

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290322 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.05

(51) Int. Cl. C12N 9/02 (2006.01)
C07C 403/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.07.15

(54) НОВЫЕ БЕТА-КАРОТИНОКСИДАЗЫ

(31) 62/874,765; 19205961.6

(32) 2019.07.16; 2019.10.29

(33) US; EP

(86) PCT/EP2020/069933

(87) WO 2021/009194 2021.01.21

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

(72) Изобретатель:
Хьюстон Питер Луис, Де Йонг Рене
Марсель (CH)

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

(57) Изобретение относится к способу увеличения транс-специфичности бета-каротиноксидазы (BCO), в частности BCO насекомых, для применения при получении витамина А-альдегида (ретинала) путем превращения бета-каротина, при котором по меньшей мере около 75-100% ретинала представлено его транс-изомером.

A1

202290322

202290322

A1

НОВЫЕ БЕТА-КАРОТИНОКСИДАЗЫ

Данное изобретение относится к способу повышения трансспецифичности бета-каротиноксидазы (BCO, от англ. beta-carotene oxidase), в частности, BCO насекомых, для применения при получении витамина А-альдегида (ретиная) путем конверсии бета-каротина; при этом по меньшей мере около 78-100% образующегося ретиналя представлено транс-изомером.

Ретиналь (ретиноальдегид) – важный промежуточный продукт/предшественник в процессе получения ретиноидов, в частности, витамина А. Ретиноиды, в том числе витамин А, являются необходимым и незаменимым фактором питания для человека; эти соединения должны поступать в человеческий организм с пищей. Ретиноиды нужны для поддержания здоровья в целом, в числе прочего для нормального зрения, иммунной защиты и роста.

Современные химические методы получения ретиноидов, включая витамин А и его предшественники, имеют ряд недостатков, например, они весьма энергоемки, требуют сложной очистки нужного продукта и/или сопровождаются образованием нежелательных побочных продуктов. В последние десятилетия изучаются другие подходы к получению ретиноидов, включая витамин А и его предшественники, в том числе использование микроорганизмов для определенных химических превращений, что обещает более экономичное и экологически безопасное производство этих важных соединений.

В целом, биологические системы, продуцирующие ретиноиды, весьма сложно использовать в промышленном производстве и/или нужный продукт образуется со столь низким выходом, что его выделение в больших масштабах экономически не выгодно. Тому имеется несколько причин, например, нестабильность ретиноидов в таких биологических системах или относительно высокий уровень побочных продуктов. Нестабильность витамина А можно обойти, если получать его ацетилированные формы, например, ацетат витамина А, или ретинилацетат. Ретиноиды обладают хиральностью и потому представлены различными стереоизомерами – цис и транс. Для промышленного производства витамина А важно получать трансформы, то есть *транс*-ретинилацетат.

Первым этапом биологического процесса получения преимущественно трансформы витамина А/ацетата витамина А из бета-каротина является реакция, катализируемая BCO, в результате которой из одной молекулы бета-каротина образуется две молекулы ретиналя. Из ферментов, осуществляющих эту реакцию, особый интерес представляют BCO насекомых в силу их высокой ферментативной активности: под действием BCO насекомых бета-каротин почти полностью (до 95%) превращается в

ретиаль. Однако эти ферменты не вполне транспецифичны, так что образуется не только *транс*-ретиаль, но и *цис*-форма, из которой уже не может образоваться ацетат *транс*-ретинола (ацетат витамина А). Поэтому углерод исходного соединения не полностью переходит в нужный продукт – *транс*-ретирилацетат.

Таким образом, актуальна задача повышения продуктивности и/или селективности или специфичности ферментативного превращения бета-каротина в витамин А, включая первый ферментативный этап, а именно ферментативное превращение бета-каротина в *транс*-ретиаль. В частности, желательно добиться оптимальных свойств высоко активного фермента насекомых, то есть увеличить его *транс*-специфичность, чтобы получался в основном *транс*-ретиаль, который далее превращается в *транс*-ретирилацетат.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что модификация определенных аминокислотных остатков в бета-каротиноксидазах, в частности, в ВСО насекомых, активность которых приводит к образованию как *транс*-, так и *цис*-ретиаля, может способствовать образованию именно *транс*-ретиаля, то есть повышает стереоселективность фермента, но при этом продуктивность реакции, катализируемой ВСО, существенно не снижается, так что степень конверсии субстрата в *транс*-изомер продукта составляет по меньшей мере около 78% относительно суммарного количества ретиноидов, включая ретиаль, присутствующих/образующихся в соответствующих клетках-хозяевах.

Таким образом, данное изобретение относится к модифицированным (трансселективным) бета-каротиноксидазам, в частности, к ВСО насекомых, которые могут экспрессироваться в пригодных для этого клетках-хозяевах, например, в клетках, продуцирующих каротиноиды/ретиноиды, в частности, в клетках грибов, причем активность этих ферментов такова, что процентное содержание *транс*-ретиаля, образующегося в результате катализируемого ими превращения бета-каротина, составляет по меньшей мере около 78%, например, около 80, 85, 90, 92, 95, 96, 97, 98, 99 или даже 100% относительно суммарного количества ретиноидов, присутствующих/образующихся в клетках-хозяевах.

Не модифицированные бета-каротиноксидазы, которые подлежат модификации по данному изобретению, предпочтительно происходят из представителей рода *Drosophila*, например, из *D. melanogaster*. В частности, активность модифицированных ВСО, то есть превращение с их помощью бета-каротина в ретиаль, составляет по меньшей мере от около 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% до около 100%, то есть примерно является такой же, как и соответствующих не модифицированных ВСО.

В частности, данное изобретение относится к модифицированным бета-каротиноксидазам, предпочтительно к модифицированным ВСО насекомых, более предпочтительно происходящим из представителей рода *Drosophila*, например, *D. melanogaster*, а именно к модифицированным ВСО, содержащим одну или более модификаций, предпочтительно содержащим одну или более аминокислотных замен в последовательности, которая по меньшей мере на около 60%, в частности, на 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% или до 100%, идентична последовательности SEQ ID NO:1, причем указанные одна или более аминокислотных замен локализованы в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам, выбранным из остатков 91 и/или 499 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1.

Термины «бета-каротиноксидаза», «фермент, окисляющий бета-каротин», «бета-каротиноксигеназа», «фермент с бета-каротиноксидазной активностью» или сокращение ВСО в настоящем описании используются взаимозаменяемо и относятся к ферментам бета-каротин-15,15'-диоксигеназам (ЕС 1.13.11.63), иногда также к ферментам бета-каротин-15,15'-монооксигеназам (ЕС 1.14.99.36), способным катализировать превращение молекулы бета-каротина в две молекулы ретиналя с образованием транс-ретиналя в относительном количестве 78-100% со степенью конверсии (то есть ферментативной активностью) по меньшей мере от около 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% до около 100%, то есть по меньшей мере около 5% бета-каротина превращается в ретиналь. Такие модифицированные ВСО в настоящем описании называются трансселективными ферментами. Предпочтительной модифицированной изоформой такого фермента является полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60% идентичную последовательности SEQ ID NO:1 и содержащую одну или более аминокислотных замен в одном или более положениях, указанных в настоящем описании.

Термины «превращение/конверсия», «ферментативное превращение/ферментативная конверсия», «окисление», «ферментативное окисление» или «расщепление» применительно к ферментативной каталитической реакции, субстратом которой является бета-каротин, в настоящем описании используются взаимозаменяемо и относятся к действию модифицированных ВСО, описанных в настоящей заявке.

В настоящем описании термины «стереоселективный», «селективный», «трансселективный» применительно к модифицированным ВСО используются взаимозаменяемо. Они относятся к ферментам, а именно к модифицированным ВСО, описанным в настоящей заявке, с увеличенной каталитической активностью с точки зрения увеличения доли образующихся транс-изомеров, то есть обеспечивающих сдвиг каталитической реакции превращения бета-каротина в сторону транс-ретиналя.

Модифицированный фермент по данному изобретению является трансспецифичным, если процентное содержание транс-изоформ продукта реакции, то есть транс-ретиная, составляет по меньшей мере около 78% относительно суммарного количества ретиноидов, включая ретиналь, образующихся под действием данного модифицированного фермента или продуцируемого клетками-хозяевами, синтезирующими каротин, в частности, клетками грибов, в которых содержится и экспрессируется данный модифицированный фермент.

Термин «степень конверсии» относится к процентному содержанию транс-формы, то есть к отношению количества транс-формы к суммарному количеству смеси цис- и транс-форм данного соединения, в частности, отношению количества транс-форм ретиноидов, включая транс-ретиналь, к суммарному количеству ретиноидов, включая ретиналь, например, присутствующих в соответствующих клетках-хозяевах; при этом транс-селективность является результатом действия модифицированных ВСО по данному изобретению.

