(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 045256 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.09

(21) Номер заявки
202092781

(22) Дата подачи заявки
2019.05.21

(51) Int. Cl. ***C12P 33/02*** (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(54) ОПТИМИЗАЦИЯ С-5-ДЕСАТУРАЦИИ СТЕРОЛОВ

(31) **00629/18**
(32) **2018.05.22**
(33) **CH**
(43) **2021.02.12**
(86) **PCT/EP2019/063079**
(87) **WO 2019/224189 2019.11.28**

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

(72) Изобретатель:
Фаррелл Кристофер Марк, Лапраде Лиза Энн (US), Леманн Отто Мартин (CH), Трухарт Джошуа (US), Шеврё Бастьен Жан Вольфганг (CH)

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

(56) SUGAWARA T. ET AL. "Molecular cloning and structural analysis of human sterol C5 desaturase", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - MOLECULAR AND CELL BIOLOGY OF LI, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1533, no. 3, 31 October 2001 (2001-10-31), pages 277-284, XP004324404, ISSN: 1388-1981, DOI: 10.1016/S1388-1981(01)00160-3, the whole document

DATABASE UniProt [Online] 7 July 2009 (2009-07-07), "SubName: Full=C-5 sterol desaturase, catalyzes the introduction of a C-5(6) double bond into episterol {ECO:0000313 | EMBL:CAY68210.1};", XP002793427, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:C4QY87 Database accession no. C4QY87 100% identical to SEQ ID NO:2; sequence

US-A1-2010305341

US-B2-7608421

(57) 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 С-5-стеролдесатуразы, и их применение в способе получения витамина D3 или его производных и/или метаболитов.

045256 B1

045256 B1

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-5-стеролдесатуразы, 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 HyD), который является основной циркулирующей формой витамина D3. Дальнейшее гидроксилирование происходит в почках.

Для промышленного производства витамина D3 доступен (в принципе) как химический, так и биотехнологический синтез. Химический синтез начинается с холестерина, выделенного, напр., 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 стериловых 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 стериловых эфиров), запускается под действием нескольких белков (ферментов), включая действие стерол-ацилтрансфераз.

Вследствие неспецифического действия данных ферментов - стерол-ацилтрансфераз пул стериловых эфиров, который хранится в липидных тельцах, относительно разнообразен, включая, без ограничения, напр., 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-7-енолу и/или латостеролу, можно сместить в сторону 7-DHC посредством модификации активности C-5-стеролдесатуразы в клетках хозяина, т.е. экспрессии гетерологичных ферментов, обладающих активностью C-5-стеролдесатуразы, 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 C-5-стеролдесатуразы, в способе получения 7-DHC, причем такие полипептиды по меньшей мере на 45%, как-то, напр., по меньшей мере на 50, 52, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 и вплоть до 100% идентичны SEQ ID NO: 2, и экспрессируются (гетерологически) в подходящих клетках хозяина для получения 7-DHC, причем соотношение 7-DHC к побочным продуктам, включая ланостерин и/или латостерол, повышается по меньшей мере на 5% по сравнению с немодифицированными клетками хозяина.

Полипептид по SEQ ID NO: 2, проявляющий активность C-5-стеролдесатуразы, в том числе полинуклеотиды, кодирующие данный полипептид, был выделен из Pichia pastoris.

Термины "C-5-стеролдесатураза", "фермент, обладающий активностью C-5-стеролдесатуразы", "десатураза" или "гомолог ERG3" 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. Определенные здесь ферменты являются гомологами ERG3 Saccharomyces cerevisiae (SEQ ID NO: 8), включая полинуклеотиды, кодирующие такой полипептид.

Термины "превращение", "ферментативное превращение" или "десатурация" в связи с ферментативным катализом, напр., холеста-7-енола в 7-DHC и/или холеста-7,24-диенола в холеста-5,7,24-триенол применяются здесь взаимозаменяемо и относятся к действию C-5-стеролдесатуразы, как определено здесь и известно в данной области.

