

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092804** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.03.11

(51) Int. Cl. *C12N 9/90* (2006.01)
C12P 33/00 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.21

(54) **ОПТИМИЗАЦИЯ С-8-ИЗОМЕРИЗАЦИИ СТЕРОЛОВ**

(31) 00626/18

(32) 2018.05.22

(33) CH

(86) PCT/EP2019/063080

(87) WO 2019/224190 2019.11.28

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

(72) Изобретатель:

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

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

(57) Настоящее изобретение касается усовершенствованного способа получения 7-дегидрохолестерина (7-DHC), важного промежуточного продукта при биотехнологическом получении витамина D3 или его производных/метаболитов. В изобретении представлены модифицированные дрожжевые штаммы, экспрессирующие ферменты с улучшенной активностью С-8-стеролизомеразы, что ведет к повышению доли 7-DHC в смеси стеролов.

A1

202092804

202092804

A1

ОПТИМИЗАЦИЯ C-8-ИЗОМЕРИЗАЦИИ СТЕРОЛОВ

Настоящее изобретение касается усовершенствованного способа получения 7-дегидрохолестерина (7-DHC), важного промежуточного продукта при биотехнологическом получении витамина D₃ или его производных/метаболитов. В изобретении представлены модифицированные штаммы клеток хозяина, экспрессирующих ферменты с улучшенной активностью C-8-стеролизомеразы, и их применение 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 NuD), который является основной циркулирующей формой витамина D₃. Дальнейшее гидроксирование 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-CoA 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.

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. Только 7-DHC может затем превращаться в витамин D3.

Таким образом, насущной 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 мы обнаружили, что продуктивность по 7-DHC в клетках хозяина, в частности, соотношение 7-DHC к холеста-8-енолу, можно сместить в сторону 7-DHC посредством модификации активности С-8-стеролизомеразы в клетках хозяина, т.е. экспрессии гетерологичных ферментов, обладающих активностью С-8-стеролизомеразы, что приведет к повышению продуктивности клеток хозяина в сторону 7-DHC как важного промежуточного продукта при получении витамина D3.

Итак, настоящее изобретение направлено на применение ферментов, обладающих активностью С-8-стеролизомеразы, в способе получения 7-DHC, причем такие полипептиды 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 и вплоть до 100% идентичны SEQ ID NO: 6, и экспрессируются (гетерологически) в подходящих клетках хозяина для получения 7-DHC, причем соотношение 7-DHC к побочным продуктам, включая холеста-8-енол, повышается по меньшей мере в 2 раза по сравнению с немодифицированными клетками хозяина.

Полипептид по SEQ ID NO: 6, проявляющий активность С-8-стеролизомеразы, который может кодироваться полинуклеотидом по SEQ ID NO: 2, был выделен из *Ustilago maydis*.

Термины “С-8-стеролизомераза”, “дельта-8,7-изомераза”, “фермент, обладающий активностью С-8-стеролизомеразы”, “изомераза” или “гомолог ERG2” 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. Определенные здесь ферменты являются гомологами ERG2 *Saccharomyces cerevisiae* (полипептидная последовательность происходит из UniProtKB – P32352) по SEQ ID NO: 5, которая может кодироваться полинуклеотидом по SEQ ID NO: 1.

Термины “превращение”, “ферментативное превращение” или “изомеризация” в связи с ферментативным катализом, например, холеста-8-енола в холеста-7-енол (латостерол) и/или зимостерола в холеста-7,24-диенол применяются здесь

взаимозаменяемо и относятся к действию С-8-стеролизомеразы, как определено здесь и известно в данной области.

Изомераза может применяться в выделенном виде (например, в бесклеточной системе) или может быть введенной и экспрессироваться в виде гетерологичного фермента или дополнительных копий эндогенных ферментов в подходящих клетках хозяина. Таким образом, подходящие клетки хозяина экспрессируют одну, две или несколько копий ферментов изомеразы, как определено здесь, что ведет к повышению выхода 7-DHC и/или улучшению доли 7-DHC по сравнению с холеста-8-енолом, причем такие клетки хозяина именуется здесь генетически модифицированными клетками хозяина. Генетически немодифицированными или немодифицированными клетками хозяина именуется здесь соответствующие клетки хозяина, несущие только эндогенную активность С-8-стеролизомеразы, экспрессируемой эндогенным геном ERG2.

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*.

Подходящие изомеразы, как определено здесь, могут быть получены из разных источников, таких, например, как растения, животные, включая людей, водоросли, грибы, включая дрожжи, или бактерии, предпочтительно из грибов, в особенности выбранных из группы, состоящей из *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Magneporte*, *Metarhizium* и *Ustilago*, более предпочтительно из *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *K. lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *P. pastoris*, *C. albicans*, *P. roqueforti*, *A. nidulans*, *C. neoformans*, *Magneporte oryzae*, *Metarhizium acridum* или *U. maydis*, наиболее предпочтительно из *U. maydis*.

