в C_{14} - C_{34} -ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, происходит с участием по меньшей мере одной действующей *in trans* (независимо от фермента PKS) ароматазы/циклазы.

32. Способ по п.31, где ароматаза/циклаза представляет собой ароматазу/циклазу, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-169 из SEQ ID NO: 17 (*Zhu1 Streptomyces*); и/или где ароматаза/циклаза представляет собой ароматазу/циклазу, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-256 из SEQ ID NO: 19 (*ZhuJ Streptomyces*).

33. Способ по любому из предыдущих пунктов, где осуществляют стадию (III) (т.е. она является необязательной), т.е. где на стадии (III) рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит ген гликозилтрансферазы, кодирующий гликозилтрансферазу, и полученное на стадии (II) ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, подвергается *in vivo* гликозилированию гликозилтрансферазой с получением C_{14} - C_{34} -ароматического соединения гликозида, представляющего интерес.

34. Способ по п.33, где ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является

C₁₄-C₁₈-ароматическим соединением гликозида, представляющим интерес.

35. Способ по п.34, где ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является C₁₆-ароматическим соединением гликозида, представляющим интерес.

36. Способ по п.35, где C₁₆-ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является гликозидом флавокермесовой кислоты или гликозидом кермесовой кислоты.

37. Способ по п.36, где C₁₆-ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является гликозидом флавокермесовой кислоты, и при этом гликозид флавокермесовой кислоты представляет собой DcII.

38. Способ по п.36, где C₁₆-ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является гликозидом кермесовой кислоты, и при этом гликозид кермесовой кислоты представляет собой карминовую кислоту (CA).

39. Способ по любому из пп.33-38, где гликозилтрансфераза (GT) из стадии (III) представляет собой GT из *Dactylopius coccus*, GT из растений *Aloe*, GT из растений *Haworthia*, GT из *Sorghum* или GT из растения риса.

40. Способ по п.36, где гликозилтрансфераза (GT) представляет собой полипептид гликозилтрансферазы, способный:

(I) конъюгировать глюкозу, активированную нуклеотидом, с флавокермесовой кислотой (FK); и/или

(II) конъюгировать глюкозу, активированную нуклеотидом, с кермесовой кислотой (KA).

41. Способ по любому из пп.33-40, где гликозилтрансфераза представляет собой полипептид гликозилтрансферазы, способный:

(I) конъюгировать глюкозу, активированную нуклеотидом, с флавокермесовой кислотой (FK); и/или

(II) конъюгировать глюкозу, активированную нуклеотидом, с кермесовой кислотой (KA);

и где полипептид гликозилтрансферазы представляет собой по меньшей мере один полипептид, выбранный из группы, состоящей из:

(a) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью с аминокислотами 1-515 из SEQ ID NO: 2;

(b) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью с аминокислотами 1-468 из SEQ ID NO: 2;

(c) полипептида, который кодируется полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях по меньшей мере средней жесткости с (i) нуклеотидами 1-1548 из SEQ ID NO: 1 или (ii) комплементарной (i) цепью; и

(d) фрагмента из аминокислот 1-515 из SEQ ID NO: 2, который обладает гликозилтрансферазной активностью, как указано в (I) и/или (II).

42. Способ по любому из пп.33-40, где гликозилтрансфераза представляет собой гликозилтрансферазу, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-492 из SEQ ID NO: 4.

43. Способ по любому из пп.33-40, где гликозилтрансфераза представляет собой гликозилтрансферазу, содержащую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70% (предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 98%) идентичностью с аминокислотами 1-471 из SEQ ID NO: 5.

44. Способ по любому из пп.33-43, где выделенная композиция на стадии (IV) содержит ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, и где ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является гликозидом флавокермесовой кислоты (предпочтительно DcII) и/или гликозидом кермесовой кислоты (предпочтительно карминовой кислоты (CA)).

45. Способ по п.44, где ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является гликозидом флавокермесовой кислоты, и при этом гликозид флавокермесовой кислоты представляет собой DcII.

46. Способ по п.44, где ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является гликозидом кермесовой кислоты, и при этом гликозид кермесовой кислоты представляет собой карминовую кислоту (CA).

47. Способ по любому из предыдущих пунктов, где выделенная композиция по п.1 на стадии (IV) содержит по меньшей мере 10% вес./вес. сухого вещества ароматического соединения, представляющего интерес, и где композиция содержит менее 0,5% вес./вес. сухого вещества материала рекомбинантной клетки-хозяина.

48. Способ по любому из предыдущих пунктов, где на стадии (IV) получают композицию, содержащую выделенное ароматическое соединение агликона (например, флавокермесовую кислоту (FK) или кермесовую кислоту (KA)), и при этом способ предусматривает дополнительную стадию (IVa): гликозилирования ароматического соединения агликона, представляющего интерес, с получением ароматического соединения гликозида, представляющего интерес.

49. Способ по п.48, где гликозилирование ароматического соединения агликона, представляющего интерес, осуществляют с помощью гликозилтрансферазы, способной гликозировать агликон в подхо-

дях условиях, при этом продуцируется гликозид агликокона.

50. Способ по п.49, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, выделенной композиции из стадии (IV) представляет собой флавокермесовую кислоту (FK) и/или кермесовую кислоту (КА), и способ согласно первому аспекту предусматривает дополнительную стадию (IVa) приведения в контакт:

(a1): флавокермесовой кислоты (FK) с гликозилтрансферазой, способной гликозировать флавокермесовую кислоту в подходящих условиях, при этом продуцируется гликозид флавокермесовой кислоты; и/или

(a2): кермесовой кислоты (КА) с гликозилтрансферазой, способной гликозировать кермесовую кислоту в подходящих условиях, при этом продуцируется гликозид кермесовой кислоты.

51. Способ по любому из пп.48-50, где гликозид флавокермесовой кислоты представляет собой DcII.

52. Способ по любому из пп.48-50, где гликозид кермесовой кислоты представляет собой карминовую кислоту (СА).

53. Способ по любому из предыдущих пунктов, где рекомбинантная клетка-хозяин по п.1 представляет собой растущую рекомбинантную клетку-хозяина, и при этом стадия (I) и стадия (II) по п.1 предусматривают:

(I) приведение в контакт *in vivo* в растущей рекомбинантной клетке-хозяине, содержащей рекомбинантно введенный ген поликетидсинтазы (PKS) III типа, кодирующий октакетидсинтазу (OKS), и где OKS происходит из рода, отличного от рода клетки-хозяина,

(i) подходящего начального звена и удлиняющих звеньев с рекомбинантно введенной OKS, способной превращать начальное и удлиняющие звенья в невосстановленный октакетид в условиях, подходящих для роста, где обеспечивают образование невосстановленного октакетида *in vivo*; и

(II) превращение *in vivo* в растущей рекомбинантной клетке-хозяине невосстановленного октакетида, полученного на стадии (I), в C₁₄-C₃₄-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, где ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, не является SEK4 и/или SEK4B.

Примеры

Соответствующую информацию о последовательностях можно найти в прилагаемом к настоящей заявке документе "Перечень последовательностей".

Пример 1. Клонирование GT из *D. coccus* и тестирование ее FK и КА активностей.

Материалы и способы.

Очистка ДНК и mRNA.

Свежемороженые *Dactylopius coccus* (получали с острова Лансароте). Свежемороженые *Porphyrophora polonica* получали из Польши. Замороженных насекомых измельчали в порошок в жидком азоте и очищали ДНК/РНК: ДНК очищали с применением набора DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) в соответствии с протоколом поставщика. РНК очищали с применением набора RNeasy mini kit (Qiagen) в соответствии с протоколом поставщика.

mRNA эукариот преобразовывали в кДНК с применением набора RT² Easy First Strand Kit (Qiagen) в соответствии с протоколом поставщика с использованием поли-dT-праймеров в реакции с обратной транскриптазой.

Секвенирование ДНК и РНК.

ДНК и кДНК отправляли на секвенирование в BGI (Шэньчжэнь, Китай) для секвенирования с помощью технологии Illumina со спаренными концами длиной 100 п. о. в соответствии с протоколом Illumina с охватом примерно 60-100X и выходом в формате данных fastq.

Анализ последовательностей ДНК и РНК/кДНК.

Полученные fastq-последовательности ДНК и РНК/кДНК импортировали в Genomic Workbench версии 5.4 (CLC-bio, Орхус, Дания) и *de novo* собирали в контиги с использованием алгоритма сборки. Выходные файлы экспортировали в формате FASTA.

Затем FASTA-файлы РНК/кДНК импортировали в IOGMA версии 10 (Genostar, Гренобль, Франция) и выявляли предполагаемые гены с использованием "модуля поиска генов прокариот на основе матрицы скрытых цепей Маркова".

Предполагаемые гены аннотировали с помощью BLAST (средство поиска основного локального выравнивания) относительно базы данных Genbank (NCBI) с использованием также нуклеотидной последовательности в качестве транслированной последовательности белка. Предполагаемые гены также аннотировали путем сравнения схожести с базами данных семейств белков PFAM.

Получение белковых фракций из *D. coccus*

Три грамма свежих насекомых *D. coccus* гомогенизировали в 120 мл буфера для выделения [350 мМ сахарозы, 20 мМ трицина (рН 7,9), 10 мМ NaCl, 5 мМ DTT, 1 мМ PMSF), содержащего 0,3 г поливинил-полипирролидона. Гомогенат фильтровали через нейлоновую ткань (размер ячейки 22 мкм) и центрифугировали в течение 10 мин (10000×g при 4°C). Надосадочную жидкость центрифугировали (1 ч, 105000×g, при 4°C), получая растворимую и мембраносвязанную фракцию белка. Растворимую белко-

вую фракцию концентрировали до 1 мл и производили замену буфера на 20 мМ трицин (pH 7,9), 5 мМ DTT с использованием устройств для ультрацентрифугирования Amicon ultrafugation-3K (Millipore). Осадок в виде мембраносвязанного белка промывали 3 раза путем ресуспендирования осадка в 60 мл 20 мМ трицина (pH 7,9), 5 мМ DTT с использованием кисти из меха куницы, после чего повторно центрифугировали. Наконец, осадок в виде мембраносвязанного белка ресуспендировали в 1 мл 20 мМ трицина (pH 7,9), 5 мМ DTT. Фракцию растворимого белка и фракцию мембраносвязанного белка анализировали в отношении активности гликозилирования.

Очистка активной формы GT, специфичной к флавокермесовой кислоте/кermесовой кислоте, от мембранных белков *D. coccus*.

Фракцию мембраносвязанного белка, выделенную из 3 г свежих насекомых *D. coccus*, солюбилизировали добавлением 1% (об./об.) Triton x-100 (восстановленной формы) и осторожно перемешивали в течение 1,5 ч. на холоде. Раствор, обработанный Triton x-100, центрифугировали (1 ч, 105000×g, при 4°C), а надосадочную жидкость выделяли и вносили в колонку, заполненную 2 мл Q-сефарозы Fast flow (Pharmacia). Колонку промывали в 4 мл буфера А [20 мМ трицина (pH 7,9), 0,1% (об./об.) Triton x-100 (восстановленная форма), 50 мМ NaCl], и белки элюировали с помощью 20 мМ трицина (pH 7,9), 0,1% (об./об.) Triton x-100 (восстановленная форма) с применением ступенчатого градиента NaCl от 100 до 500 мМ (с шагами по 50 мМ). Фракции по 0,5 мл собирали, обессоливали, анализировали с помощью SDS-PAGE и отслеживали в отношении гликозилирующей активности с помощью описанного анализа с использованием гликозилирующего фермента, меченного радиоактивным изотопом. Фракцию, которая имела повышенное содержание активной формы GT, специфичной к флавокермесовой кислоте/кermесовой кислоте, подвергали анализу массы пептидов с помощью метода "фингерпринтинга".

Ферментный анализ и обнаружение гликозидного продукта.

Гликозилирование флавокермесовой кислоты и кermесовой кислоты осуществляли в аналитических смесях объемом 60 мкл, содержащих 20 мМ трицина (pH 7,9), 3,3 мкМ UDP[14C]глюкозы и 20 мкл экстракта белка (мембраносвязанного или растворимого белка). Реакционные смеси инкубировали в течение 0,5 ч при 30°C и реакции останавливали добавлением 180 мкл метанола. Образцы центрифугировали при 16000×g в течение 5 мин при 4°C, и надосадочную жидкость наносили на пластины для TLC (силикагелевые 60 F254 пластины, Merck). Продукты анализа разделяли в дихлорметане:метаноле:муравьиной кислоте (7:2:2 по объему). Продукты, меченные радиоактивным изотопом, визуализировали с помощью STORM 840 PhosphorImager (Molecular Dynamics, <http://www.moleculardynamics.com>).