В настоящем описании термин «клетка-хозяин грибов» включает, в частности, клетку грибов в качестве клетки-хозяина, например, клетку *Yarrowia* или *Saccharomyces*.

Модифицированные ферменты, описанные в настоящей заявке, либо вводят в подходящую клетку-хозяин путем обеспечения экспрессии гетерологичных генов этих ферментов в клетке-хозяине, продуцирующей каротиноиды, в частности, в клетке-хозяине грибов, либо используют бесклеточную систему, в которую включают нужные ферменты в изолированной форме. Предпочтительно, ферменты, описанные в настоящей заявке, вводят в подходящую клетку-хозяин, например, в клетку, продуцирующую каротиноиды, в частности, в клетку-хозяин грибов, путем обеспечения экспрессии гетерологичных генов этих ферментов методами, известными в данной области техники.

Ферменты, подходящие для получения модифицированных ВСО по данному изобретению, можно получить из любого источника, в котором образуется бета-каротин/ретинол, например, из растений, животных, включая человека, водорослей, грибов, включая дрожжи, или бактерий; предпочтительным источником являются насекомые, у которых ВСО обладают достаточной цис-селективностью, например, ВСО с цис-селективностью около 22% или меньше, то есть способные катализировать превращение бета-каротина в ретиналь с образованием *цис*-ретиная в процентном содержании 22% или меньше относительно суммарного количества ретиноидов. В частности, подходящие для использования в соответствии с данным изобретением ВСО, например, DmNinaB (SEQ ID NO:1), можно получить из представителей рода *Drosophila*, а именно *D. melanogaster*; см. также примеры в таблице 5. Ферменты, подходящие для

использования в соответствии с данным изобретением, в частности, ферменты насекомых, способны превращать бета-каротин в ретиналь до процентного содержания последнего по меньшей мере от около 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% до около 100%.

Существенная разница в ретиноидном цикле между насекомыми и млекопитающими связана с эффективностью и регуляцией включения *цис*-ретиналя в зрительный пигмент родопсин. Эти различия привели к появлению у насекомых в ходе эволюции белка DmNinaB и других ферментов, которые образуют ретиналь преимущественно в *цис*-форме. У позвоночных необходимое для регенерации зрительного пигмента наличие *цис*-изомера обеспечивается тем, что *транс*-ретинола превращается в итоге в 11-*цис*-ретиналь при участии изомеразы *транс*-ретинилового эфира (ретиноидизомергидролазы, Rpe65). В противоположность этому, у насекомых напрямую используется *цис*-ретиналь, образуемый DmNinaB. В целом, у насекомых имеется прямой путь обеспечения наличия *цис*-ретиналя, необходимого для включения в родопсин, а значит, можно полагать, что все действующие на этом этапе ферменты насекомых образуют *цис*-ретиноиды так же, как фермент DmNinaB.

В частности, бета-каротиноксидазы насекомых, подходящие для модификаций, описанных в настоящей заявке, можно найти в базах данных об аминокислотных последовательностях белков по частичной аминокислотной последовательности, включающей по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, выбираемых из [GWP]-C-E-[TIML]-P, причем предпочтительна последовательность G-C-E-T-P, соответствующая положениям с 496 по 500 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1 (все мотивы приведены согласно базе данных Prosite; см. https://prosite.expasy.org/scanprosite/scanprosite_doc.html), включающей аминокислотный остаток T499, по которому возможна мутация, описанная в настоящей заявке, для увеличения *транс*-селективности бета-каротиноксидаз насекомых. Другие бета-каротиноксидазы насекомых, содержащие указанный консервативный мотив и подходящие для использования в соответствии с данным изобретением, то есть подходящие для внесения аминокислотных замен, раскрытых в настоящем описании, могут быть идентифицированы путем поиска с помощью компьютерных программ BLAST (см., например, таблицу 5).

В одном из воплощений настоящего изобретения в модифицированном ферменте BCO, описанном в настоящей заявке, имеется аминокислотная замена в положении, соответствующем аминокислотному остатку в положении 91 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, которая приводит к появлению в указанном положении остатка триптофана или фенилаланина, а именно лейцин

заменяется на триптофан (L91W) или на фенилаланин (L91F). Указанный модифицированный фермент происходит из представителей рода *Drosophila*, например, *Drosophila melanogaster*. Когда такой модифицированный фермент, в котором имеется одна из описанных выше мутаций, используется для окисления бета-каротина, степень конверсии составляет по меньшей мере около 78-91%, то есть по меньшей мере около 78-91% ретиноидов, включая ретиналь, приходится на транс-изомеры; при этом активность фермента, то есть конверсия с его помощью бета-каротина в ретиналь, остается примерно такой же, как у BCO без мутации, например, около 20% бета-каротина превращается в ретиналь.

В другом воплощении данного изобретения в модифицированном ферменте BCO, описанном в настоящей заявке, имеется аминокислотная замена в положении, соответствующем аминокислотному остатку 499 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, которая приводит к появлению в указанном положении остатка лейцина, метионина или изолейцина, а именно треонин заменяется на лейцин (T499L), метионин (T499M) или изолейцин (T499I). Указанный модифицированный фермент происходит из представителей рода *Drosophila*, например, *Drosophila melanogaster*. Когда такой модифицированный фермент, в котором имеется одна из описанных выше мутаций, используется для окисления бета-каротина, степень конверсии составляет по меньшей мере около 83-95%, то есть по меньшей мере около 83-95% ретиноидов, включая ретиналь, приходится на транс-изомеры; при этом активность фермента, то есть превращение с его помощью бета-каротина в ретиналь, остается примерно такой же, как у BCO без мутации.

В одном из конкретных воплощений данного изобретения в модифицированном ферменте BCO, описанном в настоящей заявке, имеется комбинация аминокислотных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 91 и 499 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, а именно в положении 91 находится триптофан или фенилаланин и в положении 499 – лейцин, метионин или изолейцин, предпочтительно в положении 499 находится лейцин; например, в положении 91 лейцин заменен триптофаном (L91W) или фенилаланином (L91F) и в то же время в положении 499 треонин заменен лейцином (T499L), метионином (T499M) или изолейцином (T499I). Наиболее предпочтительны комбинации L91W-T499L или L91F-T499L. Указанные модифицированные ферменты происходят из представителей рода *Drosophila*, например, *Drosophila melanogaster*. Когда такие модифицированные ферменты, содержащие одну из описанных выше комбинаций мутаций, используются для окисления бета-каротина, степень конверсии составляет по меньшей мере около 92-97%, то есть по меньшей мере

около 92-97% ретиноидов, включая ретиналь, приходится на транс-изомеры; при этом активность фермента, то есть превращение с его помощью бета-каротина в ретиналь, остается примерно такой же, как у ВСО без указанных двух мутаций, например, в ретиналь превращается по меньшей мере от около 5% до около 10% бета-каротина.

Использование модифицированных ВСО, описанных в настоящей заявке, для ферментативной конверсии бета-каротина может обеспечить увеличение степени конверсии, то есть увеличение относительного количества транс-изомеров ретиноидов в смеси всех ретиноидов включая ретиналь, по меньшей мере на около 7%, например, на около 7-33% и более по сравнению с количеством транс-форм, образующихся при использовании не модифицированных ВСО с соответствующей последовательностью SEQ ID NO:1; при этом активность ферментов, то есть превращение с их помощью бета-каротин в ретиналь, остается такой же, как у не модифицированного фермента, а именно по меньшей мере около 5%.

Клетка-хозяин, описанная в настоящей заявке, способна превращать бета-каротин в транс-ретиналь со степенью конверсии по меньшей мере около 78%, например, 80, 85, 90, 92, 95, 96, 97, 98, 99 или даже 100% (количество транс-изомеров относительно суммарного количества ретиноидов, включая ретиналь, продуцируемых данными клетками-хозяевами); при этом поддерживается высокая активность превращения бета-каротина в ретиналь, а именно по меньшей мере около 5%.

Клетка-хозяин по данному изобретению также может быть модифицирована, чтобы в ней было больше копий генов и/или соответствующих белков, например, больше копий модифицированных ВСО с транс-селективностью, описанных в настоящей заявке. Для такой модификации могут потребоваться сильные промоторы, подходящие энхансеры транскрипции и/или трансляции или введение одной или более копий нужных генов в клетку-хозяин, продуцирующую каротиноиды, в частности, в клетку грибов, что приведет к накоплению соответствующих ферментов в данный момент времени. Какие методы понадобятся для модификации клетки-хозяина, зависит от особенностей этой клетки; такие методы известны специалистам в данной области техники. Изменения – усиление или ослабление – генной экспрессии могут быть определены различными известными в данной области техники методами, например, путем нозерн-, саузерн- или вестерн-блоттинга.

