

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092799 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.01

(51) Int. Cl. C12N 9/10 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12P 33/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.21

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СТЕРОЛ-АЦИЛТРАНСФЕРАЗЫ

(31) 00627/18

(32) 2018.05.22

(33) CH

(86) PCT/EP2019/063076

(87) WO 2019/224187 2019.11.28

(71) Заявитель:
ДСМ АйПи АССТЕС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Фаррел Кристофер Марк, Лапраде
Лиза Энн (US), Леман Отто Мартин
(CH), Трухарт Джошуа (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение касается модифицированных ферментов - стерол-ацилтрансфераз с улучшенной активностью и/или специфичностью в отношении ацилирования предшественника витамина D3, 7-дегидрохолестерина (7-DHC), для применения при биотехнологическом получении витамина D3. Кроме того, изобретение касается дрожжевых штаммов, экспрессирующих данные модифицированные ферменты, и их применения в способе получения витамина D3 или его производных и/или метаболитов.

202092799

A1

A1

202092799

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СТЕРОЛ-АЦИЛТРАНСФЕРАЗЫ

Настоящее изобретение касается модифицированных ферментов – стерол-ацилтрансфераз с улучшенной активностью и/или специфичностью в отношении ацилирования предшественника витамина D3, 7-дегидрохолестерина (7-DHC), для применения при биотехнологическом производстве витамина D3. Кроме того, изобретение касается дрожжевых штаммов, экспрессирующих данные модифицированные ферменты, и их применения в способе получения витамина D3 или его производных и/или метаболитов.

Витамин D3 (также известный как холекальциферол или кальциол) может синтезироваться в коже млекопитающих из провитамина D3 (также известного как 7-дегидрохолестерин или 7-DHC), который является продуктом биосинтеза холестерина, под воздействием УФ-света, при этом 7-DHC фотохимически превращается в провитамин D3, который изомеризуется при температуре тела до биологически активной формы витамина D3. В печени витамин D3 превращается в биологически неактивный 25-гидроксивитамин D3 (также известный как кальцидиол, кальцифедиол, 25-гидроксихолекальциферол, 25-OH-D3 или H_2D), который является основной циркулирующей формой витамина D3. Дальнейшее гидроксилирование происходит в почках.

Для промышленного производства витамина D3 доступен (в принципе) как химический, так и биотехнологический синтез. Химический синтез начинается с холестерина, выделенного, например, из шёрстного жира, который дегидрогенизируется до 7-DHC, важного промежуточного продукта как при химическом, так и биотехнологическом синтезе. Под воздействием УФ-излучения и дополнительных стадий очистки/экстракции 7-DHC превращается в витамин D3. Для биосинтеза 7-DHC можно использовать модифицированные штаммы дрожжей, в которых ацетил-КоА в многоступенчатом ферментативном процессе превращается в 7-DHC. Данная энзиматическая конверсия происходит в эндоплазматическом ретикулуме дрожжей. Избыточные количества стеролов, включая 7-DHC и его предшественники, которые не нужны в клеточных мембранах, токсичны для дрожжей, поэтому они накапливаются в виде стерильных эфиров во внутриклеточных органеллах (так называемых липидных тельцах), из которых они также могут быть выделены. Равновесие между свободными стеролами и стеролами, хранящимися в липидных телах (в основном в форме стерильных эфиров), запускается под действием нескольких белков (ферментов), включая действие стерол-ацилтрансфераз. У дрожжей, особенно у *Saccharomyces cerevisiae*, образование

сложных эфиров стеролов в основном осуществляется двумя стерол-ацилтрансферазами: Are1p и Are2p.

Вследствие неспецифического действия данных ферментов – стерол-ацилтрансфераз пул стерильных эфиров, который хранится в липидных тельцах, относительно разнообразен, включая, без ограничения, например, сложные эфиры эргостерола, зимостерола, ланостерола, латостерола, холеста-5,7,24(25)-триенола или 7-DHC. Поскольку для синтеза витамина D₃ может использоваться только холеста-5,7,24(25)-триенол, предшественник 7-DHC, а не зимостерол, то существует необходимость либо в избирательном хранении определенных сложных эфиров, таких, например, как сложные эфиры 7-DHC, в липидных тельцах, и/или в повышении оборота промежуточных продуктов 7-DHC, вырабатываемых такими штаммами дрожжей, которые далее превращаются в витамин D₃ и/или его производные или метаболиты. Конкретным метаболитом, на котором и сосредоточено настоящее изобретение, является 25-гидроксивитамин D₃.

Таким образом, текущей задачей является создание клеток хозяина типа дрожжей, способных вырабатывать стеролы с высокой продуктивностью/специфичностью для 7-DHC и/или с меньшим накоплением побочных/промежуточных продуктов, включая зимостерол, ланостерол и латостерол, в частности, сложных эфиров таких промежуточных продуктов, которые хранятся в липидных тельцах.

Неожиданно оказалось, что специфичность активности стерол-ацилтрансфераз в клетках хозяина можно сместить в сторону 7-DHC посредством введения определенных аминокислотных замен в последовательность ARE2 и/или ARE1, что приведет к повышению продуктивности и/или соотношения продуктов в клетках хозяина в сторону 7-DHC как важного промежуточного продукта при производстве витамина D₃.