Экспрессия кодон-оптимизированных DcUGT2, DcUGT4 и DcUGT5 у *S. cerevisiae*.

Синтетическую кодон-оптимизированную версию DcUGT2 и две другие предполагаемые последовательности GT из транскриптома *Dactylopius coccus*, называемые DcUGT4 и DcUGT5, для экспрессии у дрожжей приобретали у GenScript с фланкирующими сайтами attL для рекомбинации по технологии Gateway. Синтетические фрагменты в качестве ПЦР-матриц со специфичными праймерами применяли для создания соответствующих версий с С-концевыми метками StrepII. Шесть генных конструкций (меченых и немеченых фрагментов) клонировали в плазмиду-приемник pYES-DEST52 Gateway (Invitrogen) с использованием смеси ферментов LR clonaseII. Шесть плазмидных конструкций pYES-DEST52 трансформировали отдельно в дрожжевой штам Invsc1 (Invitrogen), а положительных трансформантов верифицировали с помощью ПЦР. Продуцирование гетерологичного белка осуществляли в соответствии с инструкциями для вектора pYES-DEST52 Gateway (Invitrogen). Продуцирование гетерологичного белка с меткой StrepII верифицировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к Strep. Фракцию мембраносвязанного белка получали из верифицированных дрожжевых трансформантов, как описано в D. Pompon, B. Louerat, A. Bronine, P. Urban, Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments, *Methods Enzymol.* 272 (1996) 51-64, и подвергали скринингу в отношении гликозилирующей активности к флавокермесовой кислоте/кermесовой кислоте. Последовательность с кодоном, оптимизированным для дрожжей, показана под SEQ ID NO: 3.

LC-MS-MS.

LC/MS осуществляли на Agilent Q-TOF со следующей системой для HPLC.

Колонка Kinetix 2,6 мкМ XB-C18 100A (100×4,60 мм, Phenomenex). Растворитель А (900 мл деионизированной воды, 100 мл метанола и 50 мл муравьиной кислоты). Растворитель В (700 мл метанола, 300 мл деионизированной воды и 50 мл муравьиной кислоты).

Поток 0,8 мл/мин, 35°C.

Градиентное элюирование 0-1 мин. 100% А. Линейный градиент до 83% А 3 мин, линейный градиент до 63% А 6 мин, линейный градиент до 45% А 9 мин, линейный градиент до 27% А 12 мин, линейный градиент до 10% А 15 мин, линейный градиент до 3% А 17 мин, линейный градиент до 2% А 19 мин, линейный градиент до 0% А 20 мин, 0% А 22 мин, линейный градиент до 100% А 25 мин.

Время удержания составляло 7,6 мин для карминовой кислоты, 7,8 мин для DC II, 13,7 мин для флавокермесовой кислоты и 13,9 мин для кermесовой кислоты.

Результаты.

В гомогенизированных насекомых *D. sossus* была обнаружена способность гликозилировать флавокермесовую кислоту/кермесовую кислоту с использованием C14-UDP-глюкозы в качестве субстрата. Было показано, что активность была мембраносвязанной, и при этом молекулу, обладающую такой активностью, очищали, а очищенные белки подвергали протеомному анализу. Было показано, что ферментативная активность должна была исходить от полипептида с последовательностью, соответствующей данному гену-кандидату DcUGT2.

Как обсуждалось выше, относящийся к настоящему изобретению гликозилтрансферазный фермент под SEQ ID NO: 2, относящийся к настоящему изобретению, в данном документе может называться "DcUGT2".

Аминокислотная последовательность DcUGT2 характеризовалась менее 45% гомологией с любой известной гликозилтрансферазой.

Зная, что клонирование последовательности дикого типа в дрожжи не давало какой-либо соответствующей ферментативной активности, авторы переработали нуклеотидную последовательность DcUGT2 в последовательность, кодирующую тот же полипептид, но с использованием нуклеотидных кодонов, оптимизированных для *S. cerevisiae*, способ, называемый оптимизацией кодонов (последовательность с кодоном, оптимизированным для *S. cerevisiae*, показана в данном документе под SEQ ID NO: 3). После этого кодон-оптимизированную последовательность DcUGT2 клонировали и экспрессировали в дрожжах. Гетерологичный дрожжевой штамм содержал мембраносвязанную активную форму фермента, способную гликозилировать кермесовую кислоту и флавокермесовую кислоту.

После получения данных из анализа массы пептидов методом "фингерпринтинга" от фракции белка *Dactylopius sossus*, имеющей повышенную GT-активность к флавокермесовой кислоте/кермесовой кислоте, авторы сопоставляли массы пептидов с транскриптомическим набором данных и выявили три предполагаемых UGT (DcUGT2, DcUGT4 и DcUGT5).

Гетерологичная экспрессия трех кандидатов у дрожжей выявила, что лишь одна из этих UGT, а именно DcUGT2, была ответственна за наблюдаемую гликозилирующую активность в отношении флавокермесовой кислоты/кермесовой кислоты во фракции белка *D. sossus*.

Обработка вискозимом полученного C-14 глюкозида, меченного радиоактивным изотопом, продемонстрировала, что он был устойчив к гидролизу, что дополнительно свидетельствовало о том, что DcUGT2 являлся C-GT, ответственной за продуцирование DCII и карминовой кислоты.

LC-MS-MS демонстрировала образование продуктов с идентичными временем удержания, спектром, молекулярной массой и паттерном молекулярного разрушения, как и у DCII и карминовой кислоты соответственно.

Заключение.

Результат этого примера 1 продемонстрировал, что выделить/клонировать относящийся к настоящему изобретению гликозилтрансферазный фермент под SEQ ID NO: 2, который в данном документе может называться "DcUGT2" или просто "DcUGT", было непростой задачей.

Например, выявленные последовательности генов в геноме и транскриптоме насекомых *D. sossus* были проанализированы в отношении схожести с общеизвестными последовательностями C-гликозилтрансфераз, относящимися к настоящему изобретению, и результат был отрицательным в том смысле, что ни одна из выявленных последовательностей генов в геноме/транскриптоме в данном случае не продемонстрировала значимую схожесть с общеизвестными последовательностями C-гликозилтрансфераз, относящимися к настоящему изобретению.

Тем не менее, несмотря на то, что можно было сказать, что биоинформационный анализ схожести последовательностей указывал на то, что геном *Dactylopius sossus* не будет содержать ген, кодирующий гликозилтрансферазу, относящуюся к настоящему изобретению, авторами настоящего изобретения было продолжено исследование данного вопроса, и при этом авторами настоящего изобретения был выявлен экстракт *Dactylopius sossus* (включающий экстракты эндосимбионтов, присутствующих в *D. sossus*) с GT-активностью, относящейся к данному изобретению, и с помощью объединения стадий очистки и тестирования, относящихся к данному изобретению, авторы наконец смогли получить относительно чистую фракцию/композицию, из которых можно было получить несколько частичных аминокислотных последовательностей возможных кандидатов ферментов GT.

Авторами настоящего изобретения была протестирована активность описанной в данном документе выделенной/клонированной новой гликозилтрансферазы под SEQ ID NO: 2 (DcUGT2), и при этом было обнаружено, что она способна конъюгировать глюкозу с агликонами флавокермесовой кислоты (FK) и кермесовой кислоты (KA) - см. фиг. 1 в данном документе.

Пример 2. Тестирование GT-активности в отношении KA у UrdGT2, известной из предыдущего уровня техники.

Как обсуждалось выше, UrdGT2 описана в публикации Baig et al. (*Angew Chem Int Ed Engl.* 2006 Nov 27;45(46):7842-6).

Как обсуждалось выше, в данной публикации описано, что UrdGT2 способна гликозилировать различные молекулы агликонов, которые можно считать структурно схожими с агликонами кермесовой ки-

слоты (КА) и флавокермесовой кислоты (FK), относящимися к данному изобретению.

Синтетическую кодон-оптимизированную версию UrdGT2 для экспрессии у *E. coli* клонировали и рекомбинантно экспрессировали в *E. coli*. Получали неочищенный экстракт растворимым белков, содержащий рекомбинантную UrdGT2, т.е. экстракт, содержащий UrdGT2.

Активность UrdGT2 GT анализировали *in vitro* с использованием либо UDP-глюкозы, либо TDP-глюкозы в качестве донора-сахара и FA/КА в качестве агликоновых субстратов. Какой-либо активности в отношении этих агликонов обнаружено не было, т.е. по отношению к этим агликонам не было выявлено какой-либо GT-активности, относящейся к данному изобретению.

Тем не менее, было подтверждено, что рекомбинантная UrdGT2 была активной, что было продемонстрировано по *in vitro* образованию C₁₄-глюкозида, меченного радиоактивным изотопом, полученного в результате глюкозилирования неопознанного соединения в неочищенном экстракте *E. coli*.

Пример 3. GT-активность у растения Aloe и растения Haworthia.

Выделение и тестирование молекулы с GT-активностью из Aloe.

1) Отмывали растение от частиц почвы и разделяли на: А) корень, В) ткань зеленого листа и С) гелевый материал из листа.

2) Немедленно замораживали 5 г ткани в жидком азоте и измельчали пестиком в холодной ступке до тонкого порошка.

3) Добавляли в порошок 20 мл холодного экстракционного буфера [20 mM трицин-HCl, 10 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 7,9], содержащего полный ингибитор протеаз без EDTA (Roche), 0,1% (вес./об.) сульфата протеина и 0,5 г PVPP и перемешивали встряхиванием.

4) Аккуратно перемешивали гомогенат при 4°C в течение 10 мин, а затем центрифугировали при 12000×g при 4°C в течение 5 мин.

5) Отделяли надосадочную жидкость и по каплям в течение 2 мин при 4°C добавляли 1 мл 2% (вес./об.) сульфата протеина в 20 mM трицин-HCl, pH 7,9, при постоянном перемешивании.

6) Фильтровали надосадочную жидкость через 2 кусочка нейлоновой сетки. Затем профильтрованную надосадочную жидкость центрифугировали при 12000×g при 4°C в течение 5 мин.

7) Отделяли надосадочную жидкость и ультрацентрифугировали при 110000×g при 4°C в течение 1 ч.

8) Отделяли фракцию растворимого белка (надосадочную жидкость) и заменяли буфер 5 раз на 20 mM трицин-HCl, pH 7,9, содержащий 5 mM DTT, с использованием центрифужного фильтрующего устройства Amicon Ultra centrifugal filter device-3K (Millipore).

9) Инкубировали 20 мкл экстракта растворимого белка в общем 60 мкл объеме реакционной смеси, содержащем UDP-глюкозу (конечная конц. 1,25 mM), и либо FK (конечная конц. 50 мкМ), КА (конечная конц. 50 мкМ), либо MeO-FK/EtO-FK (конечная конц. 50 мкМ/50 мкМ) в течение 2 ч при 30°C со встряхиванием при 650 об/мин.

10) Останавливали ферментные реакции с помощью 180 мкл холодного метанола и фильтровали через 0,45-микронный фильтр, а также подвергали анализу HPLC-MS.

Таблица 1
Глюкозиды, полученные в анализах *in vitro* глюкозилирования с использованием экстрактов ферментов из Aloe

Значения	475 m/z [M-H] ⁻	491 m/z [M-H] ⁻	489 m/z [M-H] ⁻	503 m/z [M-H] ⁻
m/z [M-H] ⁻	FK-моноглюк.	КА-моноглюк.	MeOFK-моноглюк.	EtOFK-моноглюк.
Aloe				
Растворимый белок				
Лист	3,73	3,71	5,81	6,63
Гель				
Корень		3,71		

Неочищенные экстракты растворимых ферментов из трех тканей Aloe, зеленого листового материала (листа), гелевого материала из листа (гель) и корня тестировали на глюкозилирующую активность в отношении флавокермесовой кислоты (FK), кермесовой кислоты (КА), сложного метилового эфира флавокермесовой кислоты (MeOFK) и сложного этилового эфира флавокермесовой кислоты (EtOFK). Числа соответствовали времени удержания (мин) после HPLC-MS-разделения новых гликозидов, образованных *in vitro* (табл. 1).