Создание мутаций, то есть изменений нуклеотидов в нуклеиновых кислотах или аминокислотных остатков в белках, достигается различными путями, например, путем случайного или сайт-направленного мутагенеза, физического воздействия, например, излучения, химической обработки или внедрения генетических элементов. Как

генерировать мутации, известно специалистам в данной области техники.

Таким образом, данное изобретение относится к клетке-хозяину, продуцирующей каротиноиды, в частности, клетке грибов, содержащей экспрессионный вектор или полинуклеотид, кодирующий модифицированный фермент BCO, описанный в настоящей заявке, в составе хромосомной ДНК. Такие продуцирующие каротиноиды клетки-хозяева, содержащие гетерологичный полинуклеотид, который кодирует модифицированный фермент BCO, в составе экспрессионного вектора или хромосомной ДНК, называются рекомбинантными клетками-хозяевами. Продуцирующие каротиноиды клетки-хозяева, в частности, клетки грибов, могут содержать одну или более копий генов, кодирующих модифицированные ферменты BCO, описанные в настоящей заявке, например, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, которые по меньшей мере на около 60% идентичны последовательности SEQ ID NO:1, содержащей одну или более аминокислотных замен, описанных в настоящей заявке, в результате которых повышается уровень экспрессии генов, кодирующих указанные модифицированные ферменты BCO.

Исходя из приведенных в настоящем описании последовательностей и из преимущественного образования транс-форм, а именно из степени конверсии, приводящей к образованию по меньшей мере около 78-100% транс-ретиноидов, включая транс-ретиаль, можно без труда определить нужные гены, кодирующие полипептиды, обладающие трансселективной бета-каротиноксидазной активностью, как описано в настоящей заявке, которые можно использовать для превращения бета-каротина в транс-ретиаль с ферментативной/конверсионной активностью по меньшей мере около 5%.

В частности, данное изобретение относится к способу идентификации модифицированных ферментов BCO, а именно ферментов BCO с повышенной транс-селективностью и в то же время с высокой активностью, причем указанный способ включает следующие стадии:

(1) выравнивание аминокислотных последовательностей различных бета-каротиноксидаз, включая, но не ограничиваясь перечисленными здесь, ферменты, происходящие из насекомых, предпочтительно из *Drosophila*, например, идентифицированных путем поиска с помощью программ BLAST в базах данных UNIREF/UNIPROT, которые имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, причем отобранные ферменты обладают высокой активностью образования ретиналя, а именно по меньшей мере на около 5%, в частности, по меньшей мере в два раза большей, чем фермент BCO из *Danio rerio*;

(2) идентификацию положений в аминокислотных последовательностях отобранных ферментов, соответствующих аминокислотным остаткам в положениях 91

и/или 499 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1;

(3) введение по меньшей мере одной или двух аминокислотных замен в идентифицированные положения, соответствующие аминокислотным остаткам, выбранным из остатков в положениях 91 и 499 и их комбинации аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, в выровненных последовательностях; и

(4) идентификацию ферментов по активности образования транс-ретинала в клетке-хозяине, продуцирующей каротиноиды, предпочтительно выбранной из клетки *Yarrowia* или *Saccharomyces*, со степенью конверсии применительно к образованию транс-ретиноидов, включая транс-ретиаль, по меньшей мере около 78-100%, и с ферментативной активностью превращения бета-каротина в ретиаль, остающейся на уровне по меньшей мере около 5%.

Более точно, данное изобретение относится к способу повышения транс-селективности ферментов BCO, как описано в настоящей заявке, а именно ферментов BCO, у которых аминокислотная последовательность по меньшей мере на 60% идентична последовательности SEQ ID NO:1 и цис-селективность при превращении бета-каротина составляет более 22% относительно суммарного количества ретиноидов, причем указанная транс-селективность увеличена по меньшей мере на около 7%, причем указанный способ включает следующие стадии:

(1) выравнивание аминокислотных последовательностей различных ферментов бета-каротиноксидаз, включая, но не ограничиваясь перечисленными здесь, ферменты, происходящие из насекомых, предпочтительно из *Drosophila*, в частности, идентифицированных путем поиска с помощью программ BLAST в базах данных UNIREF/UNIPROT, которые имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, причем отобранные последовательности предпочтительно содержат аминокислотную последовательность, состоящую по меньшей мере из пяти аминокислотных остатков, выбранных из G-C-E-T-P, соответствующих положениям 496-500 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, и обладают высокой активностью образования ретинала, а именно около 10%;

(2) идентификацию положений в аминокислотных последовательностях отобранных ферментов, соответствующих аминокислотным остаткам 91 и/или 499 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1;

(3) введение по меньшей мере одной или двух аминокислотных замен в идентифицированные положения, соответствующие аминокислотным остаткам, выбранным из остатков 91 и 499 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 и их комбинации, в выровненных последовательностях; и

(4) отбор ферментов по активности образования транс-ретинала в клетке-хозяине, продуцирующей каротиноиды, предпочтительно выбранной из *Yarrowia* или *Saccharomyces*, со степенью конверсии с образованием транс-ретиноидов, включая транс-ретиаль, по меньшей мере около 78-100%.

Данное изобретение относится, в частности, к применению новых модифицированных ферментов ВСО в способе получения транс-ретинала, отличающемся пониженным уровнем образования цис-изомеров, например, цис-ретинала. Этот способ осуществляется с использованием подходящих клеток-хозяев, продуцирующих каротиноиды или ретиноиды, в частности, клеток грибов, в которых экспрессируются указанные модифицированные ферменты ВСО, причем гены, кодирующие указанные ферменты, являются предпочтительно гетерологичными, то есть их вводят в указанные клетки-хозяева. Далее ретиаль можно превратить в витамин А с помощью известных в данной области техники химических или биотехнологических процессов, причем предпочтительно использовать при этом транс-изомеры, например, транс-ретиаль.

Таким образом, данное изобретение относится к способу получения ретиноидов, включая смесь изомеров ретинала, в том числе транс-ретиаль в процентном содержании 78-100% относительно суммарного количества различных форм ретинала/ретиноидов, образовавшихся в клетках-хозяевах в результате ферментативной активности модифицированного фермента ВСО, описанного в настоящей заявке, причем указанный способ включает обеспечение контактирования бета-каротина с указанным модифицированным ферментом ВСО и, при необходимости, выделение и/или очистку образовавшихся транс-изомеров из клеток-хозяев или, что предпочтительно, дальнейшее ферментативное превращение смеси изомеров ретинала, содержащей по меньшей мере около 78% транс-ретинала, в ретинол и, при необходимости, в ретинилацетат с тем же процентным содержанием транс-форм около 78-100% относительно суммарного количества ретиноидов.

В частности, данное изобретение относится к способу получения витамина А, включающему:

(а) введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей один из модифицированных ферментов ВСО, описанных в настоящей заявке, в подходящую клетку-хозяин, продуцирующую каротиноиды, в частности, в грибковую клетку-хозяин, описанную в настоящей заявке;

(b) ферментативную конверсию, а именно стереоселективное окисление бета-каротина с получением транс-ретинала в количестве по меньшей мере около 78% относительно суммарного количества ретиноидов, под действием указанного

модифицированного ВСО, экспрессируемого в клетке;

(с) при необходимости, ферментативную конверсию ретиналя с процентным содержанием транс-ретиналя по меньшей мере около 78% в ретинол по действию ретинолдегидрогеназ;

(d) при необходимости, ферментативную конверсию, а именно ацетилирование, ретинола под действием ацетилтрансфераз; и

(е) при необходимости, ферментативную конверсию указанного ретинилацетата в витамин А в подходящих для этого условиях, известных специалисту в данной области техники.