Десатураза может применяться в выделенном виде (напр., 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 десатуразы, как определено здесь, что ведет к повышению выхода 7-DHC и/или улучшению доли 7-DHC по сравнению с холеста-7-енолом и/или ланостеролом, причем такие клетки хозяина именуются здесь генетически модифицированными клетками хозяина.

Генетически немодифицированными или немодифицированными клетками хозяина именуются здесь соответствующие клетки хозяина, несущие только эндогенную активность С-5-стеролдесатуразы, экспрессируемой эндогенным геном ERG3.

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-8-енол, 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, холеста-8-енол, 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, напр., 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 или U. maydis, наиболее предпочтительно из Pichia pastoris.

В предпочтительном воплощении фермент, обладающий активностью С-5-стеролдесатуразы, получают из Pichia, в частности Pichia pastoris, напр., типа белка, кодируемого полинуклеотидом по SEQ ID NO: 1, более предпочтительно таким белком является полипептид по SEQ ID NO: 2.

В другом воплощении фермент, обладающий активностью С-5-стеролдесатуразы, получают из Penicillium, в частности Penicillium roqueforti, напр., типа белка, кодируемого полинуклеотидом по SEQ ID NO: 3, более предпочтительно таким белком является полипептид по SEQ ID NO: 4.

В следующем воплощении фермент, обладающий активностью С-5-стеролдесатуразы, получают из Schizosaccharomyces, в частности Schizosaccharomyces pombe, напр., типа белка, кодируемого полинуклеотидом по SEQ ID NO: 5, более предпочтительно таким белком является полипептид по SEQ ID NO: 6.

В другом воплощении фермент, обладающий активностью С-5-стеролдесатуразы, получают из Saccharomyces, в частности Saccharomyces cerevisiae, напр., типа белка, кодируемого полинуклеотидом по SEQ ID NO: 7, более предпочтительно таким белком является полипептид по SEQ ID NO: 8, который происходит из UniProtKB P32352, причем такой фермент экспрессируется дополнительно и/или в качестве замены эндогенной ERG3 при использовании S. cerevisiae в качестве хозяина.

Исходя из приведенных здесь последовательностей и из улучшения накопления 7-DHC и/или снижения холеста-7-енола и/или латостерола в смеси стеролов, т.е. получения по меньшей мере 84%, как-то, напр., 85, 90, 92, 95, 97 или даже 100% 7-DHC в смеси стеролов, можно легко вывести дополнительные подходящие гены, кодирующие полипептиды, обладающие активностью С-5-стеролдесатуразы, как определено здесь, которые могут применяться для С-5-десатурации стеролов, как определено здесь, в частности, холеста-7-енола и холеста-7,24-диенола. Так, настоящее изобретение направлено на способ идентификации новых десатураз, в котором в качестве зонда в процессе скрининга новых С-5-стеролдесатураз используется полипептид, который по меньшей мере на 44%, как-то, напр., по меньшей мере на 48, 50, 52, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 и вплоть до 100% идентичен полипептиду по SEQ ID NO: 8, с предпочтением на продукцию 7-DHC перед холеста-7-енолом и/или латостеролом, получая по меньшей мере 84% 7-DHC в смеси стеролов, вырабатываемых подходящим штаммом хозяина. Для получения 7-DHC может использоваться любой полипептид, обладающий активностью С-5-стеролдесатуразы и описанный здесь, если только действие десатуразы дает по меньшей мере 84% 7-DHC в смеси стеролов, исходя из общего количества вырабатываемых стеролов, и/или повышение соотношения 7-DHC к холеста-7-енолу и/или латостеролу.

Настоящее изобретение, в частности, направлено на применение таких новых ферментов-десатураз, в особенности гетерологичных ферментов, в способе получения 7-DHC, причем под действием таких десатураз, как определено здесь, содержание побочных продуктов в смеси стеролов, включая холеста-7-енол, зимостерол, холеста-8-енол или латостерол, снижается до 16% и менее, как-то до 15, 12, 10, 8, 5, 3% и менее в пересчете на общее количество стеролов, при этом предпочтительно снижается содержание холеста-7-енола и/или латостерола относительно содержания 7-DHC. Способ может выполняться с подходящими вырабатывающими холестерин дрожжевыми клетками, экспрессирующими такие гетерологичные десатуразы, при этом предпочтительно гены, кодирующие данные ферменты, экспрессируются гетерологически, т.е. вводятся в данные клетки хозяина. 7-DHC может затем превращаться в витамин D3 под действием (известных) подходящих химических или биотехнологических механизмов. При повышении количества копий гомологов ERG3 до более 1 при экспрессии в клетках хозяина можно еще больше уменьшить содержание побочных продуктов.