Значения m/z 475 и 491 были теми же значениями m/z , которые были получены соответственно для DcII и CA, солюбилизованных в аналогичных растворах.

Оба значения m/z превышали на 162 (значение m/z глюкозы в глюкозиде) значения m/z у FK и КА, что свидетельствовало о том, что глюкозный фрагмент из UDP-глюкозы в реакционном буфере был перенесен в агликон с помощью GT в экстракте. Значения m/z [MH]⁺ 489 и 503 также соответственно превышали на 162 значения m/z , полученные с MeOFK и EtOFK, что свидетельствовало о том, что глюкозное звено было добавлено как в MeOFK, так и в EtOFK с помощью GT, присутствующей в экстракте.

Выделение и тестирование молекулы с GT-активностью из *Haworthia limifolia*.

Процедура была такой же, как и описанная для Aloe, однако анализируемые ткани растения были следующими: А) ткань зеленого листа, В) гелевый материал из листа, С) ткань у основания (розовая часть между корнем и стеблем) и D) ткань корня.

Неочищенные экстракты растворимых ферментов из четырех тканей *Haworthia limifolia*, зеленого листового материала (лист), гелевого материала из листа (гель), розовой ткани между корнем и стеблем (основание) и корня тестировали на глюкозилирующую активность в отношении флавокермесовой кислоты (FK), кермесовой кислоты (КА), сложного метилового эфира флавокермесовой кислоты (MeOFK) и сложного этилового эфира флавокермесовой кислоты (EtOFK). Числа соответствовали времени удержания (мин) после HPLC-MS-разделения новых гликозидов, образованных *in vitro* (табл. 2).

Таблица 2

Гликозиды, полученные в анализах *in vitro* глюкозилирования с использованием экстрактов ферментов из *Haworthia limifolia*

Значения	475 m/z [M-H] ⁻	491 m/z [M-H] ⁻	489 m/z [M-H] ⁺	503 m/z [M-H] ⁺
m/z [M-H] ⁻	FK-моноглюк.	КА-моноглюк.	MeOFK- моноглюк.	EtOFK- моноглюк.

<i>Haworthia</i>				
Растворимый белок				
Лист	3,73	3,71	5,81	6,63
Гель				
Основание	3,73	3,71	5,81	6,63
Корень	3,73	3,71	5,81	6,63

Значения m/z 475 и 491 были теми же значениями m/z , которые были получены соответственно для DcII и CA, солюбилизованных в аналогичных растворах. Оба значения m/z превышали на 162 (значение m/z глюкозы в глюкозиде) значения m/z у FK и КА, что свидетельствовало о том, что глюкозный фрагмент из UDP-глюкозы в реакционном буфере был перенесен в агликон с помощью GT в экстракте. Значения m/z [MH]⁺ 489 и 503 также соответственно превышали на 162 значения m/z , полученные с MeOFK и EtOFK, что свидетельствовало о том, что глюкозное звено было добавлено как в MeOFK, так и в EtOFK с помощью GT, присутствующей в экстракте.

Заключение.

Результаты данного примера демонстрируют, что ферменты гликозилтрансферазы (GT), относящиеся к настоящему изобретению, могут быть выявлены у растений Aloe и растений *Haworthia*.

Другими словами, растения Aloe и растения *Haworthia* содержат гликозилтрансферазу, которая способна гликозировать флавокермесовую кислоту с образованием гликозида флавокермесовой кислоты и/или способна гликозировать кермесовую кислоту с образованием гликозида кермесовой кислоты.

Пример 4. GT-активность у растения *Sorghum* и риса.

Как известно из уровня техники, растения *Sorghum* и риса содержат гликозилтрансферазы.

Как известно из уровня техники, некоторые из гликозилтрансфераз *Sorghum* и риса могут гликозировать низкомолекулярные соединения агликонов.

Описанные в уровне техники гликозилтрансферазы из растений *Sorghum* и риса характеризуются значительно меньшей чем 70% идентичностью с аминокислотами 1-515 из SEQ ID NO: 2, как раскрыто в данном документе.

Из уровня техники не известно, будут ли гликозилтрансферазы из растений *Sorghum* и/или риса представлять собой гликозилтрансферазу, относящуюся к настоящему изобретению, т.е. гликозилтрансферазу, которая способна гликозировать флавокермесовую кислоту с образованием гликозидов флавокермесовой кислоты; и/или которая способна гликозировать кермесовую кислоту с образованием гликозидов кермесовой кислоты.

Известные гликозилтрансферазы из *Sorghum* (*Sorghum bicolor*), SbUGT85B1, с идентификационным номером в Genbank AF199453.1 (нуклеотидная последов.)/AAF17077.1 (полипептидная последов.) и риса (*Oryza sativa*), OsCGT, с идентификационным номером в Genbank FM179712.1 (нуклеотидная последов.)/CAQ77160.1 (полипептидная последов.) были экспрессированы в штамме Xjb E.coli, и при этом были получены неочищенные экстракты белков E.coli и протестированы на гликозилирующую активность на субстратах, представлявших собой кермесовую кислоту и флавокермесовую кислоту, как описано у Kannangara et al. (2011) и Augustin et al. (2012).

На фиг. 2 в РСТ/ЕР 2014/078540 (дата подачи РСТ 18 декабря 2014 г.) показаны результаты LC-MS-анализа гликозилированных продуктов, полученных в пробах, содержащих неочищенный лизат штамма Xjb E.coli, экспрессирующий либо SbUGT85B1, либо OsCGT, UDP-глюкозу и флавокермесовую кислоту (FK) или кермесовую кислоту (КА). В качестве отрицательного контроля в анализах использовали неочищенный экстракт из штамма Xjb E. coli.

Были выявлены гликозиды КА (491 m/z [МН] - значение m/z[МН] у СА) для обеих гликозилтрансфераз и гликозиды FK (475 m/z [МН] - значение m/z[МН] у DcII) для OsCGT.

Заключение.

Результат данного примера демонстрирует, что ферменты гликозилтрансферазы (GT), относящиеся к настоящему изобретению, могут быть выявлены у растений *Sorghum* и/или риса.

Другими словами, растения растений *Sorghum* и/или риса содержат гликозилтрансферазу, которая способна гликозировать флавокермесовую кислоту с образованием гликозида флавокермесовой кислоты, и/или способна гликозировать кермесовую кислоту с образованием гликозида кермесовой кислоты.

Пример 5. Использование эндогенного гена GT или молекулы с GT-активностью.

Как известно из уровня техники, гликозилтрансферазы, способные гликозировать низкомолекулярное соединение, присутствуют у многих различных организмов. Способ приведения в контакт гликозилтрансферазы клеток организма с низкомолекулярным соединением заключается во введении одного или более генов, управляющих биосинтезом низкомолекулярного соединения и, таким образом, делая клетки способными гликозировать низкомолекулярное соединение. Низкомолекулярное соединение может представлять собой, например, флавокермесовую кислоту или кермесовую кислоту или версии этих молекул с дополнительными боковыми группами.

Один или более генов, управляющих биосинтезом флавокермесовой кислоты или кермесовой кислоты или версии этих молекул с дополнительными боковыми группами, вводили в организм, содержащий гликозилтрансферазу, например растение табака *Nicotiana benthamiana*.

При транзientной экспрессии гена/генов в соответствии со способами, описанными в (D'Aoust et al. (Methods Mol Biol 483 (2009): 41-50), например в ткани растения, получали низкомолекулярное соединение или соединения. Клетки, стабильно экспрессирующие ген/гены, получали и отбирали в соответствии со способами, описанными в Gelvin (Microbiol Mol Biol Rev 67(1) (2003): 16-37)).

В клетках, содержащих либо стабильно экспрессируемый, и/либо транзientно экспрессируемый ген/гены, низкомолекулярные соединения вступали в контакт с эндогенными гликозилтрансферазами, что приводило к образованию одного или более гликозидов флавокермесовой кислоты, кермесовой кислоты или версии этих молекул с дополнительными боковыми группами.

Присутствие гликозидов демонстрировали с помощью способов экстракции и анализа, описанных в примере 3.

Образцы готовили для LC/MS согласно способу экстракции, описанному в (Rauwald and Sigler (Phytochemical Analysis 5 (1994):266-270).

Заклучение.

Результаты этого примера демонстрируют, что эндогенные гликозилтрансферазы, присутствующие в клетках рекомбинантного организма, могут быть использованы для превращения флавокермесовой кислоты, кермесовой кислоты или версии этих молекул с дополнительными боковыми группами в гликозиды при введении в организм гена/генов, управляющих биосинтезом агликонов.

Другими словами, введение гена или генов, управляющих биосинтезом флавокермесовой кислоты, кермесовой кислоты, версии этих молекул с дополнительными боковыми группами или родственных низкомолекулярных соединений, представляет собой способ приведения низкомолекулярного соединения в контакт с гликозилтрансферазами и, таким образом, способ получения гликозидов флавокермесовой кислоты, кермесовой кислоты или версии этих соединений с дополнительными боковыми группами.

Пример 6. Стабильная экспрессия PKSIИ типа у *Aspergillus nidulans*.

Материалы и способы.

Среды и растворы.

Все растворы готовили с H₂O Milli-Q и стерилизовали при 121°C в течение 20 мин.

Раствор микроэлементов: для получения 1 л смешать 0,4 г CuSO₄·5H₂O; 0,04 г Na₂B₄O₇·10H₂O; 0,8 г FeSO₄·7H₂O; 0,8 г MnSO₄·2H₂O; 0,8 г Na₂MoO₄·2H₂O и 8,0 г ZnSO₄·7H₂O.

Минеральная смесь (50×): для получения 1 л раствора смешать 26 г KCl; 26 г MgSO₄·7H₂O и 76 г

K_2HPO_4 ; и 50 мл раствора микроэлементов.

20X раствор нитратных солей: для получения 1 л раствора растворить 120 г NaNO_3 , 10,4 г KCl , 10,4 г $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30,4 г K_2HPO_4 в воде Milli-Q.

Раствор микроэлементов (1 л маточного раствора): для получения 1 л раствора растворить 0,4 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,04 г $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0,8 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,8 г $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,8 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, довести до 1 л водой Milli-Q.

Тиамин 1%: конечная концентрация 0,001%.

D-глюкоза 20% (вес./об.): для получения 1 л раствора 200 г D-глюкозы растворить в воде Milli-Q.

Буфер для протопластирования *Aspergillus* (APB): конечная концентрация 1.1 М MgSO_4 и 10 мМ Na-фосфатного буфера. Значение pH доводили до 5,8 посредством 2 н. NaOH.

Буфер для трансформации *Aspergillus* (ATB). Конечные концентрации: 1,2 М сорбита; 50 мМ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 20 мМ Tris и 0,6 М KCl . Значение pH доводили до 7.2 посредством 2 н. HCl.

PCT. Конечная концентрация: 50% вес./об. PEG 8000 (можно также было использовать 4000, 6000 и другой PEG); 50 мМ CaCl_2 ; 20 мМ Tris и 0,6 М KCl . Значение pH доводили до 7,5 посредством 2 н. HCl.

Минимальная среда (MM). Для получения 1 л раствора: 1 мл микроэлементов; 50 мл нитратных солей (1 М); 50 мл 20% вес./об. глюкозы; 1 мл тиамина; 20 г агара (So.Bi gel). В случае жидкой MM агар не добавляли.

Добавки к среде. При необходимости в различные среды вносили добавки, исходя из генотипа штамма *Aspergillus nidulans*, в следующих количествах: аргинина 4 мМ, урацила 10 мМ и уридина 10 мМ. Для отрицательного отбора AfругG добавляли маркер 5-фтороротовую кислоту (5-FOA) до концентрации 1.3 мг/мл.

Твердая среда для трансформации (TM). Для получения 1 л раствора: 1 мл микроэлементов; 50 мл нитратных солей (1 М); сахарозы 171,15 г; 1 мл тиамина; 20 г агара (So.Bi gel). В случае жидкой MM агар не добавляли.

Трансформация *Aspergillus nidulans*.