Термины «идентичность последовательностей», «степень идентичности (в процентах)», «идентичны на ...%» или «гомология последовательностей» в настоящем описании используются взаимозаменяемо. В целях данного изобретения согласно настоящему описанию для определения степени гомологии/идентичности двух аминокислотных или двух нуклеотидных последовательностей (в процентах) проводится оптимальное для наибольшего сходства выравнивание сравниваемых последовательностей. Для оптимизации выравнивания двух последовательностей используется внесение пропусков (гэпов). Такое выравнивание можно проводить по всей длине сравниваемых последовательностей. Альтернативно, выравнивание проводят по более коротким участкам последовательностей, например, на протяжении около 20, около 50, около 100 или более нуклеотидов/аминокислотных остатков. Степень идентичности – это отношение (в процентах) количества совпадений (в соответствующих положениях находятся одинаковые нуклеотиды/аминокислотные остатки) в выравниваемом участке к общему числу нуклеотидов/аминокислотных остатков в данном участке. Степень идентичности (в процентах) двух аминокислотных или двух нуклеотидных последовательностей определяют, используя алгоритм Нидлмана-Вунша (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). Этот алгоритм применим как к аминокислотным, так и к нуклеотидным последовательностям. Он включен в компьютерную программу NEEDLE. В целях данного изобретения использовалась программа NEEDLE из пакета программ EMBOSS (версия 2.8.0 или более поздние, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, Longden and Bleasby, *Trends in Genetics* 16, (6) pp276—277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Для белков использовали матрицу аминокислотных замен EBLOSUM62. Для нуклеотидных последовательностей использовали матрицу замен EDNAFULL. Оптимальные параметры выравнивания: штраф за внесение пропуска 10, штраф за продление пропуска 0,5. Специалистам в данной области техники должно быть ясно, что все эти различные

параметры обеспечивают несколько различные результаты, однако на общей степени идентичности двух последовательностей применение различных алгоритмов сказывается незначительно.

После выравнивания с помощью программы NEEDLE, как описано выше, степень идентичности (в процентах) между запрашиваемой последовательностью и последовательностью по данному изобретению рассчитывается следующим образом: количество положений, в которых есть совпадения, то есть одинаковые аминокислотные остатки или одинаковые нуклеотиды, между двумя последовательностями нужно разделить на общую длину выравнивания за вычетом суммарного количества пропусков. Такое значение идентичности получается в программе NEEDLE при использовании опции NOBRIEF и на выходе программы обозначается как «самая протяженная идентичность» ("longest identity"). Если две сравниваемые аминокислотные последовательности не различаются ни одним аминокислотным остатком, то степень их идентичности составляет 100%.

Модифицированные ВСО, описанные в настоящей заявке, включают также ферменты, в которых имеются замены аминокислотных остатков, не влияющие на ферментативную активность, то есть обладающие такими же свойствами, что и ферменты, описанные в настоящей заявке, и катализирующие превращение бета-каротина в транс-ретиноаль со степенью конверсии по меньшей мере около 75-100% относительно суммарного количества ретиноидов, включая ретинол, ретиноаль, ретинолацетат. Такие мутации, не влияющие на энзиматическую или иную активность ферментов по настоящему изобретению, называют «молчащими».

Экспрессия ферментов или полинуклеотидов, кодирующих один из модифицированных белков ВСО, описанных в настоящей заявке, может быть осуществлена в любой системе, содержащей (микро)организмы, подходящие для продуцирования ретиноидов, включая ретиноаль, и обеспечивающие экспрессию молекул нуклеиновых кислот, кодирующих один из описанных в настоящей заявке ферментов, включая их функциональные эквиваленты или производные. Примеры клеток-хозяев (микро)организмов, подходящих для продуцирования ретиноидов, включают клетки бактерий, водорослей, грибов, в том числе дрожжей, растений или животных. Предпочтительными бактериями являются представители рода *Escherichia*, например, *Escherichia coli*, а также родов *Streptomyces*, *Pantoea* (*Erwinia*), *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Synechococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mixococcus*, *Brevibacterium*, *Bradyrhizobium*, *Gordonia*, *Dietzia*, *Muricauda*, *Sphingomonas*, *Synochocystis*, *Paracoccus*, например, *Paracoccus zeaxanthinifaciens*. Предпочтительные эукариотические

микроорганизмы, в частности, грибы, в том числе дрожжи, выбирают из представителей рода *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*), *Aspergillus* (например, *Aspergillus niger*), *Pichia* (например, *Pichia pastoris*), *Hansenula* (например, *Hansenula polymorpha*), *Kluyveromyces* (например, *Kluyveromyces lactis*), *Phycomyces* (например, *Phycomyces blakesleanus*), а также родов *Mucor*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Xanthophyllomyces*, *Phaffia* и *Blakeslea* (например, *Blakeslea trispora*) или *Yarrowia* (например, *Yarrowia lipolytica*). В частности, предпочтительна экспрессия в клетках-хозяевах грибов, например, *Yarrowia* или *Saccharomyces*, или в бактериях *Escherichia*, более предпочтительна экспрессия в клетках *Yarrowia lipolytica* или *Saccharomyces cerevisiae*.

В зависимости от особенностей клеток-хозяев, полинуклеотиды, описанные в настоящей заявке, для стереоселективного (трансселективного) синтеза ретиналя, когда на транс-ретиналь приходится по меньшей мере 75-100%, можно оптимизировать для экспрессии в соответствующих клетках-хозяевах. Специалистам в данной области техники известно, как получить такие модифицированные полинуклеотиды. Ясно, что описанные в настоящей заявке полинуклеотиды включают и указанные выше полинуклеотиды, оптимизированные для экспрессии в конкретных клетках-хозяевах, поскольку они обеспечивают экспрессию нужного полипептида с соответствующей активностью, как раскрыто в настоящем описании.

Таким образом, в одном из своих воплощений данное изобретение относится к клетке-хозяину, продуцирующей каротиноиды, в частности, к клетке грибов, содержащей полинуклеотиды, кодирующие модифицированные ВСО, описанные в настоящей заявке, которые оптимизированы для экспрессии в указанной клетке-хозяине. В частности, клетку-хозяина, продуцирующую каротиноиды/ретиноиды, в частности, клетку грибов, выбирают из дрожжевых клеток, например, *Yarrowia* или *Saccharomyces*, в частности, *Yarrowia lipolytica* или *Saccharomyces cerevisiae*, а полинуклеотиды, кодирующие модифицированные ВСО, описанные в настоящей заявке, выбирают из полинуклеотидов, обеспечивающих экспрессию модифицированных полипептидов, содержащих по меньшей мере одну или две аминокислотные замены, как раскрыто в настоящем описании, в аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на около 60%, например, на 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% или до 100% идентична последовательности SEQ ID NO:1, например, замены в положениях, соответствующих положениям 91 и/или 499 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1.

В контексте данного изобретения подразумевается, что названия некоторых видов живых организмов, например, микроорганизмов, грибов, водорослей или растений,

включают также синонимы и базонимы, относящиеся к одному и тому же виду, характеризующемуся определенными физиологическими свойствами, что определяется Международным кодексом номенклатуры прокариотических организмов или Международным кодексом номенклатуры водорослей, грибов и растений (Мельбурнским кодексом ботанической номенклатуры).

Данное изобретение относится к способу получения ретиналя, в частности, транс-изомера ретиналя, обеспечивающему образование по меньшей мере 78% транс-ретиналя, путем ферментативной конверсии бета-каротина под действием модифицированных ВСО, описанных в настоящей заявке, причем указанные ферменты предпочтительно гетерологично экспрессируются в подходящих клетках-хозяевах в подходящих условиях, как раскрыто в настоящем описании. Образующийся ретиналь, в частности, транс-ретиналь, можно выделить и при необходимости также очистить из культуральной среды и/или из самих клеток-хозяев. В другом воплощении данного изобретения ретиналь, в частности, транс-ретиналь, используют как предшественник или промежуточный продукт в многоэтапном способе получения витамина А, причем этот способ, как известно специалистам в данной области техники, включает дальнейшую конверсию/ацетилирование ретиналя в ретинол с образованием ретинилацетата. Витамин А выделяют и при необходимости также очищают из культуральной среды и/или из самих клеток-хозяев способами, известными специалистам в данной области техники.

По сравнению со способом, в котором используются не модифицированные ВСО, описанные в настоящей заявке, процентное содержание транс-ретиноидов, например, транс-ретиналя, можно увеличить по меньшей мере на около 7%, например, на от около 7 до около 33% или больше, если использовать клетки-хозяева, продуцирующие каротиноиды/ретиноиды в которых содержится и экспрессируется один из модифицированных ферментов ВСО, описанных в настоящей заявке, причем активность этого фермента, то есть превращение бета-каротина в ретиналь, остается примерно такой же, как в отсутствие модификации, то есть по меньшей мере около 5%. Клетки-хозяева предпочтительно являются клетками грибов, например, выбранных из *Yarrowia* или *Saccharomyces*.