В предпочтительном воплощении фермент, обладающий активностью С-8-стеролизомеразы, получают из *Ustilago*, в частности *Ustilago maydis*, например, типа белка, кодируемого полинуклеотидом по SEQ ID NO: 2, более предпочтительно таким белком является полипептид по SEQ ID NO:6 (полипептидная последовательность из

UniProtKB – P32360).

В другом воплощении фермент, обладающий активностью С-8-стеролизомеразы, получают из *Candida*, в частности *Candida albicans*, например, типа белка, кодируемого полинуклеотидом по SEQ ID NO: 3, более предпочтительно таким белком является полипептид по SEQ ID NO: 7 (полипептидная последовательность из UniProtKB – C4YFH6).

В следующем воплощении фермент, обладающий активностью С-8-стеролизомеразы, получают из *Schizosaccharomyces*, в частности *Schizosaccharomyces pombe*, например, типа белка, кодируемого полинуклеотидом по SEQ ID NO: 4, более предпочтительно таким белком является полипептид по SEQ ID NO: 8 (полипептидная последовательность из UniProtKB – P87113).

В другом воплощении фермент, обладающий активностью С-8-стеролизомеразы, получают из *Saccharomyces*, в частности *Saccharomyces cerevisiae*, например, типа белка, кодируемого полинуклеотидом по SEQ ID NO: 1, более предпочтительно таким белком является полипептид по SEQ ID NO: 5 (полипептидная последовательность из UniProtKB – P32352), причем такой фермент экспрессируется дополнительно и/или в качестве замены эндогенной ERG2 при использовании *S. cerevisiae* в качестве хозяина.

Дальнейшие воплощения включают способ получения 7-ДНС в подходящих клетках хозяина, например, в дрожжевых клетках, в особенности вырабатывающих холестерин дрожжевых клетках, причем гомолог ERG2 из *Y. lipolytica* (например, полипептидная последовательность из UniProtKB – Q6CEA6 или Q6C3U4), *K. lactis* (например, полипептидная последовательность из UniProtKB – Q6CL22), *P. pastoris* (например, полипептидная последовательность из UniProtKB – F2QZY6 или C4R749), *P. roqueforti* (например, полипептидная последовательность из UniProtKB – W6PX20), *A. nidulans* (например, полипептидная последовательность из UniProtKB – C8VT80), *S. neoformans* (например, полипептидная последовательность из UniProtKB – J9VMS8), *Magnaporthe oryzae* (например, полипептидная последовательность из UniProtKB – P33281) или *Metarhizium acridum* (например, полипептидная последовательность из UniProtKB – E9ENP6) экспрессируется в подходящих вырабатывающих холестерин дрожжевых клетках в подходящих условиях, как описано здесь.

Исходя из приведенных здесь последовательностей и из улучшения накопления 7-ДНС и/или снижения холеста-8-енола в смеси стеролов, т.е. получения по меньшей мере 80%, как-то 85, 90, 95, 98 или даже 100% 7-ДНС в смеси стеролов, можно легко вывести дополнительные подходящие гены, кодирующие полипептиды, обладающие активностью С-8-стеролизомеразы, как определено здесь, которые могут применяться для С-8-

изомеризации стеролов, как определено здесь, в частности, зимостерола и холеста-8-енола. Так, настоящее изобретение направлено на способ идентификации новых изомераз, в котором в качестве зонда в процессе скрининга новых С-8-стеролизомераз используется полипептид, который по меньшей мере на 43%, как-то, например, по меньшей мере на 47, 50, 56, 60, 70, 75, 80, 90, 92, 95, 98 и вплоть до 100% идентичен ERG2 *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 5), с предпочтением на продукцию 7-DHC перед холеста-8-енолом, получая по меньшей мере 80% 7-DHC в смеси стеролов, вырабатываемых подходящим штаммом хозяина. Для получения 7-DHC может использоваться любой полипептид, обладающий активностью С-8-стеролизомеразы и описанный здесь, если только изомеризация дает по меньшей мере 80% 7-DHC в смеси стеролов, исходя из общего количества вырабатываемых стеролов, и/или повышение соотношения 7-DHC к холеста-8-енолу.

Настоящее изобретение, в частности, направлено на применение таких новых ферментов-изомераз, в особенности гетерологичных ферментов, в способе получения 7-DHC, причем под действием таких изомераз, как определено здесь, содержание побочных продуктов в смеси стеролов, включая холеста-8-енол, зимостерол, латостерол и ланостерол, снижается до 20% и менее, как-то до 15, 10, 5, 3% и менее в пересчете на общее количество стеролов, при этом предпочтительно снижается содержание холеста-8-енола относительно содержания 7-DHC. Способ может выполняться с подходящими вырабатывающими холестерин дрожжевыми клетками, экспрессирующими такие гетерологичные изомеразы, при этом предпочтительно гены, кодирующие данные ферменты, экспрессируются гетерологически, т.е. вводятся в данные клетки хозяина. Далее 7-DHC может превращаться в витамин D3 под действием (известных) подходящих химических или биотехнологических механизмов.

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 ERG2, 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 С-8-изомеризацию стеролов, давая содержание 7-DHC не менее 80% (со снижением холеста-8-енола относительно 7-DHC) в смеси стеролов. Такие мутации также называют “молчащими мутациями”, так как они не изменяют (ферментативную) активность

ферментов, как описано здесь.