Протопласты *Aspergillus nidulans* создавали согласно стандартному протоколу, известному из предыдущего уровня техники, краткое описание которого приведено далее: *Aspergillus nidulans* на макро-среде удваивали в количестве в течение ночи, а полученную биомассу собирали путем фильтрации через фильтр Miracloth (Merck Millipore). Мицелий ресуспендировали в 10 мл буфера APB, содержащего 40 мг глюканекса/мл (Novozymes A/S). Смесь инкубировали на шейкере при 37°C при 150 об/мин в течение 3 ч. Добавляли APB до получения общего объема 40 мл. Наносили верхний слой из 5 мл 50% ATB и 50% воды MQ, и пробирки центрифугировали при 3000 RCF, 16°C, в течение 12 мин с получением в результате двухфазной системы с протопластом на границе раздела фаз. Протопласты промывали с помощью 40 мл ATB и центрифугирования при 3000 RCF, 16°C, в течение 12 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл ATB.

Полученные протопласты использовали для экспериментов по генетической трансформации в aliquотах 50 мкл, смешанных с 1,5-5 мкг ДНК и 150 мкл PCT. Смесь для трансформации инкубировали в течение 10 мин. Затем в смесь добавляли 250 мкл ATB и переносили на чашку для трансформации с необходимыми добавками, внесенными с помощью шпателя Дригальского.

После инкубации в течение 4 дней при 37°C полученные трансформанты *Aspergillus nidulans* выделяли и субкультивировали на отдельных чашках с агаром с подходящим режимом отбора.

Целенаправленную интеграцию кассеты экспрессии анализировали с помощью ПЦР с применением оригинальных праймеров, используемых для амплификации гена, подлежащего экспрессии, с последующим использованием праймерных пар с одним отжигом праймеров внутри вставки и одним в окружающем геноме. В случае штаммов на основе AfругG маркер отбора удаляли после трансформации с помощью отрицательного отбора на чашках, содержащих 5-FOA, и гомологичной рекомбинации между короткими однонаправленными повторами, окружающими маркерный ген AfругG в кассете экспрессии. После удаления маркерного гена штамм снова верифицировали с помощью диагностической ПЦР. Удаление маркерного гена для отбора делало возможной последующую трансформацию по новому гену-мишени с использованием того же маркерного гена для отбора, который использовали при первой трансформации.

Конструирование штаммов-акцепторов *Aspergillus nidulans*.

Использованные штаммы *Aspergillus nidulans* перечислены в нижеприведенной табл.3, а в табл. 4 кратко представлены модифицированные локусы/гены. Целенаправленную делецию (или замену) гена осуществляли путем конструирования кассет, несущих целевой ген, состоящих из пригодного для повторного использования маркерного гена для отбора, окруженного двумя последовательностями из примерно 1500 п. о., которые идентичны последовательностям, окружающим locus, который подлежит замене в геноме. Целевую конструкцию для замены генов wA и uA конструировали посредством способа на основе ПЦР с разделением с помощью маркеров, описанного в (Nielsen M.L., Albertsen L., Lettier G., Nielsen J.B., Mortensen M.H., 2006. Efficient PCR-based gene targeting with a recyclable marker for *Aspergillus nidulans*. Fungal Genetics and Biology, Vol. 43:54-64). Сначала на ген wA целенаправленно воздейство-

вали для делеции, а необходимые целевые последовательности амплифицировали с геномной ДНК с помощью праймеров ANwA-dl-Up-F (5'-GGAAGAAGGTCGCATACCA-3') в сочетании с ANwA-dl-Up-Rad (5'-gatccccgggaattgccatgGATCAGGAGAAGGAGAGTCAAG-3') и ANwA-dl-Dw-Fad (5'-aattccagctgaccaccatgGGCGAAAAGGCAAAGGAGC-3') в комбинации с ANwA-dl-Dw-R (5'-GCTAGAAAAGGCAAGGGAGG-3'). Два маркерных фрагмента амплифицировали путем объединения праймера M1 (5'-catggcaattccccggggatc-GCCGGCAATTCTTTTAGGTAGC-3') совместно с праймером M2 (5'-CCAGAAGCAGTACACGGC-3') и праймера M3 (5'-GTTGTCTGCTTGCGCTTCTTC-3') с праймером M4 (5'-catggtgctcagctggaatTCCTCCGCCATTTCTTATTCCC-3'). После ПЦР-амплификации целевых по гену и маркерных фрагментов ДНК фрагменты сливали с помощью ПЦР, как описано в Nielsen et al. 2006, фрагменты ДНК очищали из геля и вводили трансформацией в реципиентный штамм NID1 *Aspergillus nidulans* (описанный в Nielsen J.B., Nielsen M.L., Mortensen U.H., 2008, Transient disruption of non-homologous end-joining facilitates targeted genome manipulations in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, Vol. 45:165-170). Маркер в полученном штамме удаляли путем отрицательного отбора на чашках с 5-FOA для выявления трансформантов, у которых ранее спонтанно размыкался маркерный маркер *AfrygG*. Целенаправленную делецию гена уА производили, как описано для гена wA, но с использованием следующих двух праймерных пар для амплификации целевых последовательностей Del-yA-5'-F (5'-GTGGGTTGAACCGCTTACTCAG-3') в сочетании с Del-yA-5'-R (5'-gatccccgggaattgccatg-CCCGGAGGAATCAAAATGACGC-3') и Del-yA-3'F (5'-aattccagctgaccaccatgGTTTGGGATTCTTAGGTGAGCTC-3') в комбинации с Del-yA-3'-R (5'-CCTCCCTGGCGTATACASAAAC-3'). Полученный в результате штамм, не содержащий маркера *AfrygG*, в последующем описании называется NID598.

Целенаправленную делецию аспертециновой PKS (*aptA*) производили на фоне NID598 с применением экспериментальной стратегии, описанной для делеций генов уА и wA. Два целевых фрагмента ДНК подвергали ПЦР-амплификации с использованием праймера AnAptA-UP-F (5'-GCTCGAGCTTGCCAGCC-3') в сочетании с AnAptA-UP-R (5'-gatccccgggaattgccatg-GCTGGTGTGGGACACACG-3') и AnAptA-Dw-F (5'-aattccagctgaccaccatgGCTTGGAAATCAGTATAGCTTTCTG-3') в сочетании с AnAptA-Dw-R (5'-GCTTGTGGTCTGTCTGAATCG-3'). Затем очищенную из геля целевую конструкцию вводили трансформацией в штамм NID598, не содержащий маркера, с получением в результате штамма NID930.

Кластер *Apt*, кластер *mdr* и кластеры *stc* последовательно удаляли из фона NID598. Для этого необходимые целевые конструкции конструировали посредством набора для непосредственного клонирования Uracil-Specific Excision Reagent Cloning (USER) соответствующих целевых фрагментов в вектор P1(P6), как описано в Hansen B.G., Salomonsen B., Nielsen M.T., Nielsen J.B., Hansen N.B., Nielsen K.F., Regueira T.B., Nielsen J., Patil K.R., Mortensen U.H. 2011. Versatile enzyme expression and characterization system for *Aspergillus nidulans*, with the *Penicillium brevicompactum* polyketide synthase gene from the mycophenolic acid gene cluster as a test case. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 77(9):3044-51). Для делеции кластера *Apt* целевые фрагменты амплифицировали с помощью праймеров ANAPTcluster-DI-Up-FU (5'-GGGTTTAAAdUGAGGAGCAGAGGATGCGG-3') в сочетании с ANAPTcluster-DI-Up-RU (5'-GGACTTAAAdUGTAGTGGTGGTGGTGGTG-3') и ANAPTcluster-DI-Dw-FU (5'-GGCATTAAAdUCGCGTGGAATTTGGAAGAGAG-3') в сочетании с ANAPTcluster-DI-Dw-RU (5'-GGTCTTAAAdUGTGCTCGGGGACGTGAAAG-3'). Каждый из используемых праймеров включал в себя 2-дезоксиридиновое (dU) основание, обеспечивающее создание 3'-липких концов. Полученные ПЦР-фрагменты очищали из геля и непосредственно клонировали путем USER-клонирования в *PacI/Nt.BbvCI*-расщепленный вектор P1(P6). Полученную плазмиду расщепляли с помощью *SwaI* для высвобождения целевого фрагмента, в том числе маркера *AfrygG*. Расщепленную плазмиду трансформировали в штамм NID598, не содержащий маркер. Затем маркер *AfrygG* удаляли путем отрицательного отбора на 5-FOA, как описано выше для wA, с получением штамма для делеции кластера *mdr*. Целенаправленную делецию кластеров *mdr* и *stc* осуществляли, как описано для кластера *apt*. Для конструирования целевой последовательности для кластера *mdr* осуществляли ПЦР-амплификацию с использованием праймера ANMDPcluster-DI-Up-FU (5'-GGGTTTAAAdUGGTCGTCTGTCAAGGAGTTG-3') в сочетании с праймером ANMDPcluster-DI-Up-RU (5'-GGACTTAAAdUCGAGTGTGTATATGGGTCTTG-3') и праймера ANMDPcluster-DI-Dw-FU (5'-GGCATTAAAdUGAGTTTGTGAGATGTTCAAGGATGG-3') в сочетании с праймером ANMDPcluster-DI-Dw-RU (5'-GGTCTTAAAdUGAGGTGAAGGACACAGCG-3'). Более того, целевую последовательность для кластера *stc* подвергали ПЦР-амплификации с праймерами ANSTCcluster-DI-Up-FU (5'-GGGTTTAAAdUCGAGAGACTAGGACACAAGTG-3') в сочетании с ANSTCcluster-DI-Up-RU (5'-GGACTTAAAdUCGCGGATCTGTGGTAGAG-3') и ANSTCcluster-DI-Dw-FU (5'-GGCATTAAAdUGCCAGCATATTTCAAACCCAGTC-3') в сочетании с ANSTCcluster-DI-Dw-RU (5'-GGTCTTAAAdUCACACAACCAACCTCCGATC-3'). Полученному штамму с делецией кластеров *apt*, *mdr* и *stc* было дано название NID_SMA.

Таблица 3

Различные штаммы *Aspergillus nidulans*, используемые в исследовании

Название штамма	Генотип
NID1	<i>nkuAΔ argB2, pyrG89, veA1</i>
NID598	<i>nkuAΔ, argB2, pyrG89, veA1, wAΔ, yAΔ</i>
NID930	<i>nkuAΔ, argB2, pyrG89, veA1, wAΔ, yAΔ, aptAΔ</i>
NID_SMA	<i>nkuAΔ, argB2, pyrG89, veA1, wAΔ, yAΔ, aptΔ, mdpΔ, stcΔ</i>

Таблица 4

Затрагиваемые гены

Названия генов и номера доступа в базе данных по геному <i>Aspergillus</i>	
yA = AN6635	Бiosинтез пигмента аскоспоры (лакказа)
wA = AN8209	Бiosинтез пигмента аскоспоры (PKS)
aptA = AN6000	Аспертециновая PKS
apt = от aptA (AN6000) до aptC (AN6002)	Аспертециновый генный кластер
mdp = от mdpL (AN10023) до mdpA (AN10021)	Монодиктифеноновый/эмондиновый генный кластер
stc = от stcW (AN7804) до stcA (AN7825)	Стеригматоцистиновый генный кластер

Экспрессия PKSIII типа у *Aspergillus nidulans*.