Термины "идентичность последовательностей", "% идентичности" применяются здесь взаимозаме-

няемо. 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, напр., как ферменты процессинга хлоропластов (CPE).

Ферменты/гомологи ERG3, 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 C-5-десатурацию стеролов, давая содержание 7-DHC не менее 84% (со снижением холеста-7-енола и/или латостерола 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 C-5-десатурации 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 ERG3 представлены, напр., 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, напр., дрожжевые клетки, вырабатывающие холестерин, выбирают из Saccharomyces, как-то, напр., Saccharomyces cerevisiae, причем одну, две или несколько копий полинуклеотидов, кодирующих ферменты ERG3, как определено здесь, выбирают из полинуклеотидов, которые по меньшей мере на 53%, как-то, напр., на 58, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 и вплоть до 100% идентичны SEQ ID NO: 9, включая, напр., полипептиды по SEQ ID NO: 9, 10 или 11.

Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению могут содержать и только часть или фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, предусмотренной настоящим изобретением, такой, к примеру, как последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 10 или 11, к примеру, фрагмент, который можно использовать в качестве зонда или праймера либо фрагмент, кодирующий часть гомолога ERG3, как определено здесь. Зонды /праймеры обычно содержат 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 после-

довательности по SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 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 мМ NaCl, 15 мМ 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 C-5-стеролдесатуразы, как определено здесь, в способе получения 7-DHC, промежуточного соединения для витамина D3. Предпочтительно модифицированные ферменты по настоящему изобретению вводятся и/или экспрессируются в подходящих клетках хозяина типа дрожжевых, в частности, в дрожжевых клетках, вырабатывающих холестерин, как-то выбранных из Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces spp., Pichia spp., Klyuveromyces spp., Hansenula spp. или Yarrowia lipolytica, предпочтительно S. cerevisiae. Модифицированный хозяин используется для получения 7-DHC, 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-DHC, 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 C-5-стеролдесатуразы, в которых также инактивированы ERG5 и ERG6. Дрожжевые клетки могут подвергаться дополнительной модификации посредством экспрессии гетерологичного фермента, обладающего активностью C24-редуктазы, в особенности из числа EC 1.3.1.72, типа гетерологичной C24-редуктазы, действующей на холеста-7,24-диенол, зимостерол или триенол (напр., холеста-5,7,25-триенол), предпочтительно растительной или Δ24-стеролредуктазы 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 Δ24-стеролредуктаза выбрана из Danio rerio, крысы или человека. Последовательности, экспрессирующие данные ферменты Δ24-стеролредуктазы, являются общедоступными, включая, без ограничения, ссылки Q15392, Q60HC5, Q8VCH6, Q5BQE6, Q39085 или P93472 из UniProtKB/Swiss-Prot (напр., 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, напр., как C8-стеролизомераза (ERG2), что ведет к повышению специфичности и/или продуктивности по 7-DHC со снижением накопления побочных продуктов или промежуточных соединений витамина D3, в том числе, без ограничения, зимостерола, ланостерола и/или латостерола. Предпочтительно модифицированные клетки хозяина, как определено здесь, содержат гетерологичную ERG2, причем ERG2 предпочтительно выбрана из Ustilago maydis (напр., типа полипептида, происходящего из UniProtKB P32360).

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, содержащей одну или несколько аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам, выбранным из 592 и/или 595 в полипептиде по SEQ ID NO: 12.