В зависимости от клеток хозяина полинуклеотиды, как определено здесь, участвующие в С-8-изомеризации стеролов, могут подвергаться оптимизации для экспрессии в соответствующих клетках хозяина. Специалистам известно, как получить такие модифицированные полинуклеотиды. Подразумевается, что полинуклеотиды, как определено здесь, охватывают и такие оптимизированные для хозяина молекулы нуклеиновых кислот, если только они экспрессируют полипептиды с соответствующей активностью, как определено здесь. Примеры таких оптимизированных для хозяина гомологов ERG2 представлены, например, в SEQ ID NO: 9, 10 и 11.

Так, в одном воплощении настоящее изобретение направлено на клетки хозяина, содержащие полинуклеотиды, кодирующие (гетерологичные) гомологи ERG2, как определено здесь, которые оптимизированы для экспрессии в данных клетках хозяина, не оказывая влияния на рост или профиль экспрессии клеток хозяина или ферментов. В частности, дрожжи, например, дрожжевые клетки, вырабатывающие холестерин, выбирают из *Saccharomyces*, как-то, например, *Saccharomyces cerevisiae*, причем одну, две или несколько копий полинуклеотидов, кодирующих ферменты ERG2, как определено здесь, выбирают из полинуклеотидов, по меньшей мере на 52%, как-то, например, на 54, 60, 70, 80, 85, 90, 92, 97 и вплоть до 100% идентичных SEQ ID NO: 9, включая полинуклеотиды, кодирующие полипептиды по SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8.

Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению могут содержать только часть или фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, предусмотренной настоящим изобретением, такой, например, как последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 9, 10 или 11, к примеру, фрагмент, который можно использовать в качестве зонда или праймера либо фрагмент, кодирующий часть гомолога ERG2, как определено здесь. Зонд/праймер обычно содержит практически очищенные олигонуклеотиды, которые обычно содержат участок нуклеотидной последовательности, который гибридизуется, предпочтительно в очень строгих условиях, по меньшей мере примерно с 12 или 15, предпочтительно примерно с 18 или 20, более предпочтительно примерно с 22 или 25, еще более предпочтительно примерно с 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 или 75 и более последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности по SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 9, 10 или 11 либо их фрагментов или производных.

Предпочтительным неограничительным примером таких условий гибридизации является гибридизация в 6-кратном хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при 45°C с последующей одной или несколькими промывками в 1-кратном SSC с 0,1% SDS при 50°C, предпочтительно при 55°C, более предпочтительно при 60°C и еще более

предпочтительно при 65°C.

Очень строгие условия включают, к примеру, инкубацию от 2 ч до 4 дней при 42°C с использованием ДНК-зонда, меченного дигоксигенином (DIG) (полученного с использованием системы мечения DIG; Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Германия), в растворе типа DigEasyHyb (Roche Diagnostics GmbH) со 100 мкг/мл ДНК спермы лосося или без неё, либо в растворе, содержащем 50% формамида, 5×SSC (150 mM NaCl, 15 mM тринатрийцитрат), 0,02% додецилсульфата натрия, 0,1% N-лауроилсаркозина и 2% блокирующего реагента (Roche Diagnostics GmbH), с последующей промывкой фильтров дважды от 5 до 15 мин в 2×SSC и 0,1% SDS при комнатной температуре, а затем промывкой дважды от 15 до 30 мин в 0,5×SSC и 0,1% SDS или 0,1×SSC и 0,1% SDS при 65-68°C.

Настоящее изобретение, в частности, направлено на применение гетерологичных ферментов, обладающих активностью С-8-стеролизомеразы, как определено здесь, в способе получения 7-ДНС, промежуточного соединения для витамина D₃. Предпочтительно модифицированные ферменты по настоящему изобретению вводятся и/или экспрессируются в подходящих клетках хозяина типа дрожжевых, в частности, в дрожжевых клетках, вырабатывающих холестерин, как-то выбранных из *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* spp., *Pichia* spp., *Kluyveromyces* spp., *Hansenula* spp. или *Yarrowia lipolytica*, предпочтительно *S. cerevisiae*. Модифицированный хозяин используется для получения 7-ДНС, который далее может быть преобразован в витамин D₃ и/или 25-гидроксивитамин D₃.

Подходящие клетки хозяина могут подвергаться дополнительной модификации для дальнейшего повышения продукции 7-ДНС, важного промежуточного продукта при биосинтезе витамина D₃, и/или для снижения накопления побочных продуктов.

Так, в одном воплощении изобретение направлено на штаммы дрожжей с модифицированной активностью С-8, в которых также инактивированы ERG5 и ERG6. Дрожжевые клетки могут подвергаться дополнительной модификации посредством экспрессии гетерологичного фермента, обладающего активностью С24-редуктазы, в особенности из числа ЕС 1.3.1.72, типа гетерологичной С24-редуктазы, действующей на холеста-7,24-диенол, зимостерол или триенол (например, холеста-5,7,25-триенол), предпочтительно растительной или стерол-Δ24-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-Δ24-редуктаза выбрана из *Danio rerio*, крысы или человека.