Создавали синтетические (de novo синтезированные) кодон-оптимизированные версии HрPKS2, AaOKS для экспрессии у дрожжей, а последовательности с природной частотой использования кодона приобрели у Genscript. Кодон-оптимизированные гены обозначали суффиксом "ScOpt", например HрPKS2-ScOpt, в то время как гены с исходной частотой использования кодона от природного хозяина обозначали суффиксом "Orig", например HрPKS2-Orig. Синтетические ДНК-фрагменты использовали в качестве ПЦР-матрицы для ПЦР-реакций со специфичными праймерами (IDT) для кодирующих последовательностей генов, в том числе стоп-кодона. Используемые праймеры содержали 5'-липкие концы, совместимые с методом клонирования Uracil Specific Excision Reagent (USER™) полученных ПЦР-ампликонов в векторы экспрессии для целенаправленной интеграции кассет экспрессии в один из семи возможных сайтов в геноме *Aspergillus nidulans*. Плазмида имела грибной маркерный ген для отбора (AfrugG *Aspergillus fumigatus*), сайт клонирования USER (AsiSI и Nb.btsI) и была фланкирована двумя последовательностями ДНК *Aspergillus nidulans* размером 1-1,5 т.о.(называемыми "верхней" и "нижней") для обеспечения интеграции в геном *Aspergillus nidulans* путем целенаправленной гомологичной рекомбинации (Hansen, B.G., Salomonsen, B., Nielsen, M.T., Nielsen, J.B., Hansen, N.B., Nielsen, K.F., ... Mortensen, U.H. (2011)). Versatile enzyme expression and characterization system for *Aspergillus nidulans*, with the *Penicillium brevicompactum* polyketide synthase gene from the mycophenolic acid gene cluster as a test case. Applied and Environmental Microbiology, 77(9), 3044-3051. <http://doi.org/10.1128/AEM.01768-10>. ПЦР-ампликоны амплифицировали с использованием ДНК-полимеразы PfuX7, и полученные фрагменты ДНК очищали из геля. Векторы-реципиенты готовили для USER™-клонирования путем их расщепления посредством AsiSI и Nb.btsI в течение ночи с последующей очисткой из геля. ПЦР-ампликоны непосредственно клонировали в вектор-реципиент путем USER™-клонирования в сочетании с трансформацией в *E. coli*. Клетки DH5 оттаивали на льду и вносили смесь USER™ в 50 мкл клеток (1×10 КОЕ/мкг рUC19). Смесь помещали на лед на 10 мин и подвергали тепловому шоку в течение 90 с при 45°C. Переносили снова на лед и инкубировали в течение 5 мин. Клетки высевали на чашку со средой LB с антибиотиком для отбора и инкубировали при 37°C в течение ночи. Колонии верифицировали с помощью ПЦР и истинных трансформантов выращивали в жидких средах LB с антибиотиком для отбора в течение ночи для очистки плазмиды (Taylor, R.G., Walker, D.C, & McInnes, R.R. (1993). Штаммы-акцепторы *E. coli* оказывали значимое влияние на качество маломасштабных препаратов плазмидной ДНК, использованных для секвенирования. Nucleic Acids Research, 21(7), 1677-8. Получено с <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=309390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

Праймеры, использованные для процесса конструирования, где dU представляет собой 2-

дезоксисуридин

An_HpPKS2-ScOpt-F 5'-AGAGCGAdUATGGGTTCCCTTAGACAACGGTTC
 An_HpPKS2-ScOpt-R 5'-
 TCTGCGAdUTCACAAAGGAACACTTCTCAAAACC

An_AaOKS-ScOpt-F 5'-AGAGCGAdUATGAGTTCCTCAACGCTTCC

An_AaOKS-ScOpt-R 5'-TCTGCGAdUTCACATGAGAGGCAGGCTGTG

An_HpPKS2-Orig-F 5'-AGAGCGAdUGGGTTCCTTGACAATGGTT

An_HpPKS2-Orig-R 5'-TCTGCGAdUTTAGAGAGGCACACTTCGGAGAAC

An_AaOKS-Orig-F 5'-AGAGCGAdUATGAGTAGTTTATCAAATGCCAGTC

An_AaOKS-Orig-R 5'-TCTGCGAdUTCACATCAATGGCAAGGAA

Верифицированные плазмиды экспрессии расщепляли посредством *SwaI* (с маркером *AfpyrG*) для высвобождения кассеты экспрессии, фланкированной "верхней" и "нижней" целевыми последовательностями. Кассету вводили в протопласт *Aspergillus nidulans*, как указано выше.

Конструировали следующие плазмиды экспрессии:

pIS53(<i>pyrG</i>)::HpPKS2_ScOpt	HpPKS2_ScOpt в локусе IS53
pIS53(<i>pyrG</i>)::HpPKS2_Orig	HpPKS2_Orig в локусе IS53
pIS53(<i>pyrG</i>)::AaOKS_ScOpt	AaOKS_ScOpt в локусе IS53
pIS53(<i>pyrG</i>)::AaOKS_Orig	AaOKS_Orig в локусе IS53

Кассеты экспрессии у отдельных плазмид высвобождали с помощью расщепления *SwaI* (с маркером *AfpyrG*), а затем вводили трансформацией в протопласты *Aspergillus nidulans*.

После конструирования отдельного штамма использованные маркеры *AfpyrG* удаляли с помощью отрицательного отбора на 5-FOA.

Химический анализ сконструированных штаммов *Aspergillus nidulans*.

Для анализа эффектов, которые введенные гены оказывали на метаболизм сконструированных штаммов *Aspergillus nidulans*, штаммы выращивали на ММ с соответствующими добавками в течение 5-14 дней при 37°C. Метаболиты экстрагировали согласно процедуре микромасштабной экстракции, описанной у Smedsgaard (Smedsgaard, J. (1997). Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of Chromatography A*, 760(2), 264-270. Получено с <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967396008035>). Обобщенно: десять круглых пробок диаметром 0,4-0,6 мм вырезали из культуральных пластин среды с помощью "сверла для пробок" и помещали в стеклянный сосуд объемом 8 мл, содержащий 2 мл экстракционного раствора, полученного из метанола и 1% (об./об.) муравьиной кислоты. Пробирки подвергали ультразвуковой обработке в течение 60 мин на водяной бане. Надосадочную жидкость переносили в новый сосуд и выпаривали под потоком газообразного азота и тепла (30°C), и полученный в результате осадок растворяли в 100 мкл метанола со степенью чистоты для HPLC и 1%-ной муравьиной кислоты (Sigma-Aldrich) с помощью инкубации раствора в течение 20 мин в ультразвуковой бане. Затем полученный экстракционный раствор фильтровали через PTFE 0,45 мкм, 15 мм фильтры Premium Syringe Filters (Agilent Technologies) в сосуды для HPLC. Экстрагированные метаболиты анализировали с помощью системы для HPLC Agilent 1200, соединенной с масс-спектрометром Bruker micrOTOF-Q II, снабженным источником ионизации методом электрораспыления. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Luna C₁₈ (2) (150×4,6 мм, 3 мкм, 100 Å, Phenomenex), поддерживаемой при 40°C. Водный элюент (А) состоял из воды/ацетонитрила (95:5, об./об.), и органический элюент (В) состоял из воды/ацетонитрила (5:95, об./об.); оба подкисленные 0,1%-ной муравьиной кислотой. В соответствии с целью анализа использовали два различных профиля линейного градиентного элюирования:

Способ 1: 0 мин, 0% В; 20 мин, 100% В; 22 мин, 100% В; 24 мин, 0% В. Скорость потока поддерживали на уровне 0,8 мл/мин и при этом использовали 7-минутное уравнивание.

Способ 2: 0 мин, 0% В; 30 мин, 100% В; 33 мин, 100% В; 35 мин, 0% В. Скорость потока поддерживали на уровне 0,5 мл/мин и при этом использовали 10-минутное уравнивание.

Образцы анализировали в режиме как положительной, так и отрицательной ионизации. Полученный набор данных анализировали с использованием описанного ниже программного обеспечения MassHunter (технологии Agilent).

Полученные в результате хроматограммы с основными пиками (BPC) исследовали с целью выявления изменений в метаболизме гриба. При этом для облегчения выявления соответствующих пиков создавали ионные хроматограммы экстрагированных продуктов (EIC) для аппроксимации масс у ожидаемых промежуточных продуктов в пути биосинтеза.

Как альтернатива, получение метаболитов анализировали в жидких культурах MM. Для этого 500-мл стерильные колбы Эрленмейера со 100-мл жидкой минимальной среды с соответствующими добавками инокулировали раствором макроконидий из штаммов, подлежащих анализу. Колбы инкубировали в течение 1-15 дней при 37°C в инкубаторе-шейкере со скоростью 150 об/мин. Мицелий выливали через Miracloth (Merck Millipore) и отделяли от культуральной среды. Мицелий быстро замораживали жидким азотом. Среду стерилизовали фильтрацией через FPE-214-250 JET BIOFIL®. Затем стерильную среду переносили в 40-мл сосуд для химического анализа.

Экстракция.

Ферментационный бульон (40 мл) выпаривали досуха в вакууме и экстрагировали этанолом+10% муравьиной кислотой (20 мл) посредством обработки ультразвуком (2 ч) при 60°C. Растворитель декантировали и высушивали в вакууме перед растворением в 1,5 мл этанола+10% муравьиной кислоты с использованием обработки ультразвуком. Надосадочную жидкость сушили в концентраторе Speedvac и растворяли в 180 мкл 90% метанола+10% муравьиной кислоты, центрифугировали и анализировали с помощью HPLC-MS/MS.

Результаты.

Анализ образовавшихся метаболитов с помощью UHPLC-HRMS штаммов, содержащих гетерологичные HpPKS2 или AaOKS, продемонстрировал, что экспрессия PKS III типа (HpPKS2 или AaOKS) приводила к продуцированию различных соединений, в том числе соединений SEK4, SEK4B и FK. Экспрессия у штамма с делецией кластера SMA приводила к более высокому соотношению FK и SEK4/SEK4B.

Заключение.

Экспрессия растительной PKS III типа (HpPKS2 или AaOKS) приводила к продуцированию различных соединений, в том числе соединений SEK4, SEK4B, антрона FK, мутакина и FK *in vivo* у *Aspergillus nidulans*. Экспрессия в штамме с удаленными аспертециновыми, стеригматоцистиновыми и монодиктифеноновыми/эмодиновыми генными кластерами оказывала положительное влияние на продуцирование метаболитов.

Поскольку в данном примере 6 в штаммы *Aspergillus* не были включены с помощью вставки гетерологичные циклазы и/или ароматазы, и при этом было выявлено соединение FK, то это свидетельствует о том, что штаммы *Aspergillus* могут содержать гомологичные циклазы и/или ароматазы, способные преобразовывать *in vivo* невосстановленный октакетид в соединение FK.

Пример 7. Стабильная экспрессия PKS III типа и циклаз и/или ароматаз у *Aspergillus nidulans*.

Материалы и способы.

Экспрессия бактериальных циклаз и ароматаз у *Aspergillus nidulans*.

Синтетическую кодон-оптимизированную версию *ZhuI*, *ZhuJ* для экспрессии у *Aspergillus*, *S. cerevisiae* и *E. coli* приобрели у Genscript. Аналогично описанному для PKS III типа гены, кодирующие циклазы и ароматазы, клонировали в векторы экспрессии, нацеленные на конкретные сайты в геноме *Aspergillus*, отличные от сайта, используемого для экспрессии PKS III типа (см. пример 6). Другими словами, гены *ZhuI* и *ZhuJ* клонировали в штаммы *Aspergillus* из примера 5, которые уже содержали гены гетерологичных PKS III типа (HpPKS2, AaOKS).

Праймеры, использованные для процесса конструирования, где dU представляет собой 2-дезоксинуридин

An_ZhuI_EcOpt-F 5'-AGATATACCAAdUGCGTCATGTTGAACATACCGT

An_ZhuI_EcOpt-R 5'-ATGGCTGCdUTTATGCGGTAACGTACCAACACCA

An_ZhuJ_EcOpt-F 5'-ATATACATAdUGAGCGGTCGTAACCTTT

An_ZhuJ_EcOpt-R 5'-ATATCCAATdUTTAATCCTCTTCTTCTGTTC

An_ZhuI_ScOpt-F 5'-AGAGCGAdUGAGACACGTTGAACACA

An_ZhuI_ScOpt-R 5'-TCTGCGAdUTTATGCAGTTACGGTACCA

An_ZhuJ_ScOpt-F 5'-AGAGCGAUGTCCGGTAGAAAGACCTT

An_ZhuJ_ScOpt-R 5'-TCTGCGAUTTAATCTTCTTCTTCTGTTCG

Кодирующие последовательности, амплифицированные с помощью ПЦП, клонировали в векторы для целенаправленной интеграции в геном *Aspergillus nidulans*: *ZhuI* в IS80 и *ZhuJ* в IS82. Верифициро-

ванные кассеты экспрессии вводили трансформацией в *Aspergillus nidulans* с помощью последовательной целенаправленной интеграции отдельной кассеты экспрессии, как описано в примере 6. После каждого раунда трансформации маркер *AfrugG* удаляли для обеспечения возможности проведения последующего раунда трансформации, на котором вводили дополнительную кассету экспрессии.