Клетки-хозяева, а именно клетки микроорганизмов, водорослей, грибов, животных или растений, способные к экспрессии генов, обеспечивающих продуцирование бета-каротина, модифицированных ВСО, описанных в настоящей заявке, и/или при необходимости других генов, необходимых для биосинтеза витамина А, культивируют в водной среде в присутствии питательных веществ в аэробных или анаэробных условиях, зависящих, как известно специалистам в данной области техники, от природы клеток-

хозяев. При необходимости культивирование клеток-хозяев осуществляется в присутствии белков и/или кофакторов, участвующих в переносе электронов, как описано в настоящей заявке. Культивирование/рост клеток-хозяев может осуществляться в периодической культуре, периодической культуре с подпиткой, в непрерывной или полунепрерывной культуре. Предпочтительно, в зависимости от природы клеток-хозяев выход ретиноидов, например, витамина А и его предшественников, например, ретиналя, ретинола и/или ретинилацетата, может варьировать, как известно специалистам в данной области техники. Культивирование и выделение клеток-хозяев, продуцирующих бета-каротин и ретиноиды, выбранных из *Yarrowia* или *Saccharomyces*, описано, например, в заявках WO2008042338 и WO2014096992. Что касается образования бета-каротина и ретиноидов в клетках *E. coli*, то эти способы описаны, например, в заявке США № 20070166782.

В настоящем описании термин «клетка-хозяин, продуцирующая каротиноиды», в частности, грибная или бактериальная клетка-хозяин, представляет собой клетку, в которой экспрессируются необходимые для образования этих веществ полипептиды, обладающие активностью *in vivo*, в результате чего синтезируются каротиноиды, например, бета-каротин. Гены и способы получения клетки-хозяина, продуцирующей каротиноиды, известны в данной области техники; см., например, заявку WO2006102342. В зависимости от того, какой каротиноид образуется, в процессе участвуют разные гены. например, гены, кодирующие геранилгеранилсинтазу, фитоенсинтазу, фитоендезатуразу, ликопинциклазу, известные в данной области техники (например, описанные в заявке США № 20160130628 или в заявке WO2009126890).

В настоящем описании термин «клетка-хозяин, продуцирующая ретиноиды», в частности, грибная или бактериальная клетка-хозяин, представляет собой клетку, в которой экспрессируются необходимые для образования этих веществ полипептиды, обладающие активностью *in vivo*, в результате чего синтезируются ретиноиды, например, витамин А и его предшественники ретиналь и/или ретинол, путем ферментативной конверсии бета-каротина. Эти полипептиды включают модифицированные ВСО, описанные в настоящей заявке. Гены, участвующие в метаболизме витамина А, и способы получения клетки-хозяина, продуцирующей ретиноиды, известны в данной области техники: такая клетка, будучи трансформированной генами, кодирующими модифицированные ВСО, описанные в настоящей заявке, может продуцировать ретиналь с процентным содержанием транс-ретиналя по меньшей мере около 75% относительно суммарного количества ретиноидов. При необходимости, если трансформировать клетку-хозяин генами, кодирующими ретинолдегидрогеназу, она будет продуцировать ретинол.

При необходимости ретинол можно ацетилировать путем трансформации клетки-хозяина генами, кодирующими алкоголь-ацетилтрансферазу. При необходимости можно удалить и/или инактивировать эндогенные гены, обеспечивающие ацетилирование ретинола. Также при необходимости можно подобрать ферменты для продуцирования и ацетилирования транс-изомера ретинола, что позволяет получить высокий выход полностью транс-ретинилацетата. Транс-специфичность, обеспечиваемая модифицированными ферментами ВСО по данному изобретению, не зависит от того, какая используется клетка-хозяин, продуцирующая ретиноиды, например, клетка грибов, включая, но не ограничиваясь перечисленным здесь, клетку *Yarrowia lipolytica* или *Saccharomyces cerevisiae*, причем конверсия бета-каротина в ретиналь составляет по меньшей мере около 5%.

Предпочтительно бета-каротин превращается в ретиналь (с процентным содержанием транс-ретиная по меньшей мере 78-100%) под действием модифицированных ВСО, описанных в настоящей заявке, затем ретиналь превращается в ретинол под действием ферментов с ретинолдегидрогеназной активностью и далее ретинол превращается в ацетат ретинола под действием ацетилтрансфераз, например, ATF1. Ацетат ретинола – предпочтительный ретиноид, выделяемый из клетки-хозяина.

В настоящем описании термин «удельная активность» или «активность» применительно к ферментам означает каталитическую активность, то есть способность фермента катализировать образование определенного продукта из данного субстрата. Удельная активность - это количество превращенного субстрата и/или количество образовавшегося продукта за определенный промежуток времени в расчете на количество белка при определенной температуре. Обычно удельную активность выражают в микромолях превращенного субстрата или образовавшегося продукта за 1 минуту в расчете на 1 миллиграмм белка – сокращенно мкмоль/мин/мг. Величина с размерностью мкмоль/мин обозначается U (Ед). В настоящем описании удельная активность выражается в мкмоль/мин/(мг белка) или Ед/(мг белка) взаимозаменяемо. Фермент активен, если он проявляет свою каталитическую активность *in vivo*, то есть в клетках-хозяевах, описанных в настоящей заявке, или в подходящей бесклеточной системе в присутствии подходящего субстрата. Специалистам в данной области техники известно, как измерять ферментативную активность, в частности, активность модифицированных ВСО, описанных в настоящей заявке. Аналитические методы для определения способности подходящих модифицированных ВСО, описанных в настоящей заявке, продуцировать транс-ретиналь путем конверсии бета-каротина известны в данной области техники, например, они описаны в примере 4 заявки WO2014096992. Коротко говоря, титры транс-

ретиная, цис-ретиная, бета-каротина и других продуктов могут быть определены путем высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

В одном из конкретных воплощений данного изобретения предлагаемый способ осуществляется с использованием модифицированных ВСО насекомых, в частности, происходящих из *Drosophila melanogaster*, при этом по меньшей мере 1% ретиная образуется в течение 200 ч в клетках-хозяевах Yagrowia методом ферментации с подпиткой кукурузным маслом, а ВСО экспрессируется под контролем промотора Tef1 (DmNinaB). Активность ферментов ВСО насекомых (и модифицированных, и не модифицированных) по меньшей мере вдвое выше, чем активность фермента ВСО, выделенного из рыбы *Danio rerio*, известного из базы данных под номером NP_001315424.

Термин «ретиноиды» в настоящем описании включает продукты расщепления бета-каротина, называемые также апокаротиноидами, которые включают, не ограничиваясь перечисленным здесь, ретиналь, ретиноевую кислоту, ретинол, метоксид ретиноевой кислоты, ретинилацетат, ретиниловые эфиры, 4-кеторетиноиды, 3-гидроксиретиноиды или их комбинации. Биосинтез ретиноидов описан, например, в заявке WO2008042338

Используемый в настоящем описании термин «ретиналь» относится к соединению, обозначаемому по номенклатуре IUPAC (2E,4E,6E,8E)-3,7-диметил-9-(2,6,6-триметилциклогексен-1-ил)нона-2,4,6,8-тетраеналь. В настоящем описании этот термин используется взаимозаменяемо с терминами «ретинальдегид» или «витамин А-альдегид» и включает как цис-, так и транс-изомеры, например, 11-цис-ретиналь, 13-цис-ретиналь, транс-ретиналь и полностью транс-ретиналь. Смесь цис- и транс-изомеров ретиная в настоящем описании называется ретиналиевой смесью, применительно к которой выражения «процентное содержание транс-ретиная по меньшей мере 78%» и «процентное содержание цис-ретиная около 22% или меньше» относятся к отношению количества транс- или, соответственно, цис-ретиная в этой смеси к суммарному количеству ретиноидов в этой смеси. Если отношение количества цис-ретиная к суммарному количеству ретиноидов, полученных путем ферментативного превращения бета-каротина, составляет не более 22% , это считается «относительно высоким уровнем (в процентах) цис-селективности», и такой уровень подлежит снижению путем использования модифицированных ферментов ВСО, описанных в настоящей заявке. Из-за нестабильности ретиная транс- и цис-специфичность часто определяют по содержанию промежуточных продуктов, например, ретинола, который является непосредственным продуктом конверсии ретиная под действием ретинолдегидрогеназы (RDH)) или ретинилацетата, который является прямым продуктом превращения ретинола под

действием ацетилтрансферазы-1 (ATF1)/.

Термин «каротиноиды», используемый в настоящем описании, хорошо известен в данной области техники. Он включает углеводороды с длинной полиеновой цепью из изопреновых звеньев, содержащей 40 атомов углерода, которая в природе образуется в результате объединения двух молекул геранилгеранилфосфата, содержащих по 20 атомов углерода. К каротиноидам относятся, не ограничиваясь перечисленным здесь, фитоеен, ликопин и каротин, например, бета-каротин, который, окисляясь по 4-кетогруппе или по 3-гидроксигруппе, образует кантаксантин, зеаксантин или астаксантин. Биосинтез каротиноидов описан, например, в заявке WO2006102342.