Так, настоящее изобретение в одном конкретном воплощении касается модифицированных штаммов дрожжей для применения в способе получения стеролов, в частности 7-DHC, у которых инактивированы ERG5 и ERG6 и необязательно экспрессируется гетерологичный фермент, обладающий активностью C24-редуктазы, как определено здесь, и экспрессируется гомолог ERG3, как определено здесь. При использовании таких штаммов дрожжей содержание 7-DHC в смеси стеролов составляет 84% и более, как-то предпочтительно 85, 90, 92, 95, 97 или даже 100% от общего количества стеролов.

В одном конкретном воплощении изобретение касается способа улучшения дрожжевых клеток в отношении продукции 7-DHC, причем модифицированных дрожжевых клеток, как определено здесь, т.е. экспрессирующих гомолог ERG3, как определено здесь, напр., путем введения одной, двух или нескольких копий фермента десатуразы, как определено здесь, в частности, дрожжевых клеток, вырабатывающих холестерин, предпочтительно дрожжевых клеток, у которых инактивированы ERG5 и ERG6 и при этом необязательно экспрессируется гетерологичный фермент, обладающий активностью C24-редуктазы, как определено здесь, и/или модифицированы ARE1 и/или ARE2, как описано здесь, и/или

необязательно экспрессируются гомологи ERG2, причем дрожжевые клетки улучшаются таким образом, что доля 7-DHC в общем количестве стеролов, вырабатываемых данными клетками, повышается по меньшей мере до 84%, в частности, при этом соотношение 7-DHC к побочным продуктам, включая холеста-8-енол, повышается по меньшей мере на 2% по сравнению с немодифицированным штаммом дрожжей, как определено здесь, т.е. экспрессирующим только фермент ERG3 дикого типа (эндогенный).

В одном конкретном воплощении изобретение касается способа улучшения дрожжевых клеток в отношении продукции 7-DHC, в частности, дрожжевых клеток, вырабатывающих холестерин, как-то дрожжевых клеток, у которых инактивированы ERG5 и ERG6 и при этом необязательно экспрессируется гетерологичный фермент, обладающий активностью C24-редуктазы, как определено здесь, причем данные дрожжевые клетки экспрессируют гомолог ERG3, как определено здесь, напр., путем 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 с 81% или менее до по меньшей мере 84%, как-то, напр., 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 16% 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 16% от общего количества стеролов по сравнению с немодифицированным штаммом дрожжей, экспрессирующим только фермент ERG3 дикого типа (эндогенный).

В одном воплощении настоящее изобретение направлено на способ получения смеси стеролов, содержащей 7-DHC и смесь холеста-7-енола (латостерола) и/или ланостерола, в вырабатывающих холестерин дрожжевых клетках, причем содержание 7-DHC повышается по меньшей мере на 2%, как-то, напр., на 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40% от общего количества стеролов по сравнению с содержанием лано-/латостерола, причем данные вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки экспрессируют (гетерологичную) десатуразу, как определено здесь, т.е. полипептид, который по меньшей мере на 45%, как-то, напр., по меньшей мере на 50, 52, 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, и предпочтительно происходит из Pichia pastoris, Penicillium roqueforti, Schizosaccharomyces pombe или Saccharomyces cerevisiae, в особенности из Pichia pastoris.

В одном воплощении настоящее изобретение направлено на способ получения смеси стеролов, содержащей 7-DHC и холеста-8-енол, в вырабатывающих холестерин дрожжевых клетках, причем соотношение 7-DHC к холеста-8-енолу в общем количестве стеролов повышается по меньшей мере на 2%, как-то, напр., на 3, 4, 5 или по меньшей мере на 10%, причем данные вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки экспрессируют (гетерологичную) десатуразу, как определено здесь, т.е. полипептид, который по меньшей мере на 45%, как-то, напр., по меньшей мере на 50, 52, 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, и предпочтительно происходит из Pichia pastoris.

В одном воплощении настоящее изобретение направлено на способ получения смеси стеролов, содержащей 7-DHC и зимостерол, в вырабатывающих холестерин дрожжевых клетках, причем содержание 7-DHC повышается по меньшей мере на 2%, как-то, напр., на 3, 4, 5 или по меньшей мере на 10% от общего количества стеролов по сравнению с содержанием зимостерола, причем данные вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки экспрессируют (гетерологичную) десатуразу, как определено здесь, т.е. полипептид, который по меньшей мере на 45%, как-то, напр., по меньшей мере на 50, 52, 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, и предпочтительно происходит из Pichia pastoris.