Так, настоящее изобретение направлено на модифицированные ферменты со стерол-ацилтрансферазной активностью, т.е. модифицированные стерол-ацилтрансферазы, в частности, на изоформы стерол-ацилтрансферазы Are1p и/или Are2p, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам, выбранным из 592 и/или 595 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, причем данные модифицированные ферменты обладают большей специфичностью к 7-DHC, чем к побочным/промежуточным продуктам, включая зимостерол.

Полипептид по SEQ ID NO: 1, проявляющий активность ARE1, включая полинуклеотиды, кодирующие такой полипептид по SEQ ID NO: 1, был выделен из *Saccharomyces cerevisiae*. Полипептид по SEQ ID NO: 3, проявляющий активность ARE2, включая полинуклеотиды, кодирующие такой полинуклеотид по SEQ ID NO: 3, был

выделен из *Saccharomyces cerevisiae*.

Термины “стерол-ацилтрансфераза”, “ацилтрансфераза”, “ARE”, “фермент, обладающий ацилтрансферазной активностью” или просто “фермент” применяются здесь взаимозаменяемо и относятся к ферментам ЕС 2.3.1.26, то есть к ацилтрансферазам, переносящим жирноацильные группы из одной молекулы к другой. Такой перенос или ферментативную активность можно измерить известными специалистами способами. Стерол-ацилтрансферазы были выделены из различных источников, в том числе из млекопитающих, дрожжей или растений. ARE1 и ARE2 способны ацилировать такие стеролы, например, как зимостерол и/или 7-DHC, в соответствующие сложные эфиры. В настоящем изобретении “модифицированный” фермент, то есть модифицированная ацилтрансфераза, обладает предпочтительной активностью и/или специфичностью в отношении этерификации 7-DHC по сравнению с этерификацией, например, зимостерола, и/или лучшим образованием сложных эфиров стеролов вообще, включая, например, 7-DHC или зимостерол. Предпочтительными изоформами ацилтрансферазы являются Are1p или Are2p. “Немодифицированная” стерол-ацилтрансфераза, в частности ARE1 и ARE2, в настоящем изобретении означает соответствующий эндогенный фермент, не несущий одну или несколько аминокислотных замен, как определено здесь.

В настоящем изобретении клетки хозяина, несущие модифицированную стерол-ацилтрансферазную активность, как определено здесь, в частности, ARE2 и/или ARE1, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, как определено здесь, именуются “модифицированными” клетками хозяина. Соответствующие клетки хозяина, несущие немодифицированную стерол-ацилтрансферазную активность, т.е. кодирующую гены ARE1 и/или ARE2 дикого типа, именуются “немодифицированными” клетками хозяина.

В настоящем изобретении термины “зимостерол”, “ланостерол”, “латостерол”, “холеста-5,8,24(25)-триенол”, “холеста-5,7,24(25)-триенол” или “7-DHC”, определяющие промежуточные соединения витамина D3, включают как свободные формы, так и формы сложных эфиров данных соединений. При этом смесь стеролов содержит 7-DHC и “побочные” или промежуточные продукты, включая, без ограничения, зимостерол, ланостерол, латостерол, холеста-5,8,24(25)-триенол или холеста-5,7,24(25)-триенол.

В настоящем изобретении “дрожжи, вырабатывающие холестерин”, больше не могут вырабатывать эргостерол, а вырабатывают продукты холестерина, включая, без ограничения, холеста-5,7,24(25)-триенол, холеста-5,8,24(25)триенол, холеста-7,24(25)-диенол, 7-DHC или зимостерол. В частности, этого можно добиться за счет введения двойного нокаута *erg5erg6*.

В одном воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 592 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену фенилаланина на лейцин (F592L). Предпочтительно фермент с модифицированной активностью ARE1 происходит из *Saccharomyces* типа *S. cerevisiae*. Используя данный модифицированный фермент ARE1, можно повысить соотношение 7-DHC к зимостеролу в смеси стеролов по меньшей мере на 15% по сравнению со штаммом, экспрессирующим немодифицированный эндогенный ARE1.

В другом воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 595 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену глицина на аспарагиновую кислоту (G595D). Предпочтительно фермент с модифицированной активностью ARE1 происходит из *Saccharomyces* типа *S. cerevisiae*. Используя данный модифицированный фермент ARE1, можно повысить соотношение 7-DHC к зимостеролу в смеси стеролов более чем вдвое, т.е. повысить по меньшей мере на 55% по сравнению со штаммом, экспрессирующим немодифицированный эндогенный ARE1.

В одном воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 624 в полипептиде по SEQ ID NO: 3, предпочтительно замену фенилаланина на лейцин (F624L). Предпочтительно фермент с модифицированной активностью ARE2 происходит из *Saccharomyces* типа *S. cerevisiae*. Используя данный модифицированный фермент ARE2, можно повысить соотношение 7-DHC к зимостеролу в смеси стеролов по меньшей мере на 15% по сравнению со штаммом, экспрессирующим немодифицированный эндогенный ARE2.