Химический анализ осуществляли, как описано в примере 6.

Результаты.

Анализ образованных метаболитов с помощью UHPLC-HRMS продемонстрировал, что экспрессия *ZhuI* и *ZhuJ* не оказывала значимого влияния на количество продуцируемых метаболитов (в том числе соединений SEK4, SEK4B и FK), т.е. количества, продуцируемые штаммами из данного примера 7 (содержащими PKS (*HrPKS2* или *AaOKS*)+*ZhuI* и *ZhuJ*), были аналогичны количеству, продуцируемые штаммами из примера 6 (содержащими только PKS (*HrPKS2* или *AaOKS*)).

Заключение.

Результаты продемонстрировали, что экспрессия *ZhuI* и *ZhuJ*, оптимизированных для экспрессии в *E. coli*, не оказывала значимого влияния на продуцируемые метаболиты у *Aspergillus nidulans*.

Пример 8. Гетерологичная экспрессия PKS III типа и С-гликозилтрансферазы *Dactylopius coccus* у *Aspergillus nidulans*.

Материалы и способы.

Конструирование плазмид, генетическую трансформацию *Aspergillus nidulans* и химический анализ осуществляли, как описано в примере 6.

Конструирование векторов для экспрессии С-гликозилтрансферазы *Dactylopius coccus* у *Aspergillus nidulans*.

Ген *DcUGT2* клонировали/вставляли в PKS (*AaOKS*) штамма *Aspergillus nidulans* из примера 6.

Полноразмерный ген *DcUGT2* от *Dactylopius coccus* являлся кодон-оптимизированным для экспрессии у *Aspergillus nidulans* и был приобретен у GenScript в виде синтетической ДНК. Для ПЦР-амплификации последовательности, кодирующей *DcUGT2*, использовали следующие праймеры:

DcUGT2_AnOpt-F: 5'-AGAGCGAdUATGGAGTTTCGCTTGCTTATCCT и

DcUGT2_AnOpt-R: 5'-TCTGCGAdUTTAATTCTTCTTCAACTTTCCGACTTAG.

Полученный в результате ПЦР-ампликон клонировали в вектор экспрессии *Aspergillus nidulans*, как описано в примере 6. Использованный вектор экспрессии был нацелен на сайт IS52 в геноме *Aspergillus nidulans*.

Результаты.

Анализ образованных метаболитов штаммов *Aspergillus nidulans*, содержащих гетерологичные *AaOKS* и *DcUGT2*, продемонстрировал, что экспрессия приводила к продуцированию различных соединений, в том числе соединений СА, DCII, КА. Также были выявлены соединения FK, SEK4 и SEK4b, и коэкспрессия *DcUGT2* обеспечивала более высокий выход вышеупомянутых соединений.

Заключения.

Коэкспрессия гетерологичных PKS (*AaOKS*) и гликозилтрансферазы (*DcUGT2*) у *Aspergillus nidulans* приводила к продуцированию СА, DCII, КА. Также были выявлены соединения FK, SEK4 и SEK4b, и коэкспрессия *DcUGT2* обеспечивала более высокий выход вышеупомянутых соединений.

Пример 9. Экспрессия *AaOKS* у *N. benthamiana* и тест активности *in vitro*.

Экспрессия *AaOKS* у *N. benthamiana*.

AaOKS (номер доступа в Genebank AY567707) (Abe I., Oguro S. Utsumi Y., Sano Y., Noguchi H. (2005b). Engineered biosynthesis of plant polyketides: chain length control in an octaketide-producing plant type III polyketide synthase. *J Am Chem Soc* 127: 12709-12716; Abe I., Utsumi Y., Oguro S., Morita H. Sano Y., Noguchi H. (2005a). A plant type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone. *J Am Chem Soc* 127:1362-1363) была синтезирована компанией Genescript и амплифицирована с праймерами, содержащими С-концевую *his*-метку и липкий конец USER для клонирования в USER-совместимый вектор pEAQ (Sainsbury F., Thuenemann E.C., Lomonosoff G.P. (2009) pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J* 7: 682-693) с помощью USER-способа (Nour-Eldin H.H., Hansen B.G., Norholm M.H., Jensen J.K., Halkier B.A. (2006). Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res* 34: e122.) с получением в результате плазмиды pEAQ-*AaOKS*. Плазмиду размножали в клетках TOP10 *E. coli* и верифицировали с помощью секвенирования. Плазмиду вводили трансформацией в *Agrobacterium tumefaciens* с помощью электропорации, и положительные клоны отбирали на агаре Лурия-Бертани (LB), дополненном рифампицином (12,5 мкг/мл), канамицином (50 мкг/мл) и ампициллином (25 мкг/мл) с последующим проведением ПЦР для верификации наличия *AaOKS*.

Для экспрессии *A. tumefaciens*, несущую pEAQ-*AaOKS* или pEAQ, культивировали в течение ночи в жидкой LB, дополненной рифампицином (12,5 мкг/мл), канамицином (50 мкг/мл) и ампициллином (25 мкг/мл). Клетки осаждали путем центрифугирования и ресуспендировали в среде для инфильтрации (10 mM MES, 100 мкМ ацетосирингона, 10 mM MgCl₂) до конечной OD₆₀₀: 0,5 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. *A. tumefaciens* инфильтровали в листья 3-4-недельных растений *N. ben-*

thamiana с помощью шприца без иглы, и растения росли в течение дополнительных 5 дней в теплице.

Экстракция растворимого белка из *N. benthamiana*.

300 мг растительного материала измельчали в холодной ступке пестиком и добавляли 0,5 г PVPP и 10 мл холодного экстракционного буфера (50 mM фосфата натрия, 400 mM сахарозы, 4 mM DTT, pH 7,2, содержащего полный ингибитор протеиназ (Roche)). Гомогенат фильтровали через нейлоновую сетку в холодные центрифужные пробирки и центрифугировали при 10000×g при 4°C в течение 15 мин. Надосадочную жидкость отделяли и центрифугировали при 100000×g при 4°C в течение 60 мин. Отделяли растворимую фракцию (надосадочную жидкость). Продуцирование AaOKS с his-меткой верифицировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к his. Очищали AaOKS с his-меткой от растворимой фракции с использованием колонок His Spin Trap (GE health care biosciences) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ на поликетидсинтазу.

Неочищенный экстракт растворимых ферментов из листьев *N. benthamiana* и аффинность очищенной his-AaOKS тестировали в отношении поликетидсинтазной активности. Стандартная проба содержала 100 мкл растворимого белка или 20 мкл аффинно очищенных his-AaOKS в общем реакционном объеме 250 мкл, содержащем 50 mM фосфата натрия, 500 mM сахарозы, 1 mM DTT, 40 мкМ малонил-CoA, 20 мкМ ацетил-coA, pH 7. Стандартную пробу дополняли [2-¹⁴C]-малонил-CoA (1,8 мКи/ммоль) для TLC-анализа или [¹³C3]-малонил-CoA для структурного анализа. Реакционные смеси инкубировали при 30°C в течение 90 мин, реакцию останавливали добавлением 25 мкл 20% HCl и дважды экстрагировали посредством 500 мкл этилацетата, 1% (вес./об.) уксусной кислоты. Органическую фазу сушили *in vacuo* и ресуспендировали в 20 мкл метанола, 1% (вес./об.) уксусной кислоты и анализировали с помощью ТСХ или LC-MS.

Результаты: ферментативная активность AaOKS *in vitro*.

Неочищенный экстракт ферментов из *N. benthamiana*, экспрессирующего AaOKS, тестировали в отношении октакетидсинтазной активности с использованием малонил-CoA в качестве начального субстрата. При инкубировании ¹⁴C-малонил-CoA с неочищенным экстрактом ферментов или аффинно очищенной AaOKS субстрат метаболизировался, что наблюдали по появлению бэнда с радиоактивной меткой на тонкослойной хроматограмме, тогда как при использовании неочищенного экстракта ферментов из растений табака, инфильтрованных только плазмидой, каких-либо продуктов не наблюдали. Для выяснения структуры в качестве субстрата использовали C-малонил-coA, и меченые продукты выявляли с помощью LC-MS как SEK4 и SEK4B. Разница в образовании продуктов отсутствовала, если AaOKS был мечен C-концевой his-меткой, и это демонстрировало, что HIS-метка не мешала ферментативной активности. Результаты демонстрировали, что AaOKS, которая гетерологично экспрессировалась у *N. benthamiana*, обладала октакетидсинтазной активностью, и что аффинно очищенный фермент *in vitro* производил октакетидные побочные продукты SEK4 и SEK4B.

Заключение.

Результаты продемонстрировали, что AaOKS, которая гетерологично экспрессировалась у *N. benthamiana*, обладала октакетидсинтазной активностью, и что аффинно очищенный фермент *in vitro* производил октакетидные побочные продукты SEK4 и SEK4B.

Пример 10. Клонирование укороченных версий DcUGT2 в *S. cerevisiae* и тестирование их активности *in vitro* в отношении FK и КА.

Материалы и способы.

Конструкции экспрессии гена укороченной DcUGT2 у *S. cerevisiae*.

Создавали укороченные формы DcUGT2, у которых отсутствовала как сигнальная последовательность, так и мембранный якорь (ASP_DcUGT2ΔMD-Strep), или только мембранный якорь (DcUGT2ΔMD-Strep). Фрагменты, кодирующие ASP_DcUGT2ΔMD-Strep и DcUGT2ΔMD-Strep, амплифицировали отдельно от плазмиды pYES-DEST52-DcUGT2-Strep с использованием специфичных ПЦР-праймеров для включения C-концевой StrepII-метки (см. таблицу ниже). Сайты рекомбинации Gateway, attB1 и attB2 вводили в созданные фрагменты при последующей ПЦР с использованием прямого праймера 5'-ggggacaagtgtgtacaaaaagcaggct-3' и обратного праймера 5'-ggggaccacttgtacaagaagctgggt-3'. ASP_DcUGT2ΔMD-Strep и DcUGT2ΔMD-Strep, фланкированные сайтами attB, клонировали в плазмиду pDONR207 (Invitrogen) и переносили в плазмиду-приемник pYES-DEST52 (Invitrogen) с помощью системы на основе технологии Gateway. Две плазмидные конструкции pYES-DEST52 трансформировали отдельно в дрожжевой штамм Invscl (Invitrogen), а положительных трансформантов верифицировали с помощью ПЦР. Продуцирование гетерологичного белка осуществляли в соответствии с инструкциями для плазмиды pYES-DEST52 Gateway (Invitrogen). Продуцирование гетерологичного белка с меткой StrepII верифицировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к Strep. Фракцию мембраносвязанных и растворимых белков получали из верифицированных дрожжевых трансформантов, как описано в (Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., Urban, P. (1996). Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* 272:51-64), и подвергали скринингу в отношении глюкозилирующей активности к флавокермесовой кислоте/кермесовой кислоте, как описано выше.

Пример 11. Продуцирование *in planta* карминовой кислоты и DcII с помощью гетерологичной экспрессии генов, кодирующих ферменты PKS, циклазу и полноразмерную DcUGT, у *Nicotiana benthamiana*. Транзистентная экспрессия генных конструкций у *Nicotiana benthamiana*.

Синтетические фрагменты ДНК, кодирующие *ZhuI* (номер доступа в Genbank: AAG30197) и *ZhuJ* (номер доступа в Genbank: AAG30196), кодон-оптимизированные для экспрессии у *N. benthamiana* и *AaOKS* (номер доступа в Genbank: AY567707) приобретали у Genscript. Все синтетические фрагменты и описанную в данном документе плазмиду *pYES-DEST52-DcUGT2-Strep* использовали в качестве ПЦР-матриц с совместимыми дезоксиурицил(dU)-содержащими праймерами (см. табл. 5 ниже) для создания конструкций, которые клонировали в *pEAQ-HT-USER* с помощью технологии *USER*. Укороченную версию *DcUGT2*, *DcUGT2ΔMD-Strep* переносили из плазмиды *pDONR207* (Invitrogen) в плазмиду-приемник, *pEAQ-HT-DEST1* (Sainsbury, F., Saxena, P., Geisler, K., Osbourn, A., Lomonosoff, G.P. (2012). Using a Virus-Derived System to Manipulate Plant Natural Product Biosynthetic Pathways. *Methods Enzymol.* 517:185-202) с помощью системы на основе технологии *Gateway*. Все плазмидные конструкции *pEAQ-HT* трансформировали в штамм *AGL-1 Agrobacterium tumefaciens* и инфильтровали в листья растений *N. Benthamiana*, как описано в (Bach, S.S., Bassard, J.E., Andersen-Ranberg, J., Moldrap, M.E., Simonsen, H.T., Hamberger, B. (2014). High-Throughput Testing of Terpenoid Biosynthesis Candidate Genes Using Transient Expression in *Nicotiana benthamiana*. In M Rodriguez Concepcion, ed, *Plant Isoprenoids, Methods in Molecular Biology*, Vol. 1153. Humana Press, New York).