В одном конкретном воплощении настоящее изобретение направлено на способ получения смеси стеролов, содержащей 7-DHC, зимостерол, холеста-8-енол, ланостерол и/или латостерол, в вырабатывающих холестерин дрожжевых клетках, причем содержание 7-DHC в смеси стеролов повышается по меньшей мере на 2%, как-то, напр., на 4, 5, 7, 10, 15% или больше по сравнению с содержанием данных побочных продуктов, причем данные вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки экспрессируют гетерологичную десатуразу, как определено здесь, т.е. полипептид, который по меньшей мере на 45%, как-то, напр., по меньшей мере на 50, 52, 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, и предпочтительно происходит из Pichia pastoris.

В настоящем изобретении повышение содержания 7-DHC в смеси стеролов определяется как количество 7-DHC, вырабатываемое клетками хозяина, экспрессирующими гетерологичный полипептид, обладающий десатуразной активностью, как определено здесь, по сравнению с клетками хозяина, экспрессирующими только эндогенную C-5-стеролдесатуразу, такую, напр., как ERG3. При использовании таких клеток хозяина, напр., дрожжевых, в частности, дрожжевых клеток, вырабатывающих холестерин, в способе получения стеролов содержание 7-DHC может повышаться по меньшей мере до 84% от общего количества стеролов, вырабатываемых данными клетками хозяина. В настоящем изобретении "экспрессия

гомолога ERG3" включает экспрессию дополнительных копий эндогенных полипептидов ERG3, т.е. экспрессию двух или нескольких копий ERG3, включая дополнительные копии эндогенной ERG3.

В одном конкретном воплощении 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 16% или менее от общего количества стеролов, что ведет к повышению доли 7-DHC в смеси стеролов.

Модифицированные клетки хозяина, которые способны экспрессировать гомологи ERG3, 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, напр., в WO 2011/067144 или WO 2017/108799.

При использовании клеток хозяина, как описано здесь, можно смещать продуктивность/специфичность активности C-5-стеролдесатуразы в сторону 7-DHC, получая содержание 7-DHC в общем объеме стеролов, вырабатываемых данными клетками хозяина, по меньшей мере 84%, 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, ERG3, ARE1, ARE2 или Δ24-стеролредуктазу (ERG4), культивирование и генная инженерия дрожжевых клеток, которые используются здесь, известны и описаны, напр., в US 7608421.

В настоящем изобретении термины "C-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 "C-8-стеролизомераза", "фермент, обладающий активностью C-8-стеролизомеразы" применяются здесь взаимозаменяемо и относятся к ферментам, которые способны катализировать превращение холеста-8-енола в холеста-7-енол и/или зимостерола в холеста-7,24-диенол. У дрожжей этот фермент кодируется erg2. Предпочтительным гомологом ERG2 для применения в модифицированных клетках хозяина по настоящему изобретению является полипептид, который по меньшей мере на 41%, как-то, напр., 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: 14 и проявляет активность C-8-стеролизомеразы, который может кодироваться полинуклеотидом по SEQ ID NO: 15, полученным из Ustilago maydis. Предпочтительно в модифицированных клетках хозяина экспрессируется 1 или несколько копий типа по меньшей мере 1, 2, 3, 5 копий данного гомолога ERG2, как определено здесь.

В настоящем изобретении термин "удельная активность" или "активность" в отношении ферментов означает их каталитическую активность, т.е. 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 мин на 1 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, т.е. внутри клеток хозяина, как определено здесь, или в подходящей (бесклеточной) системе в присутствии подходящего субстрата. Специалистам известно, как измеряется активность ферментов, как-то, напр., методом HPLC.