Термин «витамин А» в настоящем описании относится к любой химической форме витамина А, существующей в водных растворах, твердой фазе и композициях, и включает ретинол, ретинилацетат и ретиниловые эфиры. Он также включает ретиноевую кислоту, например, в не диссоциированной форме, в свободном виде или диссоциированную и представленную анионом.

Приведенные ниже примеры являются сугубо иллюстративными и никак не ограничивают объем данного изобретения. Содержание всех цитируемых в данной патентной заявке литературных источников, в том числе заявок на патенты, патентов и опубликованных патентных заявок, включено в настоящее описание в качестве ссылки, в частности, заявки WO2006102342, WO2008042338 или WO2014096992.

Примеры

Пример 1. Методы, штаммы и плазмиды

Все основные молекулярно-биологические методы и манипуляции с ДНК, описанные в настоящей заявке, осуществлялись, как правило, в соответствии с руководствами Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York (1989) или Ausubel et al. (eds). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: New York (1998).

Опыты с использованием встряхиваемых планшетов. Как правило, в лунки планшетов вносили 10 мкл свежей культуры клеток *Yarrowia* в 800 мкл 0,075%-ного дрожжевого экстракта, содержащего 0,25% пептона (0,25X YP), и наслаивали поверх 200 мкл минерального масла Drakeol 5 и в качестве источника углерода кукурузное масло (5% в минеральном масле и/или 5% в водном растворе глюкозы). Трансформированные клетки культивировали в 24-луночных планшетах (Multitron, 30°C, 800RPM) в среде «дрожжевой экстракт-пептон-декстроза (YPD)», содержащей 20% додекана, в течение 4 суток при встряхивании. Фракцию минерального масла с лунок снимали и анализировали содержимое лунок методом жидкостной хроматографии с высоким разрешением (HPLC),

используя колонки с прямой фазой и детектор с фотодиодной матрицей.

ДНК-трансформация. Штаммы трансформировали следующим образом. После культивирования в течение ночи в среде YPD клетки собирали и 50 мкл среды, содержащей клетки, инкубировали с 1 мкг трансформирующей ДНК, как правило линейной, для интегративной трансформации в 500 мкл смеси 40% полиэтиленгликоля (PEG) с молекулярной массой 3550, 100 мМ ацетата лития, 50 мМ дитиотреитола, 5 мМ трис(гидроксиметил)аминометана (Tris-Cl; pH 8,0) и 0,5 мМ этилендиаминтетраацета (EDTA) в течение 60 минут при температуре 40°C, после чего вносили или сразу в селективную среду или в случае использования доминантного селективного маркера (антибиотика) клетки сначала выращивали в жидкой среде YPD в течение 4 часов при температуре 30°C, а затем их помещали в селективную среду.

Манипуляции с ДНК. Синтезировали гены с концами NheI и MluI в векторе pUC57. Гены субклонировали в векторах MB5082 «URA3», MB6157 HygR и MB8327 NatR для селекции маркеров при трансформантах *Yarrowia lipolytica*, как описано в заявке WO2016172282. Для точной вставки гена путем случайного негомولوجичного присоединения концов ген, маркер и HindIII/XbaI (MB5082) или PvuII (MB6157 и MB8327), соответственно, очищали с помощью гель-электрофореза и на колонках Qiagen.

Перечень плазмид. Используемые плазмиды, штаммы и кодоноптоимизированные последовательности указаны в таблицах 1 и 2 и в Списке последовательностей. Нуклеотидная последовательность ID NO:2 кодоноптоимизирована для экспрессии в клетках *Yarrowia*.

Таблица 1. Перечень плазмид, используемых для конструирования штаммов, содержащих гены гетерологичных модифицированных BCO. SEQ ID NO относится к вставкам. Подробнее см. в тексте

Плазмида MB	Остов плазмиды MB	Вставка	SEQ ID NO: (аминокислотная/нуклеотидная)
8457	5082	DmBCO	1/2

Таблица 2. Штаммы *Yarrowia*, используемые для получения ретиноидов, содержащие гетерологичные гены, кодирующие ферменты BCO (не модифицированные или модифицированные). Подробнее см. в тексте

Штамм ML	Характеристика	Первое описание
7788	Продуцирует каротин	WO2016172282
15710	ML7788, трансформированный MB7311 - <i>Mucor</i> CarG	WO2016172282
17544	ML15710; маркер URA3 удален с использованием FOA; маркер HygR удален с использованием Cre/lox	Настоящая заявка
17767	ML17544, трансформированный MB6072 DmBCO-URA3 и MB6732 SbATF1-HygR; маркеры удалены	Настоящая заявка
17978	ML17968, трансформированный MB8200 FfRDH-URA3; маркеры удалены	Настоящая заявка

CarG – геранилгеранилпирофосфатсинтаза;

URA3 – маркерный ген, кодирует оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу, участвующую в синтезе пиримидиновых рибонуклеотидов; FOA – фтороротовая кислота

HygR - маркерный ген устойчивости к гигромицину; Cre/lox – система с рекомбиназой Cre для удаления участков ДНК

Жидкостная хроматография с прямой фазой для разделения ретиноидов. Для нанесения образцов использовали бинарный насос Waters 1525, соединенный с автодозатором Waters 717. Ретиноиды разделяли на колонке Phenomenex Luna 3 мкм Silica (2), 150 x 4,6 мм при использовании защитной колонки с диоксидом кремния. Подвижная фаза состояла из 1000 мл гексана, 30 мл изопропилового спирта и 0,1 мл уксусной кислоты для соединений, близких астаксантину, либо из 1000 мл гексана, 60 мл изопропилового спирта и 0,1 мл уксусной кислоты для соединений, близких зеаксантину. Скорость потока и в том, и в другом случае составляла 0,6 мл/мин. Температура колонки была такой же, как температура окружающей среды. Инжектируемый объем составлял 20 мкл. Использовали детектор с фотодиодной матрицей с диапазоном от 210 до 600 нм. Определение аналитов представлено в таблице 3.

Таблица 3. Аналиты при HPLC с прямой фазой. Все аналиты вместе дают суммарное количество ретиноидов. Подробнее см. в тексте

Интермедиаты	Время удерживания [мин]	$\lambda_{\max}$ [нм]
11- <i>цис</i> -дигидроретинол	7,1	293
11- <i>цис</i> -ретиноаль	4	364
11- <i>цис</i> -ретинол	8,6	318
13- <i>цис</i> -ретиноаль	4,1	364
дигидроретинол	9,2	292
ретирилацетат	3,5	326
ретириловый эфир	3	325
<i>транс</i> -ретиноаль	4,7	376
<i>транс</i> -ретинол	10,5	325

Приготовление образцов. Образцы получали различными методами в зависимости от условий. В случае образцов цельного или обогащенного ферментационного бульона бульон помещали во взвешенную пробирку Precellys®, добавляли подвижную фазу и гомогенизировали с помощью гомогенизатора Precellys® (Bertin Corp, Роквилл, шт. Мэриленд, США) на максимальной скорости 3X согласно указаниям производителя. Образцы из обогащенного ферментационного бульона центрифугировали в пробирках объемом 1,7 мл на микроцентрифуге при скорости 10 000 об/мин; жидкость сливали, добавляли 1 мл воды, размешивали осадок и сливали; доведенную до начального объема смесь снова осаждали и прибавляли до нужного объема подвижную фазу, после чего гомогенизировали с помощью шарикового гомогенизатора Precellys®. Для анализа фракции минерального масла образец центрифугировали со скоростью 4000 об/мин в

течение 10 мин, осторожно отбирали сверху масло пипеткой с прямым вытеснением (Eppendorf, Хопподж, шт.Нью-Йорк, США) и разбавляли подвижной фазой, перемешивая вихревым способом, после чего определяли концентрацию ретиноидов путем HPLC.

Условия ферментации. Ферментацию (особенно в большом масштабе) проводили в тех же условиях, как описано ранее (см. WO2016172282), используя насаивание минерального масла и настольные ферментеры объемом 0,5-5 л с перемешиванием и подпиткой кукурузным маслом. Как правило, такие же результаты получались в ферментерах с периодической подпиткой и перемешиванием с повышенной продуктивностью, что подтверждает эффективность системы получения ретиноидов по данному изобретению.