В другом воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 627 в полипептиде по SEQ ID NO: 3, предпочтительно замену глицина на аспарагиновую кислоту (G627D). Предпочтительно фермент с модифицированной активностью ARE2 происходит из *Saccharomyces* типа *S. cerevisiae*. Используя данный модифицированный фермент ARE2, можно повысить соотношение 7-DHC к зимостеролу в смеси стеролов по меньшей мере на 15% по сравнению со штаммом, экспрессирующим немодифицированный эндогенный ARE2.

Описанные аминокислотные замены в положениях, соответствующих остаткам F592L и/или G595D в SEQ ID NO: 1, можно комбинировать с другими заменами, как

определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 624 и/или 627 в полипептиде по SEQ ID NO: 3, как описано здесь. Предпочтительно можно комбинировать аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку F592L в SEQ ID NO: 1, с другими заменами типа аминокислотных замен в положениях, соответствующих G595D в SEQ ID NO: 1 и/или F624L в SEQ ID NO: 3 и/или G627D в SEQ ID NO: 3. Предпочтительным модифицированным ферментом является фермент, обладающий активностью ARE1 и содержащий по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, соответствующем G595D в SEQ ID NO: 1, проявляющий повышение титра 7-DHC по меньшей мере на 30, 35, 40, 45% и снижение зимостерола по меньшей мере на 15, 20, 25, 30% в смеси стеролов, причем содержание 7-DHC в смеси стеролов составляет 70-76%.

В настоящем изобретении активность ARE1 и/или ARE2 подвергается модификации. Это осуществляется, например, путем введения мутаций в эндогенный ген, кодирующий ARE1 и/или ARE2, то есть аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, как описано здесь. Специалистам известно, как проводятся генетические манипуляции дрожжевых клеток, приводящие к модификации активности ARE1 и/или ARE2. Эти генетические манипуляции включают, без ограничения, например, замену генов, амплификацию генов, разрушение генов, трансфекцию, трансформацию с помощью плазмид, вирусов или других векторов.

Введение мутаций в нуклеиновые кислоты или аминокислоты, то есть мутагенез, может осуществляться различными способами, такими, к примеру, как случайный или направленный мутагенез, физическое повреждение, вызванное такими агентами, к примеру, как радиация, химическая обработка или вставка генетического элемента. Специалистам известно, как вводятся мутации.

Настоящее изобретение, в частности, направлено на применение таких модифицированных ферментов ARE1 и/или ARE2, как определено здесь, в способе получения 7-DHC, промежуточного соединения для витамина D3. Предпочтительно модифицированные ферменты по настоящему изобретению вводятся и/или экспрессируются в подходящих клетках хозяина типа дрожжевых, предпочтительно вырабатывающих стеролы дрожжей, в частности, в дрожжевых клетках, вырабатывающих холестерин, как-то выбранных из *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* spp., *Pichia* spp., *Kluveromyces* spp., *Hansenula* spp. или *Yarrowia lipolytica*, предпочтительно *S. cerevisiae*. Модифицированные клетки используются для получения 7-DHC, который в дальнейшем может быть преобразован в витамин D3 и/или 25-гидроксивитамин D3.

Подходящие клетки хозяина могут подвергаться дополнительным модификациям

для дальнейшего повышения продукции 7-DHC, важного промежуточного продукта для биосинтеза витамина D₃, и/или для снижения накопления побочных продуктов.

Так, в одном воплощении изобретение направлено на штамм дрожжей с модифицированной активностью ARE1 и/или ARE2, при этом также инактивированы ERG5 и ERG6. Дрожжевые клетки могут подвергаться дополнительной модификации посредством экспрессии гетерологичного фермента, обладающего активностью C24-редуктазы, в особенности из числа EC 1.3.1.72, типа гетерологичной C24-редуктазы, действующей на холеста-7,24-диенол, зимостерол или триенол (например, холеста-5,7,25-триенол), предпочтительно растительной или стерол- Δ 24-редуктазы позвоночных, более предпочтительно из позвоночных, еще более предпочтительно из человека, свиньи, собаки, мыши, крысы, лошади, *Danio rerio* или же любого известного источника, если только она может экспрессироваться в данных дрожжевых клетках. Наиболее предпочтительно стерол- Δ 24-редуктаза выбрана из *Danio rerio*, крысы или человека. Последовательности, экспрессирующие данные ферменты стерол- Δ 24-редуктазы, являются общедоступными, включая, без ограничения, ссылки Q15392, Q60HC5, Q8VCH6, Q5BQE6, Q39085 или P93472 из UniProtKB/Swiss-Prot (например, см. WO 2003/064650). При использовании такого штамма дрожжей содержание 7-DHC в смеси стеролов будет составлять от 70% и более, предпочтительно типа 75, 80, 88, 90, 95, 98% от общего количества стеролов.