В настоящем изобретении подразумевается, что организмы, как-то, напр., 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, содержащие фермент, обладающий активностью C5-стеролдесатуразы, который по меньшей мере на 45%, как-то, напр., по меньшей мере на 50, 52, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 и вплоть 100% идентичен SEQ ID NO: 2 и экспрессируется (гетерологически) в подходящих клетках хозяина для получения 7-DHC, причем соотношение 7-DHC к побочным продуктам,

включая ланостерол и/или латостерол, повышается по меньшей мере на 5% по сравнению с немодифицированными клетками хозяина.

2. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как указано выше, содержащие фермент, обладающий активностью C5-стеролдесатуразы, при этом данные дрожжевые клетки вырабатывают смесь стеролов, содержащую по меньшей мере 84% 7-дегидрохолестерина (7-DHC), предпочтительно содержащую по меньшей мере 85, 88, 90, 92, 95, 97, 98 и вплоть до 100% 7-DHC от общего количества стеролов.

3. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как указано выше, при этом соотношение 7-DHC к холеста-7-енолу и/или ланостеролу составляет около 18.

4. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как указано выше, при этом соотношение 7-DHC к холеста-7-енолу и/или ланостеролу повышается по меньшей мере на 5%.

5. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как указано выше, экспрессирующие гетерологичный фермент, обладающий активностью C5-стеролдесатуразы, который по меньшей мере на 45%, как-то, напр., по меньшей мере на 50, 52, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 и вплоть до 100% идентичен SEQ ID NO: 2.

6. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как указано выше, экспрессирующие гетерологичный фермент, обладающий активностью C5-стеролдесатуразы, 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, Metarhizium и Ustilago типа Ustilago maydis.

7. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как указано выше, в которых инактивированы ERG5 и ERG6.

8. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как указано выше, при этом дрожжевые клетки экспрессируют гетерологичный фермент из числа EC 1.3.1.72, обладающий активностью Δ24-стеролредуктазы, причем предпочтительно гетерологичный фермент происходит из растения или позвоночного, более предпочтительно из человека, свиньи, собаки, мыши, крысы, лошади или Danio rerio.

9. Вырабатывающие холестерин дрожжевые клетки, как указано выше, при этом дрожжевые клетки экспрессируют гетерологичный фермент, обладающий активностью C8-изомеразы, причем предпочтительно гетерологичный фермент происходит из Ustilago maydis, более предпочтительно из полипептида, который по меньшей мере на 42%, как-то, напр., 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: 14.

10. Применение вырабатывающих холестерин дрожжевых клеток, как указано выше, для получения стеролов, предпочтительно для получения предшественников витамина D3, более предпочтительно для получения 7-DHC.

11. Применение вырабатывающих холестерин дрожжевых клеток, как указано выше, при этом 7-DHC дополнительно превращается в витамин D3.

12. Применение, как указано выше, при этом 7-DHC дополнительно превращается в 25-гидроксивитамин D3.

13. Способ снижения количества холеста-7-енола и/или ланостерола в смеси стеролов, вырабатываемых дрожжевыми клетками, который включает экспрессирование гететерологичного фермента, обладающего активностью C5-стеролдесатуразы, 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, Metarhizium и Ustilago типа Ustilago maydis, предпочтительно из Pichia pastoris, Penicillium roqueforti, Schizosaccharomyces pombe или Saccharomyces cerevisiae.

14. Способ получения смеси стеролов, предпочтительно предшественников витамина D3, более предпочтительно смеси стеролов, содержащей по меньшей мере 84% 7-DHC, в дрожжевых клетках, включающий:

(a) инактивацию ERG5 и ERG6,

(b) экспрессирование гетерологичного фермента из числа EC 1.3.1.72, обладающего активностью Δ24-стеролредуктазы в отношении холеста-7,24-диенола, зимостерола или триенола, предпочтительно растительной или Δ24-стеролредуктазы позвоночных, более предпочтительно Δ24-стеролредуктазы позвоночных,

(c) экспрессирование гетерологичного фермента, обладающего активностью C5-стеролдесатуразы, 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, Metarhizium и Ustilago типа Ustilago maydis, предпочтительно из Pichia pastoris, Penicillium roqueforti, Schizosaccharomyces pombe или Saccharomyces cere-

visiae,

(d) культивирование данных дрожжевых клеток в условиях, подходящих для получения стеролов, причем соотношение 7-DHC к холеста-7-енолу и/или ланостеролу в смеси стеролов составляет более 17,2.