Таблица 5
Последовательности праймеров для амплификации
различных генных конструкций

Фрагменты гена	Последовательность праймера	
AaOKS	Прямой	5'-GGCTTAA/dU/ATGAGTTCACCTCCAACGCTCCCATC-3'
	Обратный	5'-GGTTAA/dU/TTACATGAGAGGCAGGCTGTGGAGAAGGATAGT-3'
ZhuI	Прямой	5'-GGCTTAA/dU/ATGAGGCATGTCGAGCAT-3'
	Обратный	5'-GGTTAA/dU/TTATGCCGTGACAGTCCGACAC-3'
ZhuJ	Прямой	5'-GGCTTAA/dU/ATGTCCGGACGTAAGACG-3'
	Обратный	5'-GGTTAA/dU/TTAATCTTCCTCCTCTGTCAA-3'
DcUGT2-Strep	Прямой	5'-GGCTTAA/dU/ATGGAATTCAGATTGTTGATATTGGCCT-3'
	Обратный	5'-GGTTAA/dU/TTATTTTCGAATTGTGGATGAGACCAAGCAGA-3'
DcUGT2ΔMD-Strep	Прямой (attB1)	5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggct-3'
	Обратный	5'-TTATTTTCGAATTGTGGATGAGACCAAGCAGAGTGCAA AAAGGCACCTGCAGT-3'

Экстракция метаболитов и LC-MS/MS анализ.

Метаболиты экстрагировали из дисков (0=3 см) агроинфильтрованных листьев *N. benthamiana*. Листовые диски, вырезанные с помощью сверла для пробок, замораживали в жидком азоте. 0,5 мл экстракционного буфера из (85% (об./об.) метанола, 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты, уравновешенного до 50°C, добавляли к каждому замороженному листовому диску с последующей инкубацией в течение 1 ч при 50°C, перемешивая при 600 об/мин. Надосадочную жидкость отделяли и пропускали через 0,45 мкм фильтровальную пластину Multiscreen_{HTS} HV (Merck Milipore). Отфильтрованную надосадочную жидкость подвергали LC-MS/MS анализу, который осуществляли на системе для HPLC Agilent 1200, соединенной с масс-спектрометром Bruker micrOTOF-Q II, снабженным источником ионизации методом электрораспыления. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Luna C₁₈ (2) (150×4,6 мм, 3 мкм, 100 Å, Phenomenex), поддерживаемой при 40°C. Водный элюент (A) состоял из воды/ацетонитрила

(95:5, об./об.), и органический элюент (В) состоял из воды/ацетонитрила (5:95, об./об.); оба подкисленные 0,1%-ной муравьиной кислотой. В соответствии с целью анализа использовали два различных профиля линейного градиентного элюирования:

Способ 1: 0 мин, 0% В; 30 мин, 100% В; 33 мин, 100% В; 35 мин, 0% В. Скорость потока поддерживали на уровне 0,5 мл/мин и при этом использовали 10-минутное уравнивание. Время удержания составляло 15,5 мин для deII, 15,6 мин для карминовой кислоты (СА), 17,1 мин для флавокермесовой-О-Glc 2 (FK-O-Glc 2), 17,2 мин для SEK4, 17,7 мин для SEK4B, 22,7 мин для флавокермесовой кислоты (FK) и 22,7 мин для кермесовой кислоты (КА).

Способ 2: 0 мин, 10% В; 25 мин, 20% В; 27 мин, 100% В; 35 мин, 100% В; 36 мин, 10% В. Скорость потока поддерживали на уровне 0,5 мл/мин и при этом использовали 10-минутное уравнивание.

Время удержания составляло 16,1 мин для флавокермесовой-О-Glc 1 (FK-O-Glc 1), 17,0 мин для deII, 18,2 мин для карминовой кислоты (СА), 24,1 мин для SEK4, 25,5 мин для флавокермесовой-О-Glc 2 (FK-O-Glc 2), 26,8 мин для SEK4B, 35,5 мин для флавокермесовой кислоты (FK) и 36,0 мин для кермесовой кислоты (КА).

О-глюкозиды выявляли с помощью обработки L-вискозимом и по потере нейтральных частиц размером 162 Да в спектре MS/MS.

Результаты.

AaOKS из *Aloe arborescens* ранее была охарактеризована как октакетидсинтаза, принадлежащая к классу ферментов PKS III типа. Для исследования возможности применения такого фермента PKS III типа с целью создания октакетидного предшественника, необходимого для продуцирования карминовой кислоты, ген AaOKS транзигентно экспрессировали у *N. benthamiana*. Ген AaOKS по сравнению с пустой контрольной плазмидой приводил к образованию SEK4 и SEK4B после агроинфильтрации в листья *N. benthamiana*. Это демонстрировало, что AaOKS способна функционировать как активная октакетидсинтаза *in vivo* у *N. benthamiana*. Более того, поскольку антрон флавокермесовой кислоты (FK) или FK не наблюдался, в случае если была агроинфильтрована только AaOKS, то *N. benthamiana* не могла иметь эндогенных ферментов для дальнейшей метаболизации SEK4 и SEK4B в эти соединения. Следовательно, гены циклазы *ZhuI* и *ZhuJ* были совместно агроинфильтрованы с AaOKS. *ZhuI* и *ZhuJ* получали в ходе биосинтеза антибиотика R1128 и ранее были объединены *in vivo* с минимальной PKS для синтеза актинородина у *Streptomyces coelicolor* для выработки FK (Tang, Y., Lee, T.S., Khosla, C. (2004). Engineered biosynthesis of regioselectively modified aromatic polyketides using bimodular polyketide synthases. PLOS Biol. 2(2):E31). У *N. benthamiana*, в случае если *ZhuJ* была совместно агроинфильтрована с AaOKS, наблюдали накопление FK и флавокермесовой кислоты-О-глюкозида, FK-O-Glc 2, однако этого не происходило в том случае, когда AaOKS была совместно агроинфильтрована с *ZhuI*. Продуцирование FK-O-Glc 2 свидетельствовало, что одна или несколько эндогенных UGT *N. benthamiana* способны эффективно использовать FK в качестве субстрата. Дополнительно, совместная агроинфильтрация *ZhuI* с AaOKS уменьшала продуцирование SEK4B, способствуя продуцированию SEK4, что соответствовало предыдущему выводу о том, что *ZhuI* управляет начальной C7-C12 циклизацией (а не C10-C15-циклизацией), которая приводит к образованию SEK4B) линейного октакетида (Ames, B.D., Lee, M.Y., Moody, C, Zhang, W., Tang, Y., Tsai, S.C. (2011). Structural and biochemical characterization of *ZhuI* aromatase/cyclase from the R1128 polyketide pathway. Biochemistry. 39: 8392-8406). Эта начальная C7-C12-циклизация также необходима для биосинтеза антрахинонового остова FK/CA, и в случае если *ZhuI* подвергалась совместной агроинфильтрации с AaOKS и *ZhuJ*, то общий пул FK и флавокермесовой кислоты-О-глюкозида действительно заметно увеличивался по сравнению с ситуацией, когда она отсутствовала.

In planta продуцирование DCII и СА обнаруживали в том случае, если полноразмерная DcUGT2_Strep коэкспрессировалась с AaOKS, *ZhuI* и *ZhuJ* у *N. benthamiana*. Продуцирование СА обнаруживали лишь в незначительных количествах по сравнению с уровнями DCII. Такое продуцирование СА вероятно было связано с неспецифичной эндогенной монооксигеназной активностью у *N. benthamiana*, которая способна гидроксировать либо FK до кермесовой кислоты (КА), либо DCII до СА. Тем не менее, следует отметить, что КА нельзя было обнаружить ни в одном из исследований по агроинфильтрации, что указывало на то, что это соединение либо вырабатывалось на уровнях ниже предела обнаружения, доступного авторам, либо оно могло быть высокотоксичным для *N. benthamiana* и поэтому быстро метаболизировалось в неизвестные продукты.

Заключения.

Результаты этого примера демонстрировали:

(i) ген AaOKS растения *Aloe arborescens* был транзигентно экспрессирован у *N. benthamiana* и *in vivo*, что приводило к образованию SEK4 и SEK4B, что демонстрировало, что AaOKS способна функционировать как активная октакетидсинтаза *in vivo* в *N. benthamiana*;

(ii) поскольку антрон флавокермесовой кислоты (FK) или FK не наблюдался, в случае если была агроинфильтрована только AaOKS, то *N. benthamiana* не могла иметь эндогенных ферментов для дальнейшей метаболизации SEK4 и SEK4B в эти соединения;

(iii) гены циклазы *ZhuI* и *ZhuJ* из *Streptomyces* штамма R1128 подвергались совместной агроинфильтрации с AaOKS, и в случае если *ZhuJ* подвергалась совместной агроинфильтрации с AaOKS, то наблюда-

ли накопление FK и флавокермесовой кислоты-О-глюкозида, FK-O-Glc 2. В случае если ZhuI подвергалась совместной агроинфильтрации с AaOKS и ZhuJ, то общий пул FK и флавокермесовой кислоты-О-глюкозида действительно заметно увеличивался по сравнению с ситуацией, когда она отсутствовала. Следовательно, гетерологичная экспрессия генов циклаз *Streptomyces* sp приводила к *in vivo* продуцированию различных соединений, в том числе FK;

(iv) *in vivo* продуцирование DCII и CA обнаруживали в том случае, если полноразмерная DcUGT2_Strep коэкспрессировалась с AaOKS, ZhuI и ZhuJ у *N. benthamiana*.

Пример 12. Гетерологичная экспрессия укороченной версии DcUGT2 и тестирование ее *in planta* активности у *N. benthamiana*.

Для исследования того, может ли белок DcUGT2 быть сольбилизован и все еще сохранять гликозилирующую активность в отношении КА и FK, удаляли мембранный якорь. С помощью биоинформационных методов получали прогноз, что DcUGT2 должна быть локализована в ER с помощью C-конца, который заякорен в ER мембране, а N-концевой активный участок обращен к просвету. Поэтому был рассмотрен вопрос, может ли белок быть N-гликозилированным и, если это возможно, может ли требоваться посттрансляционная модификация для активности фермента DcUGT2. Анализ проводили на основе биоинформационных методов для прогнозирования N-гликозилирования, с помощью которого выявляли 3 предполагаемых сайта N-гликозилирования. Для исследования того, играет ли гликозилирование и нацеливание на ER некую роль в отношении активности фермента DcUGT2, создавали укороченную форму DcUGT2, где сигнальный пептид оставался интактным, однако мембранный якорь был удален (DcUGT2ΔMD-Strep). Этот белок DcUGT2ΔMD-Strep был активным *in vivo* и продуцировал DCII при коэкспрессии с AaOKS и ZhuJ у *N. benthamiana*. Продуцирование DCII было ниже у этих растений по сравнению с уровнями DCII у растений, подвергнутых совместной агроинфильтрации с DcUGT2. Это может означать, что хотя протеин DcUGT2ΔMD-Strep и был активным, уровень ферментативной активности мог быть снижен в результате удаления мембранного якоря. Тот факт, что DcUGT2ΔMD-Strep все еще обладал некоторой гликозилирующей активностью в отношении FK и/или КА, дополнительно свидетельствовал о том, что N-гликозилирование и(или) нацеливание на ER белка могло быть важным для активности фермента. Кроме того, следует отметить, что полноразмерная DcUGT2 по-видимому эффективно конкурировала с O-гликозилирующей активностью в отношении FK у *N. benthamiana*, значимо уменьшая тем самым пул флавокермесовой кислоты-О-Glc (FK-O-Glc 1 и 2), и что этого не наблюдали для укороченной версии DcUGT2ΔMD-Strep.