В другом воплощении клетки хозяина по настоящему изобретению могут подвергаться дальнейшей модификации посредством введения гомологов эндогенных ферментов, участвующих в биосинтезе 7-DHC, таких, например, как C5-стерол-десатураза (ERG3) и/или C8-стерол-изомераза (ERG2), что ведет к повышению специфичности и/или продуктивности по 7-DHC со снижением накопления побочных продуктов или промежуточных соединений витамина D₃, в том числе, без ограничения, зимостерола, ланостерола и/или латостерола. Предпочтительно модифицированные клетки хозяина, как определено здесь, содержат гетерологичную ERG2 и/или ERG3, причем ERG2 предпочтительно выбрана из *Ustilago maydis* (последовательность происходит из UniProtKB P32360), а/или ERG3 предпочтительно выбрана из *Pichia pastoris* (последовательность происходит из UniProtKB C4QY87) или *Schizosaccharomyces pombe* (последовательность происходит из UniProtKB O94457). Штаммы, содержащие гомологи ERG2 и ERG3 вместе с модифицированными ARE1 и/или ARE2, как определено здесь, вырабатывают смесь стеролов с содержанием 7-DHC более 80% и повышением соотношения 7-DHC к холеста-8-енолу и/или латостеролу по меньшей мере на 15-20%. Еще более предпочтительным является модифицированный штамм, как определено здесь,

дополнительно содержащий две или несколько копий гомологов ERG2 и/или ERG3, как описано выше.

В конкретном воплощении изобретение касается способа улучшения клеток хозяина в отношении продукции 7-DHC, причем клетки хозяина модифицированы, как определено здесь, т.е. модифицированы путем введения одной или нескольких аминокислотных замен в стерол-ацилтрансферазы ARE1 и/или ARE2, как определено здесь, в частности, дрожжевые клетки, вырабатывающие холестерин, предпочтительно это дрожжевые клетки, в которых инактивированы ERG5 и ERG6 и в которых необязательно экспрессируется гетерологичный фермент, обладающий активностью C-24-редуктазы, как определено здесь, и/или необязательно экспрессируются гомологи эндогенных ERG2 и/или ERG3, причем клетки хозяина улучшаются таким образом, что содержание 7-DHC в общем количестве стеролов, вырабатываемых данными клетками хозяина, повышается по меньшей мере до 70, 75, 80%, предпочтительно 88, 90, 95, 98%, в частности, при этом соотношение 7-DHC к побочным продуктам, включая зимостерол и холеста-8-енол, повышается по меньшей мере на 5, 10, 15, 18, 20, 25% по сравнению с дрожжевым штаммом, экспрессирующим немодифицированный фермент, т.е. ARE1 и/или ARE2 дикого типа.

В одном аспекте настоящего изобретения клетки хозяина, содержащие модифицированный фермент ARE1 и/или ARE2, как определено здесь, применяются в способе получения 7-DHC, предшественника витамина D3. Модифицированные клетки хозяина можно культивировать в водной среде с добавлением соответствующих питательных веществ, в аэробных или анаэробных условиях, известных специалистам, для соответствующих клеток хозяина, вырабатывающих холестерин. Необязательно такое культивирование проводится в присутствии белков и/или кофакторов, участвующих в переносе электронов, которые известны в данной области. Культивирование/выращивание клеток хозяина может проводиться в периодическом режиме, с подпиткой, в полунепрерывном или непрерывном режиме. В зависимости от клеток хозяина, предпочтительно, получение витамина D3 и его предшественников типа 7-DHC может варьироваться, как это известно специалистам. Культивирование и выделение 7-DHC и других промежуточных продуктов при получении витамина D3 описано, например, в WO 2011/067144 или WO 2017/108799. 7-DHC можно выделить и/или необязательно дополнительно очистить из смеси стеролов, а также преобразовать в витамин D3 и/или 25-гидроксивитамин D3 известными в данной области способами.

При использовании клеток хозяина, как описано здесь, можно смещать субстратную специфичность фермента стерол-ацилтрансферазы в сторону 7-DHC,

получая содержание 7-DHC в общем объеме стеролов, вырабатываемых данными клетками хозяина, по меньшей мере 70%, с титрами 7-DHC вплоть до 10 г/л и более после ферментации около 100 ч в подходящих условиях культивирования.

Термины “ARE1” и “Are1p”, “ARE2” и “Are2p”, “ERG5” и “Erg5p”, “ERG6” и “Erg6p” применяются здесь взаимозаменяемо и обозначают полипептиды, кодируемые соответствующими генами *are1*, *are2*, *erg5* и *erg6*. В целях настоящего изобретения дрожжевые клетки, вырабатывающие холестерин, модифицируют так, что они действительно проявляют модифицированную активность ARE1 и/или ARE2, например, несут модификации в эндогенном ARE1 либо в ARE2, либо в обоих, что ведет к модификации специфичности ARE1 и/или ARE2, причем данные модификации осуществляются путем введения одной или нескольких аминокислотных замен, как определено здесь.

Гены, кодирующие ERG5, ERG6, ARE1, ARE2, ERG2, ERG3 или стерол- Δ 24-редуктазу (ERG4), культивирование и генная инженерия дрожжевых клеток, которые используются здесь, известны и описаны, например, в US 7608421.

В настоящем изобретении термины “С-24-редуктаза” или “ Δ 24-редуктаза” применяются здесь взаимозаменяемо. У дрожжей этот фермент кодируется *erg4* и действует на метильную группу у атома углерода в положении 24. Триенол, который не содержит такой метильной группы в данном положении, поэтому не является приемлемым субстратом для дрожжевой ERG4.