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 табл. 1 и 2. Вырабатывающий 7-DHC штамм Y2159 Saccharomyces cerevisiae конструировали, как описано в Примере 4. Все перечисленные штаммы являются штаммами MATα.

Таблица 1

Штаммы Saccharomyces cerevisiae

Y2159	*erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1 erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3 erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1*	см. пример 4
Y2346	*erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1 erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3 erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1 INT66 TDH3p-S. cerevisiae-ERG3-PGK1t-HYG^R*	целенаправленная вставка конструкции в локус INT66
Y2322	*erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1 erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3 erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1 INT66 TDH3p-P. pastoris-ERG3-PGK1t-HYG^R*	целенаправленная вставка конструкции в локус INT66
Y2316	*erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1 erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3 erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1 INT66 TDH3p-P. roqueforti-ERG3-PGK1t-HYG^R*	целенаправленная вставка конструкции в локус INT59
Y2337	*erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1 erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3 erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1 INT66 TDH3p-S. pombe-ERG3-PGK1t-HYG^R*	целенаправленная вставка конструкции в локус INT66

Таблица 2

Плазмиды, используемые для клонирования гомологов ERG3

Плазмида	**Остов**	**Вставка**	**Олиго или источник**
pMB7722	pMB7622	*ERG3 S. cerevisiae*	синтезированный фрагмент
pMB7700	pMB7622	*ERG3 P. pastoris*	синтезированный фрагмент
pMB7721	pMB7622	*ERG3 P. roqueforti*	синтезированный фрагмент
pMB7701	pMB7622	*ERG3 S. pombe*	синтезированный фрагмент

Пример 2. Клонирование различных гомологов ERG3 в S. cerevisiae Y2159

Все кассеты ERG3 конструировали следующим образом. Открытые рамки считывания оптимизировали по кодонам на основе выведенной аминокислотной последовательности и синтезировали с 5'-сайтом BamHI (GGATCCatg...) и 3'-сайтом EcoRI. Их клонировали путем вставки фрагментов ERG3, расщепленных BamHI-EcoRI, в расщепленную BamHI-EcoRI плазмиду pMB7621, что позволяет встраиваться в межгенный локус INT66 на правом плече хромосомы XIII между генами RKR1 и GAD1 (примерно в положении 769000).

Помимо ERG3 S. cerevisiae (SEQ ID NO: 7; плазмида pMB7677), синтезированные гены включают гомологи ERG3 (оптимизированные по кодонам) из Pichia pastoris (SEQ ID NO: 9; плазмида pMB7732), Penicillium roqueforti (SEQ ID NO: 10; плазмида pMB7721) и Schizosaccharomyces pombe (SEQ ID NO: 11; плазмида pMB7681), см. перечень последовательностей.

Для проверки влияния различных генов ERG3 на продукцию 7-DHC штамм Y2159 трансформировали четырьмя различными расщепленными SfiI фрагментами, представляющими один из четырех видов, описанных выше, в локусе INT66, используя устойчивость к гигромицину (Hyg^R) в качестве отборочного маркера и сильный конститутивный промотор TDH3 в качестве контролирующего элемента.

Отбирали трансформанты на YPD-агаре с 200 мг/л гигромицина через 3 дня при 30°C. Штаммы, полученные из этих трансформантов, приведены выше в табл. 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 высеивали на агар с YPD и инкубировали 48 ч при 30°C. Из этих чашек инокулировали предварительные культуры в 2 мл YPD и инкубировали на круговой качалке в течение 24 ч 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 ч после инокуляции в каждую лунку добавляли 16 мкл этанола в качестве подпитки. Через 72 ч 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% KOH в этаноле), помещали образцы в гомогенизатор Precellys 24 и перемешивали при 6500 об/мин за 3 цикла по 15 с 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 табл. 3, 4 и 5.