Заклучения.

Результаты этого примера продемонстрировали, что DcUGT2ΔMD-Strep (без мембранного якоря - аминокислот 1-468 из SEQ ID NO: 2) был активен *in vivo* у растения *N. benthamiana*.

Активность DcUGT2ΔMD-Strep (без мембранного якоря) была меньше, чем у полноразмерного фермента DcUGT2, однако тот факт, что он был активным, может свидетельствовать о том, что он может быть особенно полезным для гетерологичного продуцирования, например, у прокариотических организмов.

Список литературы

- 1: US 5424421 (European Colour, published 1995)
- 2: WO 2006/056585A1 (Chr. Hansen A/S)
- 3: Stathopoulou et al (Analytica Chimica Acta 804 (2013) 264–272)
- 4: Zagrobelny et al (Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions; Phytochemistry. 2004 Feb; 65(3):293-306)
- 5: Geuder et al (Journal of Chemical Ecology, Vol. 23, No. 5, 1997)
- 6: Genta et al. (Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae), Journal of Insect Physiology 52 (2006) 593–601
- 7: WO 2004/111254A1 (Poalis A/S)
- 8: Gutmann et al (Pure Appl. Chem, 2013-07-09)
- 9: Baig et al (Angew Chem Int Ed Engl. 2006 Nov 27; 45(46):7842-6)
- 10: Radomska-Pandya A, Bratton SM, Redinbo MR, Miley MJ. Drug Metab Rev. 2010 Feb; 42(1):133-44)
- 11: Plant Physiology, November 2008, Vol. 148, pp. 1295–1308
- 12: Esben Halkjaer Hansen et al. Phytochemistry 70(4): 473-482
- 13: Tang, Y., Lee, T. S., and Khosla, C. (2004) Engineered biosynthesis of regioselectively modified aromatic polyketides using bimodular polyketide synthases. PLoS Biol. 2, e31
14. Mizuuchi Y, Shi SP, Wanibuchi K, Kojima A, Morita H, Noguchi H, Abe I. Novel type III polyketide synthases from *Aloe arborescens*. FEBS J. 2009 Apr; 276(8):2391-2401.

15. Karppinen K, Hokkanen J, Mattila S, Neubauer P, Hohtola A. Octaketide-producing type III polyketide synthase from *Hypericum perforatum* is expressed in dark glands accumulating hypericins. FEBS J. 2008 Sep; 275(17):4329-4342.

16. Dayu Yu, Fuchao Xu, Jia Zeng, Jixun Zhan. Type III Polyketide Synthases in Natural Product Biosynthesis. IUBMB Life, 64(4): 285-295, April 2012

17. Supriya Jadhav, Prasad Phapale, Hirekodathakallu V. Thulasiram, Sujata Bhargava. Polyketide synthesis in tobacco plants transformed with a *Plumbago zeylanica* type III hexaketide synthase. Phytochemistry 98 (2014) 92-100.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения C₁₄-C₁₈-соединения антрахинона или антрона, где способ предусматривает следующие стадии:

(I) приведение в контакт *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине, содержащей рекомбинантно введенный ген поликетидсинтазы (PKS) III типа, кодирующий октакетидсинтазу (OKS), и где OKS происходит из рода, отличного от рода клетки-хозяина,

(i) подходящего начального звена и удлиняющих звеньев с рекомбинантно введенной OKS, способной превращать начальное и удлиняющие звенья в невосстановленный октакетид в подходящих условиях, где обеспечивают образование невосстановленного октакетида *in vivo*, где подходящее начальное звено представляет собой ацетил-СоА и/или малонил-СоА и где удлиняющие звенья представляют собой малонил-СоА; и

(II) превращение *in vivo* в рекомбинантной клетке-хозяине невосстановленного октакетида из стадии (I) в C₁₄-C₁₈-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, где C₁₄-C₁₈-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из соединения антрахинона и соединения антрона; и

(III) выделение представляющего интерес соединения, полученного на стадии (II), с получением композиции, где композиция содержит менее 1% вес./вес. сухого вещества материала рекомбинантной клетки-хозяина и где рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку растения, клетку мицелиального гриба или дрожжевую клетку.

2. Способ по п.1, где рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит ген гликозилтрансферазы, кодирующей гликозилтрансферазу, и при этом полученное на стадии (II) C₁₄-C₁₈-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, подвергается *in vivo* гликозилрованию гликозилтрансферазой с получением C₁₄-C₁₈-ароматического соединения гликозида, представляющего интерес, где C₁₄-C₁₈-ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из соединения антрахинона и соединения антрона; и при этом стадия (III) относится к выделению представляющего интерес C₁₄-C₁₈-ароматического соединения гликозида с получением композиции, где композиция содержит менее 1% вес./вес. сухого вещества материала рекомбинантной клетки-хозяина.

3. Способ по п.1 или 2, где рекомбинантная клетка-хозяин, определенная в п.1, представляет собой растущую рекомбинантную клетку-хозяина, и при этом стадия (I) и стадия (II), определенные в п.1, предусматривают:

(I) приведение в контакт *in vivo* в растущей рекомбинантной клетке-хозяине, содержащей рекомбинантно введенный ген поликетидсинтазы (PKS) III типа, кодирующий октакетидсинтазу (OKS), и где OKS происходит из рода, отличного от рода клетки-хозяина,

(i) подходящего начального звена и удлиняющих звеньев с рекомбинантно введенной OKS, способной превращать начальное и удлиняющие звенья в невосстановленный октакетид в условиях, подходящих для роста, где обеспечивают образование невосстановленного октакетида *in vivo*, где подходящее начальное звено представляет собой ацетил-СоА и/или малонил-СоА и где удлиняющие звенья представляют собой малонил-СоА; и

(II) превращение *in vivo* в растущей рекомбинантной клетке-хозяине невосстановленного октакетида, полученного на стадии (I), в C₁₄-C₁₈-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, где C₁₄-C₁₈-ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из соединения антрахинона и соединения антрона.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку растения и где клетка растения происходит из *Nicotiana* sp., и при этом, в случае если клетка представляет собой клетку *Nicotiana benthamiana*, в нее вводят ароматазу/циклазу ZhuI *Streptomyces*, представленную в SEQ ID NO: 17, и/или ароматазу/циклазу ZhuJ *Streptomyces*, представленную в SEQ ID NO: 19.

5. Способ по любому из пп.1-3, где рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку мицелиального гриба и где клетка мицелиального гриба представляет собой клетку *Aspergillus*.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где ген поликетидсинтазы (PKS) III типа из стадии (I) представляет собой ген PKS из растения и где растение представляет собой растение, выбранное из

группы, состоящей из *Aloe* spp. и *Huregicum* spp.

7. Способ по п.6, где октакетидсинтаза (OKS) из стадии (I), определенной в п.1, представляет собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность с аминокислотами 1-403 из SEQ ID NO: 7 (AaOKS).

8. Способ по п.6, где октакетидсинтаза (OKS) из стадии (I), определенной в п.1, представляет собой OKS, содержащую аминокислотную последовательность с аминокислотами 1-393 из SEQ ID NO: 15 (HrPKS2).

9. Способ по любому из пп.6-8, где

рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина, выбранную из группы, состоящей из *Aspergillus* и *Nicotiana* sp., при этом, в случае если клетка представляет собой клетку *Nicotiana benthamiana*, в нее вводят ароматазу/циклазу ZhuI *Streptomyces*, представленную в SEQ ID NO: 17, и/или ароматазу/циклазу ZhuJ *Streptomyces*, представленную в SEQ ID NO: 19; и

OKS происходит из рода, отличного от рода клетки-хозяина.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где C_{14} - C_{18} -ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, является C_{16} -ароматическим соединением агликона, представляющим интерес.

11. Способ по п.10, где C_{16} -ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, является флавокермесовой кислотой (FK) или кермесовой кислотой (КА).

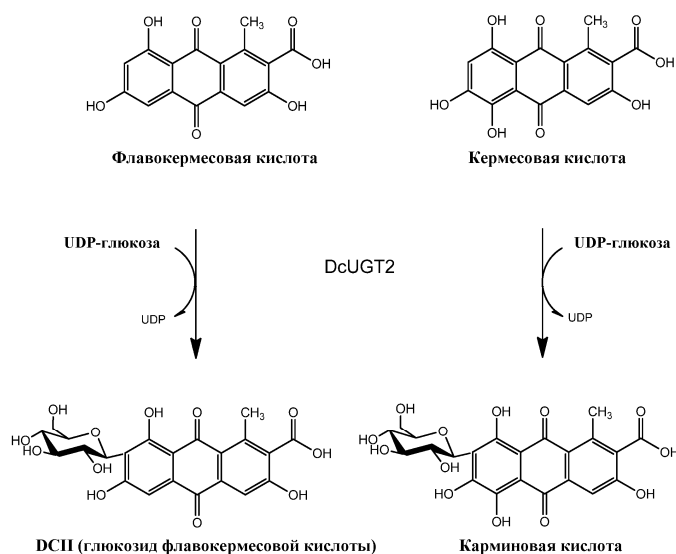
12. Способ по любому из предыдущих пунктов, где превращение *in vivo* на стадии (II), определенной в п.1, невосстановленного октакетиды в C_{14} - C_{18} -ароматическое соединение агликона, представляющее интерес, происходит с участием по меньшей мере одной действующей *in trans* (независимо от фермента PKS) ароматазы/циклазы.

13. Способ по п.12, где ароматаза/циклаза представляет собой ароматазу/циклазу, содержащую аминокислотную последовательность с аминокислотами 1-169 из SEQ ID NO: 17 (ZhuI *Streptomyces*); и/или где ароматаза/циклаза представляет собой ароматазу/циклазу, содержащую аминокислотную последовательность с аминокислотами 1-256 из SEQ ID NO: 19 (ZhuJ *Streptomyces*).

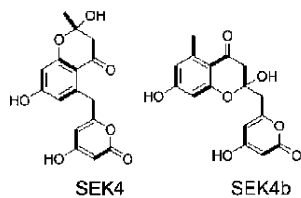
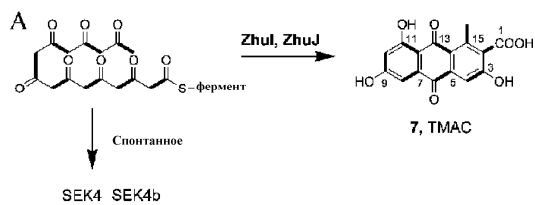
14. Способ по п.13, где C_{14} - C_{18} -ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является C_{16} -ароматическим соединением гликозида, представляющим интерес, и где C_{16} -ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является гликозидом флавокермесовой кислоты или гликозидом кермесовой кислоты.

15. Способ по п.14, где C_{16} -ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является гликозидом флавокермесовой кислоты, и при этом гликозид флавокермесовой кислоты представляет собой гликозид флавокермесовой кислоты (DcII).

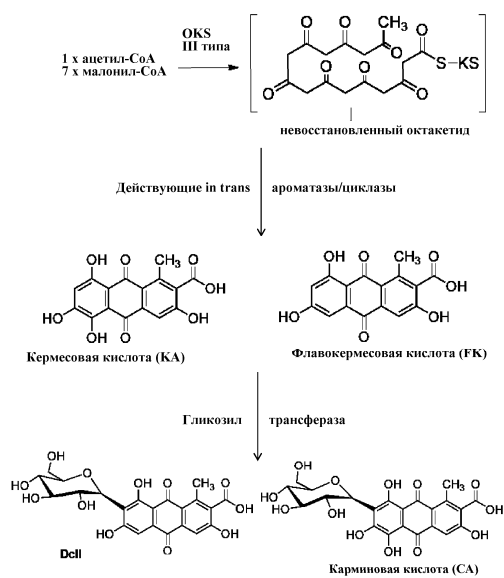
16. Способ по п.14, где C_{16} -ароматическое соединение гликозида, представляющее интерес, является гликозидом кермесовой кислоты, и при этом гликозид кермесовой кислоты представляет собой карминовую кислоту (CA).



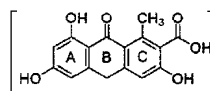
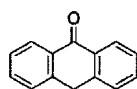
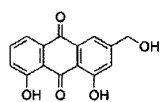
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