Термины “С-8-стеролизомераза”, “дельта-8,7-изомераза” или “фермент, обладающий активностью С-8-стеролизомеразы” применяются здесь взаимозаменяемо и относятся к ферментам, которые способны катализировать превращение холеста-8-енола в холеста-7-енол и/или зимостерола в холеста-7,24-диенол. У дрожжей этот фермент кодируется *erg2*. Предпочтительным гомологом ERG2 для применения в модифицированных клетках хозяина по настоящему изобретению является полипептид, который по меньшей мере на 41%, как-то, например, по меньшей мере на 44, 45, 48, 49, 53, 56, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 или вплоть до 100% идентичен SEQ ID NO: 5 и проявляет активность С-8-стеролизомеразы, а полинуклеотиды, кодирующие такой полипептид, получены из *Ustilago maydis*. Предпочтительно в модифицированных клетках хозяина экспрессируется 1 или несколько копий типа по меньшей мере 1, 2, 3, 5 данного гомолога ERG2, как определено здесь.

Термины “С-5-стеролдесатураза”, “фермент, обладающий активностью С-5-стеролдесатуразы” применяются здесь взаимозаменяемо и относятся к ферментам, которые способны катализировать превращение холеста-8-енола в холеста-7,24-диенол

и/или холеста-7-енола в холеста-5,7,24-триенол и/или 7-DHC. У дрожжей этот фермент кодируется *erg3*. Предпочтительным гомологом ERG3 для применения в модифицированных клетках хозяина по настоящему изобретению является полипептид, который по меньшей мере на 45%, как-то, например, по меньшей мере на 50, 52, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 или вплоть до 100% идентичен SEQ ID NO: 7 и проявляет активность С-5-стеролдесатуразы, а полинуклеотиды, кодирующие такой полипептид, получены из *Pichia pastoris* или *Schizosaccharomyces pombe*. Предпочтительно в модифицированных клетках хозяина экспрессируется 1 или несколько копий типа по меньшей мере 1, 2, 3, 5 данного гомолога ERG3, как определено здесь.

Термины “идентичность последовательностей”, “% идентичности” применяются здесь взаимозаменяемо. В целях настоящего изобретения устанавливается, что для определения степени идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот эти последовательности совмещают с целью оптимального сравнения. Для оптимального совмещения двух последовательностей можно вводить пробелы в любые из двух сравниваемых последовательностей. Такое совмещение может проводиться по всей длине сравниваемых последовательностей. С другой стороны, совмещение может проводиться и по меньшей длине, к примеру, по 20, по 50, по 100 и более оснований/нуклеотидов или аминокислот. Идентичность последовательностей составляет процент идентичных совпадений между двумя последовательностями по приведенному совмещенному участку. Степень идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить по алгоритму Needleman-Wunsch для совмещения двух последовательностей (Needleman, SB and Wunsch, CD (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). По этому алгоритму можно совмещать и аминокислотные последовательности, и нуклеотидные последовательности. Алгоритм Needleman-Wunsch встроен в компьютерную программу NEEDLE. В настоящем изобретении использовалась программа NEEDLE из пакета EMBOSS (версия 2.8.0 или выше, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000). Rice, Longden and Bleasby, Trends in Genetics 16(6), pp. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Для белковых последовательностей в качестве матрицы замен используется EBLOSUM62. Для нуклеотидных последовательностей используется EDNAFULL. Оптимальные параметры – пеня за открытый пробел = 10 и пеня за расширение пробела = 0,5. Квалифицированным специалистам должно быть понятно, что все эти различные параметры будут давать несколько разные результаты, но общая степень идентичности двух последовательностей существенно не изменится при использовании разных алгоритмов.

После совмещения при помощи программы NEEDLE, как описано выше, рассчитывается степень идентичности между запрашиваемой последовательностью и последовательностью по изобретению следующим образом: количество соответствующих положений при совмещении, проявляющих идентичные аминокислоты либо идентичные нуклеотиды в обеих последовательностях, делится на общую длину совмещения за вычетом общего количества пробелов в совмещении. Идентичность, как определено здесь, можно получить из NEEDLE при помощи опции NOBRIEF, она отмечена на выходе программы как “идентичность по наибольшей длине”. Если обе сравниваемые аминокислотные последовательности не отличаются ни по одной аминокислоте, то они одинаковы или идентичны на 100%. Что касается ферментов, происходящих из растений, как определено здесь, то специалистам должно быть известно, что ферменты растительного происхождения могут содержать наводящий сигнал хлоропластов, который отщепляется определенными ферментами, такими, например, как ферменты процессинга хлоропластов (CPE).

Ферменты/гомологи ARE2 и ARE1, как определено здесь, также охватывают ферменты, несущие аминокислотные замены, которые не изменяют активность фермента, т.е. проявляют такие же свойства, как и ферменты дикого типа и катализируют ацилирование стеролов, как определено здесь. Такие мутации также называют “молчащими мутациями”, так как они не изменяют (ферментативную) активность ферментов, как описано здесь.

В настоящем изобретении термин “удельная активность” или “активность” в отношении ферментов означает их каталитическую активность, то есть способность катализировать образование продукта из данного субстрата. Удельная активность определяется количеством потребленного субстрата и/или образовавшегося продукта за определенный период времени на определенное количество белка при определенной температуре. Как правило, удельная активность выражается в мкмоль израсходованного субстрата или образовавшегося продукта за 1 минуту на мг белка. Обычно мкмоль/мин обозначается сокращенно как U (= единица). Поэтому определения единицы удельной активности в мкмоль/мин/мг белка или U/мг белка применяются здесь взаимозаменяемым образом. Фермент активен, если он проявляет свою каталитическую активность *in vivo*, то есть внутри клеток хозяина, как определено здесь, или в подходящей (бесклеточной) системе в присутствии подходящего субстрата. Специалистам известно, как измеряется активность ферментов, типа, например, методом HPLC.