Последовательности, экспрессирующие данные ферменты стерол- $\Delta 24$ -редуктазы, являются общедоступными, включая, без ограничения, ссылки Q15392, Q60HC5, Q8VCH6, Q5BQE6, Q39085 или P93472 из UniProtKB/Swiss-Prot (например, см. WO 2003/064650).

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-стеролдесатураза (ERG3), 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 ERG3, причем ERG3 предпочтительно выбрана из *Pichia pastoris* (последовательность из UniProtKB – C4QY87) или *Schizosaccharomyces pombe* (последовательность из UniProtKB – O94457).

В следующем воплощении клетки хозяина по настоящему изобретению могут подвергаться дополнительной модификации по активности стерол-ацилтрансферазы, в частности, по активности изоформы стерол-ацилтрансферазы Are1p и/или Are2p, в особенности Are1p, содержащей одну или несколько аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам, выбранным из 592 и/или 595 в полипептиде по SEQ ID NO: 12.

В одном конкретном воплощении изобретение касается способа улучшения клеток хозяина в отношении продукции 7-DHC, причем клетки хозяина модифицированы, как определено здесь, т.е. экспрессируется гомолог ERG2, как определено здесь, например, путем введения одной, двух или нескольких копий ферментов изомеразы, как определено здесь, в частности, в дрожжевые клетки, вырабатывающие холестерин, предпочтительно в такие дрожжевые клетки, у которых инактивированы ERG5 и ERG6, и при этом необязательно экспрессируется гетерологичный фермент, обладающий активностью C-24-редуктазы, как определено здесь, и/или модифицированы ARE1 и/или ARE1, как описано здесь, и/или необязательно экспрессируются гомологи ERG3, причем клетки хозяина улучшаются таким образом, что доля 7-DHC в общем количестве стеролов, вырабатываемых данными клетками хозяина, повышается по меньшей мере до 80%, в частности, при этом соотношение 7-DHC к побочным продуктам, включая холеста-8-енол, повышается по меньшей мере в 1,1 раза по сравнению с немодифицированным штаммом дрожжей, как определено здесь, т.е. экспрессирующим только фермент ERG2 дикого типа (эндогенный).

В одном конкретном воплощении изобретение касается способа улучшения дрожжевых клеток в отношении продукции 7-DHC, в частности, дрожжевых клеток, вырабатывающих холестерин, типа дрожжевых клеток, у которых инактивированы ERG5 и ERG6 и необязательно экспрессируется гетерологичный фермент, обладающий активностью С-24-редуктазы, как определено здесь, причем данные дрожжевые клетки экспрессируют гомолог ERG2, как определено здесь, например, посредством введения одной, двух или нескольких копий фермента десатуразы, как определено здесь, причем дрожжевые клетки улучшаются таким образом, что доля 7-DHC в общем количестве стеролов, вырабатываемых данными клетками, повышается по меньшей мере до 80%, как-то, например, до 85, 90, 92, 95, 97 и даже 100%, а содержание побочных продуктов в смеси стеролов, включая холеста-7-енол, латостерол и/или холеста-8-енол и/или зимостерол, снижается до 20% и менее от общего количества стеролов, т.е. уменьшение холеста-7-енола, латостерола и/или холеста-8-енола и/или зимостерола составляет по меньшей мере 20% от общего количества стеролов по сравнению с немодифицированным штаммом дрожжей, экспрессирующим только фермент ERG2 дикого типа (эндогенный).

В одном аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения смеси стеролов, содержащей 7-DHC и холеста-8-енол, в дрожжевых клетках, вырабатывающих холестерин, причем соотношение 7-DHC к холеста-8-енолу в смеси стеролов повышается по меньшей мере в 2,4 раза, как-то, например, в 2,5, 2,8, 4, 4,5, 5 раз, а данные вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки экспрессируют гетерологичную изомеразу, как определено здесь, т.е. 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 и вплоть до 100% идентичен SEQ ID NO: 2, который более предпочтительно экспрессируется соответствующими оптимизированными по кодонам полинуклеотидами, как определено здесь, а предпочтительно происходит из *Ustilago maydis*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe* или *Saccharomyces cerevisiae*, более предпочтительно из *Ustilago maydis* или *Saccharomyces cerevisiae*.

В одном аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения смеси стеролов, содержащей 7-DHC и смесь холеста-7-енола (латостерола) и/или ланостерола, в дрожжевых клетках, вырабатывающих холестерин, причем соотношение 7-DHC к лано/латостеролу в смеси стеролов повышается по меньшей мере в 1,1 раза, как-то по меньшей мере в 1,3 раза, а данные вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки экспрессируют (гетерологичную) изомеразу, как определено здесь, т.е. 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 и вплоть до 100% идентичен SEQ ID NO: 6, который более предпочтительно

экспрессируется соответствующими оптимизированными по кодомам полинуклеотидами, как определено здесь, а предпочтительно происходит из *Ustilago maydis* или *Schizosaccharomyces pombe*, предпочтительно из *Ustilago maydis*.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения смеси стеролов, содержащей 7-DHC и зимостерол, в дрожжевых клетках, вырабатывающих холестерин, причем соотношение 7-DHC к зимостеролу в смеси стеролов повышается по меньшей мере в 1,2 раза, а данные вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки экспрессируют (гетерологичную) изомеразу, как определено здесь, т.е. 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 и вплоть до 100% идентичен SEQ ID NO: 6, который более предпочтительно экспрессируется соответствующими оптимизированными по кодомам полинуклеотидами, как определено здесь, а предпочтительно происходит из *Ustilago maydis*.