Пример 2. Получение транс-ретиная в клетках *Yarrowia lipolytica*

Штамм ML17544, продуцирующий бета-каротин, трансформировали очищенным линейным фрагментом ДНК, используя эндонуклеазное расщепление (рестриктазами HindII и XbaI) гена бета-каротиноксидазы (не модифицированной или модифицированной), содержащего кодоноптоимизированные фрагменты, соединенные с маркерным геном URA3. Трансформирующая ДНК происходила из плазмиды MB6702 с геном NinaB, кодирующим фермент BCO *Drosophila*; в ней использовалась кодоноптоимизированная последовательность (SEQ ID NO:2). Полученные гены проверяли путем скрининга 6-8 изолятов описанным выше способом во встряхиваемых планшетах, и те изоляты, которые успешно проходили проверку, использовали при культивировании в ферментерах с периодической подпиткой и перемешиванием в течение 8-10 суток. Определяли содержание цис- и транс-ретиная путем HPLC со стандартными параметрами, как описано в заявке WO2014096992, но калибровку делали, используя очищенные стандартные образцы ретиноидов-аналитов. При использовании модифицированных BCO количество транс-изомера в ретиналиевой смеси увеличивалось по меньшей мере до 78,1-96,5%, а при использовании не модифицированных, то есть BCO дикого типа *Drosophila melanogaster* (SEQ ID NO:1) получалось лишь 73% транс-ретиная относительно суммарного количества ретиноидов (см. таблицу 4). Далее в клетках *Yarrowia lipolytica* ретиналь превращается в ретинол под действием природной ретинолдегидрогеназы (RDH). Эти изомеры могут быть также определены как суррогаты для цис- и транс-изомеров ретиная. Ферментативная активность, свидетельствующая об образовании ретиная из бета-каротина, была примерно одинаковой при использовании ферментов BCO дикого типа или же модифицированных BCO (в ретиналь превращается около 5-20% бета-каротина).

Таблица 4. Получение ретиналя в клетках *Yarrowia* увеличивается при использовании модифицированных ВСО из *Drosophila melanogaster* (DmNinaB). "%транс" - процентное содержание транс-ретиналя в смеси ретиноидов. «DCW» – сухая масса клеток. Подробнее см. в тексте

Ген ВСО	%транс-	%ретиноиды/DCW	Штамм ML	Плазмида MB
DmNinaB wt	73	14	17544	6702
DmNinaB T499L	95,3	9,8	17544	9343
DmNinaB L91W-T499L	96,5	7,3	17544	9357
DmNinaB L91F-T499L	91,7	7,6	17544	9358
DmNinaB T499M	96,4	9,9	17544	9360
DmNinaB T499I	83,2	5,2	17544	9363
DmNinaB L91F	90,8	14	17544	9339
DmNinaB L91W	78,1	14	17544	9338

wt - дикий тип

Кроме того, авторы проверили частоту встречаемости аминокислотных остатков в положениях, соответствующих L91, L336, M364, T499 и L611, в полипептидной цепи различных ферментов ВСО насекомых, аминокислотная последовательность которых по меньшей мере на около 60% идентична последовательности SEQ ID NO:1 (см. таблицу 5).

Окружающие аминокислотные остатки были идентифицированы путем моделирования строения фермента с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1 с помощью компьютерной программы Yasara (<https://www.yasara.org/>) при следующих параметрах и коде 4RSC в файле PDB (доступно по адресу <http://www.pdb.org>) в качестве следующей матричной структуры: скорость моделирования (slow = best): Slow; количество итераций PSI-BLAST в матричном поиске (PsiBLAST) – 3;

максимальное разрешенное значение E (PSI-)BLAST для принятия матрицы (EValue Max) – 0,5; максимальное количество используемых матриц (Templates Total) – 1;

максимальное количество матриц с одной и той же последовательностью (Templates SameSeq) – 1; максимальная степень олигомеризации (OligoState) - 4 (тетрамерная);

максимальное количество вариантов выравнивания на одну матрицу (Alignments) – 3;

максимальное количество проверенных конформаций на одну петлю (LoopSamples) – 50;

максимальное количество аминокислотных остатков, добавляемых к концам последовательности (TermExtension) – 10.

Модель гомологии, полученная с помощью Yasara, затем анализируется специалистом в данной области техники с целью идентификации аминокислотных остатков, окружающих положениями с мутациями 91 и 499. После этого осуществляют

выравнивание с наиболее близкими (степень идентичности с последовательностью SEQ ID NO:1 58% и более) гомологичными последовательностями из базы данных Uniref/Swissprot (<https://www.uniref.org>) и проверяют консервативность аминокислотных остатков в пяти указанных выше положениях. Эти данные приведены в таблице 5. Все указанные аминокислотные остатки в мутированных положениях 91 и 499 и в их окружении (положения 336, 364 и 611) являются строго консервативными; они находятся непосредственно в активном центре фермента, где связывается субстрат (бета-каротин) и близко от иона металла, связанного консервативным каталитическим гистидиновым кластером, поэтому ожидается, что у этих гомологичных последовательностей генерированные мутации будут таким же образом влиять на стереоспецифичность

Таблица 5. Поиск с помощью пакета программ BLAST ферментов BCO насекомых, аминокислотные последовательности которых по меньшей мере на 60% идентичны последовательности SEQ ID NO:1 и у которых аминокислотные остатки, соответствующие положениям 91, 499, 336, 364 и 611, консервативны. Заголовок левой колонки «Ссылка #» - код в базе данных UNIREF-SWISSPROT (www.uniprot.org); заголовок третьей колонки «Идентичность» - наиболее протяженная идентичность с полипептидом DmBCO1 (SEQ ID NO:1); L91 - аминокислотный остаток, соответствующий положению 91L, в котором сделана мутация; T499 - аминокислотный остаток, соответствующий положению 499T, в котором сделана мутация; L336 - аминокислотный остаток, соответствующий положению 336L, в окружении остатков 91 и 499; M364 - аминокислотный остаток, соответствующий положению 364M, в окружении остатков 91 и 499; L611 - аминокислотный остаток, соответствующий положению 611L, в окружении остатков 91 и 499. Все приведенные последовательности по молекулярному механизму действия являются бета-каротин-15,15'-монооксигеназами. Подробнее см. в тексте

Ссылка #	Организм	Идентичность [%]	L91	T499	L336	M364	L611
SEQ ID NO:1	<i>Drosophila melanogaster</i>	100	L	T	L	M	L
B3P415	<i>Drosophila erecta</i>	96,0%	L	T	L	M	L
A0A1W4V4X0	<i>Drosophila ficusphila</i>	93,6%	L	T	L	M	L
B3LWV8	<i>Drosophila ananassae</i>	90,2%	L	T	L	M	L
B4G3J1	<i>Drosophila persimilis</i>	84,5%	L	T	L	M	L
Q299Z6	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	84,4%	L	T	L	M	L
B4NH74	<i>Drosophila willistoni</i>	84,0%	L	T	L	M	L
A0A3B0K9S8	<i>Drosophila guanche</i>	83,9%	L	T	L	M	L
B4JYB7	<i>Drosophila grimshawi</i>	83,1%	L	T	L	M	L
B4KBR0	<i>Drosophila mojavensis</i>	83,1%	L	T	L	M	L
A0A3B0K2Y2	<i>Drosophila guanche</i>	82,3%	L	T	L	M	L
A0A0M3QXZ7	<i>Drosophila busckii</i>	82,3%	L	T	L	M	L
B4MBL2	<i>Drosophila virilis</i>	81,4%	L	T	L	M	L

A0A0Q9WZH1	<i>Drosophila mojavensis</i>	81,3%	L	T	L	M	L
W8AFR2	<i>Ceratitis capitata</i>	71,8%	L	T	L	M	L
A0A1A9V8V6	<i>Glossina austeni</i>	65,1%	L	T	L	M	L
A0A1A9XM81	<i>Glossina fuscipes</i>	64,7%	L	T	L	M	L
A0A1B0FGT0	<i>Glossina morsitans</i>	64,4%	L	T	L	M	L
A0A1B0BNS4	<i>Glossina palpalis gambiensis</i>	64,2%	L	T	L	M	L
A0A182NUF8	<i>Anopheles dirus</i>	61,5%	L	T	L	M	L
A0A182Y0A2	<i>Anopheles stephensi</i>	61,3%	L	T	L	M	L
A0A182WU08	<i>Anopheles quadriannulatus</i>	61,2%	L	T	L	M	L
A0A182URE3	<i>Anopheles merus</i>	60,9%	L	T	L	M	L
A0A182PPK6	<i>Anopheles epiroticus</i>	60,7%	L	T	L	M	L
A0A182W715	<i>Anopheles minimus</i>	60,5%	L	T	L	M	L
A0A182LRC9	<i>Anopheles culicifacies</i>	60,4%	L	T	L	M	L
A0A182JU85	<i>Anopheles christyi</i>	60,2%	L	T	L	M	L
A0A182F4X0	<i>Anopheles albimanus</i>	60,2%	L	T	L	M	L
A0A1Y9GLE5	<i>Anopheles arabiensis</i>	60,2%	L	T	L	M	L
A0A182L1F0	<i>Anopheles coluzzii</i>	60,1%	L	T	L	M	L
A0A182Q6V3	<i>Anopheles farauti</i>	60,0%	L	T	L	M	L
A0A182SJU9	<i>Anopheles maculatus</i>	59,5%	L	T	L	M	L
W5J3D8	<i>Anopheles darlingi</i>	59,0%	L	T	L	M	L
A0A182H5Q0	<i>Aedes albopictus</i>	58,7%	L	T	L	M	L
Q17FY3	<i>Aedes aegypti</i>	58,5%	L	T	L	M	L