В настоящем изобретении подразумевается, что организмы, как-то, например, микроорганизмы, грибы, водоросли или растения также включают синонимы или

базонимы таких видов, обладающие такими же физиологическими свойствами, как определено Международным кодексом номенклатуры прокариот или Международным кодексом номенклатуры водорослей, грибов и растений (Мельбурнский кодекс).

В частности, в настоящем изобретении представлены следующие воплощения.

1. Модифицированный фермент, обладающий стерол-ацилтрансферазной активностью, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам, выбранным из 592 и/или 595 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замен, соответствующих F592L и/или G595D.

2. Модифицированный фермент, как определено здесь и по п. 1, катализирующий эстерификацию стеролов, содержащих 7-дегидрохолестерин (7-DHC) и зимостерол, причем соотношение 7-DHC к зимостеролу в сложных эфирах стеролов повышается по меньшей мере на 15% по сравнению с соотношением 7-DHC к зимостеролу при катализе с использованием соответствующего немодифицированного фермента.

3. Модифицированный фермент, как определено здесь и по п. 1 или 2, при этом аминокислотная замена выбрана из G595D.

4. Клетки хозяина, предпочтительно дрожжевые, более предпочтительно вырабатывающих стеролы дрожжей, еще более предпочтительно дрожжей, вырабатывающих холестерин, содержащие модифицированный фермент, как определено здесь и по п. 1, 2 или 3.

5. Клетки хозяина, как определено здесь и по п. 4, которые применяются для получения смеси стеролов, содержащей 7-DHC и зимостерол, причем соотношение 7-DHC к зимостеролу повышается по меньшей мере на 15% по сравнению с клетками хозяина, экспрессирующими немодифицированный фермент.

6. Клетки хозяина, как определено здесь и по п. 4 или 5, в которых инактивированы ERG5 и ERG6.

7. Клетки хозяина, как определено здесь и по п. 4, 5 или 6, при этом клетки экспрессируют гетерологичный фермент, выбранный из ЕС 1.3.1.72, обладающий активностью стерол- $\Delta 24$ -редуктазы, причем предпочтительно гетерологичный фермент происходит из растений или позвоночных, более предпочтительно из человека, свиньи, собаки, мыши, крысы, лошади или *Danio rerio*.

8. Клетки хозяина, как определено здесь и по п. 4, 5, 6 или 7, при этом клетки хозяина выбраны из группы, состоящей из *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* и *Yarrowia*, предпочтительно из *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* spp., *Pichia* spp., *Kluyveromyces* spp., *Hansenula* spp. или *Yarrowia lipolytica*.

9. Способ снижения содержания зимостерола в смеси стеролов, содержащей зимостерол и 7-DHC, включающий культивирование клеток хозяина, как определено здесь и по п. 4, 5, 6, 7 или 8, в соответствующих условиях и необязательно выделение и/или очистку 7-DHC из смеси стеролов.

10. Способ повышения содержания 7-DHC в смеси стеролов, содержащей 7-DHC и зимостерол, включающий культивирование клеток хозяина, как определено здесь и по п. 4, 5, 6, 7 или 8, в соответствующих условиях и необязательно выделение и/или очистку 7-DHC из смеси стеролов.

11. Способ получения 7-DHC, включающий ферментативное превращение ацетил-СоА в смесь стеролов, содержащую зимостерол и 7-DHC, используя клетки хозяина, как определено здесь и по п. 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, причем содержание 7-DHC в смеси стеролов составляет по меньшей мере 70%.

12. Способ, как определено здесь и по п. 11, при этом 7-DHC дополнительно превращается в витамин D3.

13. Способ, как определено здесь и по п. 11 или 12, при этом 7-DHC дополнительно превращается в 25-гидроксивитамин D3.

14. Применение модифицированного фермента, как определено здесь и по п. 1, 2 или 3, либо клеток хозяина, как определено здесь и по п. 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, в способе получения 7-DHC, причем 7-DHC выделяют из смеси стеролов, содержащей зимостерол и 7-DHC, а соотношение 7-DHC к зимостеролу повышается по меньшей мере на 15% по сравнению со способом с использованием соответствующего немодифицированного фермента и немодифицированных клеток хозяина, соответственно.

Следующие примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения объема изобретения никоим образом.

Примеры

Пример 1. Основные методы, штаммы и плазмиды

Все основные процедуры молекулярной биологии и манипуляции с ДНК, описанные здесь, обычно проводили в соответствии с Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York; или Ausubel et al. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: New York. Генотипы используемых штаммов *S. cerevisiae* и плазмиды перечислены в таблице 1 и 2. Вырабатывающий 7-DHC штамм Y2140 *Saccharomyces cerevisiae* конструировали, исходя из фонового штамма CEN.PK дикого типа. Этот штамм дикого трансформировали кассетой с поврежденным *erg5*, которая содержала оптимизированный по кодонам ген стерол-24-редуктазы из рыбки данио, фланкированный промотором PGK1 и

терминатором CYC1, в сочетании с TRP1. После этого трансформировали кассетой с поврежденным *erg6*, которая содержала ген стерол-24-редуктазы из крыс, фланкированный промотором TDH3 и терминатором PGK1, в сочетании с LEU2. Все упомянутые штаммы являются MAT α и содержат гиперэкспрессируемую копию усеченного конститутивно активного гена HMG-CoA-редуктазы (*tHMG1*).