В одном конкретном воплощении настоящее изобретение направлено на способ получения смеси стеролов, содержащей 7-DHC, зимостерол, холеста-8-енол, лано- или латостерин, в дрожжевых клетках, вырабатывающих холестерин, причем содержание 7-DHC повышается по меньшей мере на 5, 8, 10, 20, 30% от общего количества стеролов по сравнению с зимостеролом, холеста-8-енолом и лано- или латостеролом, а данные вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки экспрессируют гетерологичную изомеразу, как определено здесь, т.е. 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 и вплоть до 100% идентичен SEQ ID NO: 6, который более предпочтительно экспрессируется соответствующими оптимизированными по кодомам полинуклеотидами, как определено здесь, а предпочтительно происходит из *Ustilago maydis*.

В настоящем изобретении повышение содержания 7-DHC в смеси стеролов определяется как количество 7-DHC, вырабатываемое клетками хозяина, экспрессирующими гетерологичный полипептид, обладающий изомеразной активностью, как определено здесь, по сравнению с клетками хозяина, экспрессирующими только эндогенную С-8-стеролизомеразу, такую, например, как ERG2. При использовании таких клеток хозяина, например, дрожжевых, в частности, дрожжевых клеток, вырабатывающих холестерин, в способе получения стеролов содержание 7-DHC может повышаться до 80% и более, как-то до 85, 90, 92, 95, 97 и вплоть до 100% от общего количества стеролов, и вплоть до 4,5 раз по сравнению с содержанием холеста-8-енола в общем количестве стеролов, вырабатываемых данными клетками хозяина. В настоящем изобретении “экспрессия гомолога ERG2” включает экспрессию дополнительных копий эндогенных

полипептидов ERG2, то есть экспрессию двух или нескольких копий ERG2.

В одном конкретном воплощении настоящее изобретение направлено на способ получения смеси стеролов, в котором применяются дрожжевые клетки, как описано ранее, причем содержание холеста-8-енола и/или зимостерола и/или ланостерола и/или латостерола в данной смеси стеролов снижается, т.е. составляет 2, 4, 5, 8, 10, 15, 20% и менее от общего количества стеролов, что ведет к повышению доли 7-DHC в смеси стеролов.

Модифицированные клетки хозяина, которые способны экспрессировать гомологи ERG2, как определено здесь, а также гены, необходимые для биосинтеза предшественников и/или промежуточных соединений витамина D3, 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.

При использовании клеток хозяина, как описано здесь, можно смещать продуктивность/специфичность активности С-8-стеролизомеразы в сторону 7-DHC, получая содержание 7-DHC в общем объеме стеролов, вырабатываемых данными клетками хозяина, по меньшей мере 80%, с титрами 7-DHC вплоть до 12-15 г/л после ферментации около 100 ч в подходящих условиях культивирования.

Термины “ERG5” и “Erg5p” или “ERG6” и “Erg6p” применяются здесь взаимозаменяемо и обозначают полипептиды, кодируемые соответствующими генами *erg3*, *erg5* и *erg6*.

Гены, кодирующие ERG5, ERG6, ERG2, ERG3, ARE1, ARE2 или стерол-Δ24-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 “Δ24-редуктаза” применяются здесь взаимозаменяемо. У дрожжей этот фермент кодируется *erg4* и

действует на метильную группу у атома углерода в положении 24. Поэтому триенолы, которые не содержат такой метильной группы в данном положении, не являются приемлемым субстратом для дрожжевой ERG4.

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 и вплоть до 100% идентичен SEQ ID NO: 14 и проявляет активность С-5-стеролдесатуразы, которая может кодироваться полинуклеотидом по SEQ ID NO: 15, полученным 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.

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, как-то, 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. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как определено здесь,

содержащие фермент, обладающий активностью С8-стеролизомеразы, причем данные дрожжевые клетки вырабатывают смесь стеролов, содержащую по меньшей мере 80% 7-дегидрохолестерина (7-DHC), предпочтительно содержащую по меньшей мере 82, 85, 88, 90, 92, 95, 97, 98 и вплоть до 100% 7-DHC от общего количества стеролов.

2. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как определено здесь и по п. 1, при этом соотношение 7-DHC к холеста-8-енолу составляет около 20.

3. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как определено здесь и по п. 1, при этом соотношение 7-DHC к холеста-8-енолу повышается по меньшей мере в 2 раза.

4. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как определено здесь и по п. 1, 2 или 3, экспрессирующие гетерологичный фермент, обладающий активностью С8-стеролизомеразы, который по меньшей мере на 42%, как-то, например, по меньшей мере на 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 75, 80, 90, 92, 95, 98 и вплоть до 100% идентичен полипептиду по SEQ ID NO: 6.

5. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как определено здесь и по п. 4, экспрессирующие гетерологичный фермент, обладающий активностью С8-стеролизомеразы, причем данный фермент выбран из группы, состоящей из *Saccharomyces* типа *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia* типа *Y. lipolytica*, *Kluyveromyces* типа *K. lactis*, *Schizosaccharomyces* типа *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia* типа *P. pastoris*, *Candida* типа *C. albicans*, *Penicillium* типа *P. roqueforti*, *Aspergillus* типа *A. nidulans*, *Cryptococcus* типа *C. neoformans*, *Magnaporthe* типа *Magnaporthe oryzae*, *Metarhizium* типа *Metarhizium acridum* и *Ustilago* типа *Ustilago maydis*.

6. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как определено здесь и по п. 1, 2, 3, 4 или 5, в которых инактивированы ERG5 и ERG6.

7. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как определено здесь и по п. 1, 2, 3, 4, 5 или 6, при этом дрожжевые клетки экспрессируют гетерологичный фермент из числа ЕС 1.3.1.72, обладающий активностью Δ 24-стеролредуктазы, причем предпочтительно гетерологичный фермент происходит из растения или позвоночного, более предпочтительно из человека, свиньи, собаки, мыши, крысы, лошади или *Danio rerio*.

8. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как определено здесь и по п. 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7, при этом дрожжевые клетки экспрессируют гетерологичный фермент, обладающий активностью С5-десатуразы, причем предпочтительно гетерологичный фермент происходит из *Pichia pastoris*, более предпочтительно из полипептида, который по меньшей мере на 45%, как-то, например, по меньшей мере на 50, 52, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 и вплоть до 100% идентичен SEQ ID NO: 14.

9. Применение вырабатывающих холестерин дрожжевых клеток, как определено здесь и по п. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, для получения стеролов, предпочтительно для получения предшественников витамина D₃, более предпочтительно для получения 7-DHC.

10. Применение вырабатывающих холестерин дрожжевых клеток, как определено здесь и по п. 9, при этом 7-DHC дополнительно превращается в витамин D₃.

11. Применение, как определено здесь и по п. 9 или 10, при этом 7-DHC дополнительно превращается в 25-гидроксивитамин D₃.

12. Способ снижения количества холеста-8-енола в смеси стеролов, вырабатываемых дрожжевыми клетками, который включает экспрессирование гетерологичного фермента, обладающего активностью C8-стеролизомеразы, причем данный фермент выбран из группы, состоящей из *Saccharomyces* типа *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia* типа *Y. lipolytica*, *Kluyveromyces* типа *K. lactis*, *Schizosaccharomyces* типа *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia* типа *P. pastoris*, *Candida* типа *C. albicans*, *Penicillium* типа *P. roqueforti*, *Aspergillus* типа *A. nidulans*, *Cryptococcus* типа *C. neoformans*, *Magnaporthe* типа *Magnaporthe oryzae*, *Metarhizium* типа *Metarhizium acridum* и *Ustilago* типа *Ustilago maydis*, предпочтительно из *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* или *Saccharomyces cerevisiae*.

13. Способ получения смеси стеролов, предпочтительно предшественников витамина D₃, более предпочтительно смеси стеролов, содержащей по меньшей мере 80% 7-DHC, в дрожжевых клетках, включающий:

(a) инактивацию *ERG5* и *ERG6*,

(b) экспрессирование гетерологичного фермента из числа EC 1.3.1.72, обладающего активностью стерол- Δ 24-редуктазы в отношении холеста-7,24-диенола, зимостерола или триенола, предпочтительно растительной или стерол- Δ 24-редуктазы позвоночных, более предпочтительно стерол- Δ 24-редуктазы позвоночных,

(c) экспрессирование гетерологичного фермента, обладающего активностью C8-стеролизомеразы, причем данный фермент выбран из группы, состоящей из *Saccharomyces* типа *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia* типа *Y. lipolytica*, *Kluyveromyces* типа *K. lactis*, *Schizosaccharomyces* типа *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia* типа *P. pastoris*, *Candida* типа *C. albicans*, *Penicillium* типа *P. roqueforti*, *Aspergillus* типа *A. nidulans*, *Cryptococcus* типа *C. neoformans*, *Magnaporthe* типа *Magnaporthe oryzae*, *Metarhizium* типа *Metarhizium acridum* и *Ustilago* типа *Ustilago maydis*, предпочтительно из *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* или *Saccharomyces cerevisiae*,

(d) культивирование данных дрожжевых клеток в условиях, подходящих для

получения стеролов, причем соотношение 7-DHC к холеста-8-енулу в смеси стеролов составляет более 8,7.

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 приведены в таблице 1 и 2. Вырабатывающий 7-DHC штамм Y2159 *Saccharomyces cerevisiae* конструировали, как описано в Примере 4. Все перечисленные штаммы являются штаммами MAT α .