Пример 3. Получение транс-ретиная в клетках *Saccharomyces cerevisiae*

Штамм, продуцирующий бета-каротин, трансформировали гетерологичными генами, кодирующими такие ферменты, как геранигеранилсинтаза, фитоенсинтаза, ликопинсинтаза, сконструированными для продуцирования бета-каротина, стандартными методами, известными в данной области техники (например, описанными в заявках US № 20160130628, WO2009126890 или в работе Verwaal et al., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 73, No. 13, pp.4342-4350, 2007). Штамм MY4378 (CEN.PK113-7D FBA1p-crtE; TEF1p-crtYB; ENO1p-crtI), продуцирующий бета-каротин, трансформировали генами, кодирующими модифицированные BCO, кодоноптоимизированными для экспрессии в клетках *Saccharomyces*, например, вектором MB8433 (DmNinaB wt HYGR), с получением штамма MY4382(CEN.PK113-7D FBA1p-crtE; TEF1p-crtYB; ENO1p-crtI TEF1p-DmNinaB wt HYGR) или аналогичным образом с получением транс-ретиная в количестве по меньшей мере 78%, относительно суммарного количества ретиноидов, включая ретиналь. При необходимости, когда трансформацию проводили вектором MB8431, содержащим ген ретинолдегидрогеназы, происходило образование ретинола. Вектор MB8433 конструировали как интегрирующий селективный по гигромицину вектор на основе MB7622 (SEQ ID NO:3), встраивая кодирующую последовательность по уникальным сайтам BamHI/EcoRI, с получением векторов MB8431 (SEQ ID NO:4) и MB8433 (SEQ ID NO:5). Также при необходимости можно отобрать ферменты для продуцирования и ацетилирования транс-изомера ретинола, в результате чего образуется

в большом количестве полностью транс-ретинилацетат.

Использование ферментов ВСО, указанных в таблице 4, в клетках-хозяевах *S. saccharomyces* позволяет превращать бета-каротин в ретиналь с процентным содержанием по меньшей мере около 5% и транс-селективностью по меньшей мере около 78% транс-ретиная относительно суммарного количества ретиноидов. Отношение процентного содержания ретиноидов к сухой массе клеток-хозяев в случае *S. saccharomyces* намного меньше, чем в случае *Yarrowia lipolytica*, например, составляет около 2-3 (эти данные не приводятся).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фермент бета-каротиноксидаза, предпочтительно фермент насекомых, более предпочтительно фермент, происходящий из *Drosophila*, имеющий одну или более аминокислотных замен в последовательности, которая по меньшей мере на около 60%, в частности, на 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% или до 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, причем указанные одна или более аминокислотных замен локализованы в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам, выбранным из остатков 91 и/или 499 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, и в положении 91 находится аминокислотный остаток триптофана или фенилаланина и/или в положении 499 находится аминокислотный остаток, выбранный из метионина, лейцина или изолейцина.

2. Фермент по пункту 1, катализирующий превращение бета-каротина в ретиналь, в результате которого на транс-ретиналь приходится по меньшей мере около 78% относительно суммарного количества ретиноидов.

3. Фермент по пункту 1 или 2, который превращает в ретиналь по меньшей мере около 5% бета-каротина.

4. Фермент по любому из пунктов 1-3, транс-специфичность которого, включая образование транс-ретиналя, увеличивается по меньшей мере на около 7% относительно суммарного количества ретиноидов по сравнению с транс-специфичностью соответствующего фермента, в котором отсутствует одна или более из указанных выше аминокислотных замен.

5. Фермент по любому из пунктов 1-4, имеющий одну аминокислотную замену, которая локализована в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам, выбранным из остатков 91 и/или 499 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, предпочтительно, остатка 499.

6. Фермент по любому из пунктов 1-5, имеющий по меньшей мере две аминокислотные замены в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам, выбранным из остатков 91 и 499 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1.

7. Фермент по любому из пунктов 1-6, который экспрессируется в клетке-хозяине, продуцирующей каротиноиды, предпочтительно в клетке грибов, более предпочтительно в клетке, выбранной из *Yarrowia* или *Saccharomyces*.

8. Клетка-хозяин, продуцирующая каротиноиды, в частности, грибковая клетка-хозяин, содержащая фермент по любому из пунктов 1-7, предпочтительно выбранная из *Yarrowia* или *Saccharomyces* и трансформированная полинуклеотидом, экспрессирующим

указанный фермент.

9. Способ получения транс-ретиная, включающий обеспечение клетки-хозяина, продуцирующей каротиноиды, по пункту 8, культивирование указанной клетки в подходящей культуральной среде в подходящих условиях и, при необходимости, выделение и/или очистку транс-ретиная из указанной среды, причем процентное содержание транс-ретиная составляет по меньшей мере около 78% относительно суммарного количества ретиноидов.

10. Способ увеличения степени конверсии бета-каротина в транс-ретинол по меньшей мере на 7% относительно суммарного количества ретиноидов в клетке-хозяине, продуцирующей каротиноиды, включающий трансформацию указанной клетки-хозяина, предпочтительно грибковой клетки-хозяина, более предпочтительно клетки-хозяина, выбранной из *Yarrowia* или *Saccharomyces*, с помощью фермента по любому из пунктов 1-7.

11. Способ получения витамина А, включающий следующие стадии:

(а) введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более модифицированных ферментов ВСО по любому из пунктов 1-7, в подходящую клетку-хозяин, продуцирующую каротиноиды, в частности, в грибковую клетку-хозяин;

(b) ферментативную конверсию, а именно, стереоселективное окисление бета-каротина с получением транс-ретиная в количестве по меньшей мере около 78% относительно суммарного количества ретиноидов, под действием указанных модифицированных экспрессируемых ВСО;

(с) при необходимости, ферментативную конверсию ретиная с процентным содержанием транс-ретиная по меньшей мере около 75% в ретинол под действием ретинолдегидрогеназ;

(d) при необходимости, ферментативную конверсию, а именно, ацетилирование ретинола под действием ацетилтрансфераз; и

(е) при необходимости, ферментативную конверсию указанного ретинилацетата в витамин А в подходящих для этого условиях, известных специалисту в данной области техники.

12. Применение модифицированного фермента по любому из пунктов 1-7 в способе получения ретинилацетата в подходящей клетке-хозяине, включающем стадию конверсии бета-каротина в ретинол под действием указанного фермента и, при необходимости, дальнейшую ферментативную конверсию ретиная в ретинилацетат.

13. Применение по пункту 12, при котором процентное содержание транс-ретинилацетата составляет по меньшей мере около 78% относительно суммарного

количества ретиноидов.

14. Способ повышения транс-селективности бета-каротиноксидазы, включающий следующие стадии:

(1) выравнивание аминокислотных последовательностей различных ферментов бета-каротиноксидаз, включая, но не ограничиваясь перечисленными здесь, ферменты, происходящие из насекомых, предпочтительно из *Drosophila*, в частности, идентифицированных путем поиска с помощью программ BLAST в базах данных UNIREF/UNIPROT, которые имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, причем отобранные ферменты обладают высокой активностью образования ретиналя, а именно по меньшей мере на около 5%, в частности, по меньшей мере в 2 раза большей, чем фермент BCO из *Danio rerio*;

(2) идентификацию положений в аминокислотных последовательностях отобранных ферментов, соответствующих аминокислотным остаткам 91 и/или 499 полипептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1;

(3) введение по меньшей мере одной или двух аминокислотных замен в идентифицированные положения, соответствующие аминокислотным остаткам, выбранным из остатков в положениях 91, 499 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 и их комбинаций, в выровненных последовательностях; и

(4) отбор ферментов по активности образования транс-ретиналя в клетке-хозяине, продуцирующей каротиноиды, предпочтительно выбранной из *Yarrowia* или *Saccharomyces*, со степенью конверсии с образованием транс-ретиналя по меньшей мере около 78-100% относительно суммарного количества ретиноидов и с активностью превращения бета-каротина в ретиналь по меньшей мере около 5%.