Таблица 1. Штаммы *Saccharomyces cerevisiae*

Y2159	<i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::Hyg^R</i> <i>TDH3p-tHMG1</i>	Классические и стандартные молекулярно-генетические методы
Y2017	<i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::PGK1p-Scer-ARE1-CYC1t-LEU2</i> <i>TDH3p-tHMG1</i>	Целенаправленная замена с помощью кассеты с LEU2
Y2157	<i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::PGK1p-Scer-are1</i> <i>F592L-CYC1t-LEU2</i> <i>TDH3p-tHMG1</i>	Целенаправленная замена с помощью кассеты с LEU2
Y2159	<i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::PGK1p-Scer-are1</i> <i>G595D-CYC1t-LEU2</i> <i>TDH3p-tHMG1</i>	Целенаправленная замена с помощью кассеты с LEU2

Таблица 2. Плазмиды, используемые для конструирования мутаций ARE. “Scer” означает *Saccharomyces cerevisiae*.

Плазмида	Основа	Вставка	Олиго или источник	SEQ ID NO:
pHyD459	pHyD445	<i>Scer-ARE1</i>	вставка LEU2	
pMB7584	pHyD459	<i>Scer-are1 F592L</i>	MO10013 и MO10014, MO10016 и MO10017	16 и 17 19 и 20
pMB7585	pHyD459	<i>Scer-are1 G595D</i>	MO10013 & MO10015	16 и 18

Пример 2. Конструирование плазмиды pHyD459 с ARE1-WT

ARE1 дикого типа (WT) *S. cerevisiae* синтезировали с помощью DNA2.0, включая сайт XbaI на 5'-конце (TCTAGAACAAG...), и сайт PstI на 3'-конце. Её клонировали в плазмиду с делецией *erg4Δ::Hyg^R* по уникальным сайтам XbaI и PstI. После этого использовали LEU2 для замены фрагмента HygR путем клонирования по KpnI-AgeI.

Пример 3. Клонирование мутантных генов ARE1

Мутантный вариант pMB7584 (F592L) ARE1 *S. cerevisiae* путем лигирования расщепленного BsrGI-BsaI продукта ПЦР, полученного из ARE1 (праймеры по SEQ ID NO: 16 и 17), с двухцепочечным олигонуклеотидом, полученным при гибридизации SEQ ID NO: 19 и 20 с расщепленной BsrGI-PstI плазмидой pHyD459. Аналогичным образом получали мутантный вариант pMB7585 (G595D) ARE1 *S. cerevisiae* путем лигирования расщепленного BsrGI-BsaI продукта ПЦР, полученного из ARE1 (праймеры по SEQ ID NO: 16 и 18), с двухцепочечным олигонуклеотидом, полученным при гибридизации SEQ ID NO: 21 и 22 с расщепленной BsrGI-PstI плазмидой pHyD459. Праймеры, а также другие используемые здесь последовательности приведены в перечне последовательностей.

Пример 4. Введение ARE1 WT и мутантных генов в *Saccharomyces cerevisiae*

Для проверки влияния мутантных генов ARE1 на продукцию 7-DHC в сравнении с геном WT, трансформировали штамм Y2140 тремя различными конструкциями:

1) SallI-фрагмент плазмиды pHyD459, который представляет собой конструкцию с поврежденным *erg4*, несущую ген ARE1 WT под контролем промотора PGK1, а также LEU2;

2) SallI-фрагмент плазмиды pMB7584, который представляет собой конструкцию с поврежденным *erg4*, несущую ген ARE1 F592L под контролем промотора PGK1, а также LEU2;

3) SallI-фрагмент плазмиды pMB7585, который представляет собой конструкцию с поврежденным *erg4*, несущую ген ARE1 G595D под контролем промотора PGK1, а также LEU2.

Отбирали трансформантов на минимальной среде при 30°C и проверяли их на чувствительность к гигромицину. Штаммы, полученные из этих трансформантов, приведены выше в таблице 1. Эти штаммы впоследствии анализировали на продуктивность по 7-DHC и общую чистоту стерола 7-DHC, как описано ниже в Примере 5.

Пример 5. Анализ стеролов в мутантных штаммах ARE по HPLC

Исследуемые штаммы сначала высевали на агар с YPD и инкубировали в течение 48 часов при 30°C. Из этих чашек инокулировали предварительные культуры в 2 мл YPD и инкубировали на круговой качалке в течение 24 часов при 30°C. Из предварительных культур вносили в 24-луночный планшет 0,8 мл YPD + 10 г/л этанола до конечного значения $OD_{600} = 0,5$. Планшеты инкубировали при 30°C в увлажненной атмосфере со встряхиванием при 800 об/мин на качалке с размахом 3 мм. Через 24 и 48 часов после инокуляции в каждую лунку добавляли 16 мкл этанола в качестве подпитки. Через 72 часа после инокуляции отбирали образцы клеток на содержание стеролов.