Таблица 3

Соотношение 7-DHC к зимостеролу в контроле и в штаммах, несущих гомологи ERG3

Штамм	**Соотношение 7-DHC к зимостеролу**
SC2159 – исходный	18,1
P. pastoris ERG3	18,8

Таблица 4

Соотношение 7-DHC к холеста-8-енолу в контроле и в штаммах, несущих гомологи ERG3

Штамм	**Соотношение 7-DHC к холеста-8-енолу**
SC2159 – исходный	11,7
P. pastoris ERG3	12,1

Таблица 5

Соотношение 7-DHC к смеси ланостерола и латостерола в контроле и в штаммах, несущих гомологи ERG3

Штамм	**Соотношение 7-DHC к ланостеролу/латостеролу**
SC2159 – исходный	17,2
P. pastoris ERG3	22,9
P. roqueforti ERG3	19,8
S. pombe ERG3	18,1

Пример 4. Конструирование Y2159

ARE1 дикого типа (WT) S. cerevisiae синтезировали с помощью DNA2.0, включая сайт XbaI на 5'-конце (TCTAGAACAAAatg...) 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 Hyg^R 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 табл. 6.

Таблица 6

Плазмиды, используемые для конструирования мутаций ARE. "Scer" означает Saccharomyces cerevisiae

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вырабатывающая холестерин дрожжевая клетка, экспрессирующая гетерологичный фермент, обладающий активностью C5-стеролдесатуразы, который по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 2, 4, 6 или 8, где дрожжевая клетка способна продуцировать 7-дегидрохолестерин (7-DHC) и где соотношение 7-DHC к побочным продуктам, включая ланостерол и латостерол, повышается по меньшей мере на 5% по сравнению с дрожжевой клеткой, которая не экспрессирует гетерологичную C5-стеролдесатуразу.

2. Вырабатывающая холестерин дрожжевая клетка по п.1, вырабатывающая смесь стеролов, содержащую по меньшей мере 84% 7-DHC от общего количества стеролов.

3. Вырабатывающая холестерин дрожжевая клетка по п.1 или 2, где соотношение 7-DHC к холеста-7-енолу и/или ланостеролу составляет 18 или более по сравнению с контролем.

4. Вырабатывающая холестерин дрожжевая клетка по п.1 или 2, где соотношение 7-DHC к холеста-7-енолу и/или ланостеролу повышается по меньшей мере на 5% по сравнению с контролем.

5. Вырабатывающая холестерин дрожжевая клетка по любому из пп.1-4, где гетерологичная C5-стеролдесатураза получена из Pichia pastoris, Penicillium roqueforti, Schizosaccharomyces pombe или Saccharomyces cerevisiae.

6. Вырабатывающая холестерин дрожжевая клетка по любому из пп.1-5, дополнительно включающая инактивацию эндогенных генов, кодирующих ERG5 и ERG6.

7. Вырабатывающая холестерин дрожжевая клетка по любому из пп.1-6, дополнительно экспрессирующая гетерологичную Δ24-стеролредуктазу позвоночных.

8. Вырабатывающая холестерин дрожжевая клетка по любому из пп.1-7, дополнительно экспрессирующая гетерологичный фермент, обладающий активностью C8-изомеразы, которая по меньшей мере на 80% идентична полипептиду по SEQ ID NO: 14.

9. Способ снижения количества холеста-7-енола и/или ланостерола в смеси стеролов, вырабатываемых дрожжевой клеткой, включающий культивирование дрожжевой клетки по любому из пп.1-8 в подходящих условиях культивирования.

10. Способ получения смеси стеролов, содержащей по меньшей мере 84% 7-DHC, включающий культивирование дрожжевой клетки по любому из пп.1-8 в условиях, подходящих для получения стеролов, где соотношение 7-DHC к холеста-7-енолу и/или ланостеролу в смеси стеролов составляет более 17,2.

11. Способ по п.10, где 7-DHC дополнительно превращается в витамин D3.

12. Способ по п.10 или 11, где 7-DHC и/или витамин D3 дополнительно превращаются в C25-гидроксилированные производные.

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2