Таблица 1. Штаммы *Saccharomyces cerevisiae*

Y2159	<i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1</i>	см. пример 4
	<i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1</i> <i>INT59::HSP26p-S. cerevisiae-ERG2-TDH3t-NAT^R</i>	целенаправленная вставка конструкции в locus INT59
	<i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1 INT59::HSP26p-U. maydis-ERG2-TDH3t-NAT^R</i>	целенаправленная вставка конструкции в locus INT59
	<i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1 INT59::HSP26p-C. albicans-ERG2-TDH3t-NAT^R</i>	целенаправленная вставка конструкции в locus INT59
	<i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1 INT59::HSP26p-S. pombe-ERG2-TDH3t-NAT^R</i>	целенаправленная вставка конструкции в locus INT59

Таблица 2. Плазмиды, используемые для клонирования гомологов ERG2

Плаزمида	Остов	Вставка	Олиго или источник
pMB7677	pMB7621	<i>ERG2 S. cerevisiae</i>	синтезированный фрагмент
pMB7732	pMB7621	<i>ERG2 U. maydis</i>	синтезированный фрагмент
pMB7683	pMB7621	<i>ERG2 C. albicans</i>	синтезированный фрагмент
pMB7681	pMB7621	<i>ERG2 S. pombe</i>	синтезированный фрагмент

Пример 2. Клонирование различных гомологов ERG2 в *S. cerevisiae* Y2159

Все кассеты ERG2 конструировали следующим образом. Открытые рамки считывания оптимизировали по кодонам на основе выведенной аминокислотной последовательности и синтезировали с 5'-сайтом XbaI (TCTAGAACAAAatg ...) и 3'-

сайтом PstI. Их клонировали путем вставки фрагментов ERG2, расщепленных XbaI-PstI, в расщепленную XbaI-PstI плазмиду pMB7621, что позволяет встраиваться в межгенный локус INT59 на хромосоме XI между генами SRP40 и PTR2 (примерно в положении 615000).

Помимо ERG2 *S. cerevisiae* (SEQ ID NO: 1; плазида pMB7677), синтезированные гены включают гомологи ERG2 (оптимизированные по кодонам) из *Ustilago maydis* (SEQ ID NO: 9; плазида pMB7732), *Candida albicans* (SEQ ID NO: 10; плазида pMB7683) и *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 11; плазида pMB7681), см. перечень последовательностей.

Для проверки влияния различных генов ERG2 на продукцию 7-DHC штамм Y2159 трансформировали четырьмя различными расщепленными SfiI фрагментами, представляющими один из четырех видов, описанных выше, в локусе INT59, используя устойчивость к нурсеотрицину (NatR) в качестве отборочного маркера и сильный конститутивный промотор HSP26 в качестве контролирующего элемента.

Отбирали трансформанты на YPD-агаре с 200 мг/л нурсеотрицина через 3 дня при 30°C. 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.

Пример 3. Анализ стеролов в трансформированных штаммах по HPLC

Штаммы культивировали следующим образом. Исследуемые штаммы сначала высевали на агар с YPD и инкубировали 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.

Из культур экстрагировали стеролы и анализировали следующим образом. 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. Результаты представлены в таблице 3, 4 и 5.

Таблица 3. Соотношение 7-DHC к зимостеролу в контроле и в штаммах, несущих гомологи ERG2

Штамм	Соотношение 7-DHC к зимостеролу
SC2159 – исходный	22,9
<i>U. maydis</i> ERG2	28,4

Таблица 4. Соотношение 7-DHC к холеста-8-енолу в контроле и в штаммах, несущих гомологи ERG2

Штамм	Соотношение 7-DHC к холеста-8-енолу
SC2159 – исходный	8,7
<i>U. maydis</i> ERG2	38,1
<i>C. albicans</i> ERG2	21,9
<i>S. pombe</i> ERG2	21,0
<i>S. cerevisiae</i> ERG2	24,4

Таблица 5. Соотношение 7-DHC к смеси ланостерола и латостерола в контроле и в штаммах, несущих гомологи ERG2

Штамм	Соотношение 7-DHC к ланостеролу/латостеролу
SC2159 – исходный	12,9
<i>U. maydis</i> ERG2	17,1
<i>S. pombe</i> ERG2	13,6

Пример 4. Конструирование Y2159

ARE1 дикого типа (WT) *S. cerevisiae* синтезировали с помощью DNA2.0, включая сайт XbaI на 5'-конце (TCTAGAACA...Aatg...) 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. В результате получили плазмиду pHyD459.

Плазмиду pMB7584 с мутантным вариантом (F592L) ARE1 *S. cerevisiae* получали 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 pMB7585 с мутантным вариантом (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 таблице 5.

Таблица 5. Плазмиды, используемые для конструирования мутаций ARE. “Scer” означает *Saccharomyces cerevisiae*.

Плаزمида	Остов	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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, содержащие фермент, обладающий активностью С8-стеролизомеразы, причем данные дрожжевые клетки вырабатывают смесь стеролов, содержащую по меньшей мере 80% 7-дегидрохолестерина (7-DHC), предпочтительно содержащую по меньшей мере 82, 85, 88, 90, 92, 95, 97, 98 и вплоть до 100% 7-DHC от общего количества стеролов.

2. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки по п. 1, при этом соотношение 7-DHC к холеста-8-енолу составляет около 20.

3. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки по п. 1, при этом соотношение 7-DHC к холеста-8-енолу повышается по меньшей мере в 2 раза.

4. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки по любому из пп. 1-3, экспрессирующие гетерологичный фермент, обладающий активностью С8-стеролизомеразы, который по меньшей мере на 42%, как-то, например, по меньшей мере на 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 75, 80, 90, 92, 95, 98 и вплоть до 100% идентичен полипептиду по SEQ ID NO: 6.

5. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки по п. 4, экспрессирующие гетерологичный фермент, обладающий активностью С8-стеролизомеразы, причем данный фермент выбран из группы, состоящей из *Saccharomyces* типа *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia* типа *Y. lipolytica*, *Klyveromyces* типа *K. lactis*, *Schizosaccharomyces* типа *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia* типа *P. pastoris*, *Candida* типа *C. albicans*, *Penicillium* типа *P. roqueforti*, *Aspergillus* типа *A. nidulans*, *Cryptococcus* типа *C. neoformans*, *Magneporte* типа *Magneporte oryzae*, *Metarhizium* типа *Metarhizium acridum* и *Ustilago* типа *Ustilago maydis*.

6. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки по любому из пп. 1-5, в которых инактивированы ERG5 и ERG6.

7. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки по любому из пп. 1-6, при этом дрожжевые клетки экспрессируют гетерологичный фермент из числа ЕС 1.3.1.72, обладающий активностью $\Delta 24$ -стеролредуктазы, причем предпочтительно гетерологичный фермент происходит из растения или позвоночного, более предпочтительно из человека, свиньи, собаки, мыши, крысы, лошади или *Danio rerio*.

8. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки по любому из пп. 1-7, при этом дрожжевые клетки экспрессируют гетерологичный фермент, обладающий активностью С5-десатуразы, причем предпочтительно гетерологичный фермент происходит из *Pichia pastoris*, более предпочтительно из полипептида, который по меньшей мере на 45%, как-то, например, по меньшей мере на 50, 52, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 и вплоть до 100%

идентичен SEQ ID NO: 14.

9. Применение вырабатывающих холестерин дрожжевых клеток по любому из пп. 1-8 для получения стеролов, предпочтительно для получения предшественников витамина D₃, более предпочтительно для получения 7-DHC.

10. Применение вырабатывающих холестерин дрожжевых клеток по п. 9, при этом 7-DHC дополнительно превращается в витамин D₃.

11. Применение по п. 9 или 10, при этом 7-DHC дополнительно превращается в 25-гидроксивитамин D₃.

12. Способ снижения количества холеста-8-енола в смеси стеролов, вырабатываемых дрожжевыми клетками, который включает экспрессирование гетерологичного фермента, обладающего активностью C8-стеролизомеразы, причем данный фермент выбран из группы, состоящей из *Saccharomyces* типа *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia* типа *Y. lipolytica*, *Klyveromyces* типа *K. lactis*, *Schizosaccharomyces* типа *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia* типа *P. pastoris*, *Candida* типа *C. albicans*, *Penicillium* типа *P. roqueforti*, *Aspergillus* типа *A. nidulans*, *Cryptococcus* типа *C. neoformans*, *Magneporte* типа *Magneporte oryzae*, *Metarhizium* типа *Metarhizium acridum* и *Ustilago* типа *Ustilago maydis*, предпочтительно из *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* или *Saccharomyces cerevisiae*.

13. Способ получения смеси стеролов, предпочтительно предшественников витамина D₃, более предпочтительно смеси стеролов, содержащей по меньшей мере 80% 7-DHC, в дрожжевых клетках, включающий:

(a) инактивацию *ERG5* и *ERG6*,

(b) экспрессирование гетерологичного фермента из числа EC 1.3.1.72, обладающего активностью стерол- Δ 24-редуктазы в отношении холеста-7,24-диенола, зимостерола или триенола, предпочтительно растительной или стерол- Δ 24-редуктазы позвоночных, более предпочтительно стерол- Δ 24-редуктазы позвоночных,

(c) экспрессирование гетерологичного фермента, обладающего активностью C8-стеролизомеразы, причем данный фермент выбран из группы, состоящей из *Saccharomyces* типа *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia* типа *Y. lipolytica*, *Klyveromyces* типа *K. lactis*, *Schizosaccharomyces* типа *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia* типа *P. pastoris*, *Candida* типа *C. albicans*, *Penicillium* типа *P. roqueforti*, *Aspergillus* типа *A. nidulans*, *Cryptococcus* типа *C. neoformans*, *Magneporte* типа *Magneporte oryzae*, *Metarhizium* типа *Metarhizium acridum* и *Ustilago* типа *Ustilago maydis*, предпочтительно из *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* или *Saccharomyces cerevisiae*,

(d) культивирование данных дрожжевых клеток в условиях, подходящих для

получения стеролов, причем соотношение 7-DHC к холеста-8-енулу в смеси стеролов составляет более 8,7.