Для экстракции стеролов из культур вносили пипеткой 80 мкл цельного бульона в пробирки Precellys на 2 мл со стеклянными шариками. Добавляли 800 мкл омыляющего раствора (5% КОН в этаноле), помещали образцы в гомогенизатор Precellys 24 и перемешивали при 6500 об/мин за 3 цикла по 15 сек на цикл. Затем добавляли 60 мкл ледяной уксусной кислоты и центрифугировали пробирки в течение 1 мин при максимальной скорости. Супернатанты анализировали методом HPLC на содержание стеролов (см. таблицу 3).

Таблица 3. Соотношения между 7-DHC и выбранными промежуточными стеролами в контрольных и мутантных штаммах ARE1 и/или ARE2. “Лано-/лато” означает смесь ланостерола и латостерола, а “зим” означает зимостерол. Цифры отражают содержание стеролов в мг/мл.

Мутант	7-DHC	Лано/ лато	Холеста- 8-енол	Зим	Соотношение 7-DHC к зим	Соотношение 7-DHC к лано/лато
ARE1 wt	1060	70	99	92	12	15
Are2-F624L	1090	35	122	80	14	31
Are2-G627D	1141	50	140	82	14	23
Are1-F592L	1240	62	143	105	14	20
Are1-G595D	1448	104	152	77	19	14

В результате скрининга различных мутантов Are1 *S. cerevisiae* авторы изобретения обнаружили ряд вариантов Are1, которые при экспрессии продуцируют 7-DHC с большей общей продуктивностью, меньшим накоплением стероловых побочных продуктов (зимостерола, латостерола, ланостерола, холеста-8-енола и т.п.) или тем и другим.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный фермент, обладающий стерол-ацилтрансферазной активностью, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам, выбранным из 592 и/или 595 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замен, соответствующих F592L и/или G595D.

2. Модифицированный фермент по п. 1, катализирующий эстерификацию стеролов, содержащих 7-дегидрохолестерин (7-DHC) и зимостерол, причем соотношение 7-DHC к зимостеролу в сложных эфирах стеролов повышается по меньшей мере на 15% по сравнению с соотношением 7-DHC к зимостеролу при катализе с использованием соответствующего немодифицированного фермента.

3. Модифицированный фермент по п. 1 или 2, при этом аминокислотная замена выбрана из G595D.

4. Клетки хозяина, предпочтительно дрожжевые, более предпочтительно вырабатывающих стеролы дрожжей, еще более предпочтительно дрожжей, вырабатывающих холестерин, содержащие модифицированный фермент по любому из пп. 1-3.

5. Клетки хозяина по п. 4, которые применяются для получения смеси стеролов, содержащей 7-DHC и зимостерол, причем соотношение 7-DHC к зимостеролу повышается по меньшей мере на 15% по сравнению с клетками хозяина, экспрессирующими немодифицированный фермент.

6. Клетки хозяина по п. 4 или 5, в которых инактивированы ERG5 и ERG6.

7. Клетки хозяина по любому из пп. 4-6, при этом клетки экспрессируют гетерологичный фермент, выбранный из ЕС 1.3.1.72, обладающий активностью стерол- $\Delta 24$ -редуктазы, причем предпочтительно гетерологичный фермент происходит из растений или позвоночных, более предпочтительно из человека, свиньи, собаки, мыши, крысы, лошади или *Danio rerio*.

8. Клетки хозяина по любому из пп. 4-7, при этом клетки хозяина выбраны из группы, состоящей из *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* и *Yarrowia*, предпочтительно из *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* spp., *Pichia* spp., *Kluyveromyces* spp., *Hansenula* spp. или *Yarrowia lipolytica*.

9. Способ снижения содержания зимостерола в смеси стеролов, содержащей зимостерол и 7-DHC, включающий культивирование клеток хозяина по любому из пп. 4-8 в соответствующих условиях и необязательно выделение и/или очистку 7-DHC из смеси стеролов.

10. Способ повышения содержания 7-DHC в смеси стеролов, содержащей 7-DHC и

зимостерол, включающий культивирование клеток хозяина по любому из пп. 4-8 в соответствующих условиях и необязательно выделение и/или очистку 7-DHC из смеси стеролов.

11. Способ получения 7-DHC, включающий ферментативное превращение ацетил-СоА в смесь стеролов, содержащую зимостерол и 7-DHC, используя клетки хозяина по любому из пп. 4-8, причем содержание 7-DHC в смеси стеролов составляет по меньшей мере 70%.

12. Способ по п. 11, при этом 7-DHC дополнительно превращается в витамин D3.

13. Способ по п. 11 или 12, при этом 7-DHC дополнительно превращается в 25-гидроксивитамин D3.

14. Применение модифицированного фермента по любому из пп. 1-3 либо клеток хозяина по любому из пп. 4-8 в способе получения 7-DHC, причем 7-DHC выделяют из смеси стеролов, содержащей зимостерол и 7-DHC, а соотношение 7-DHC к зимостеролу повышается по меньшей мере на 15% по сравнению со способом с использованием соответствующего немодифицированного фермента и немодифицированных клеток хозяина, соответственно.