

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045290**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.14

(21) Номер заявки
202092792

(22) Дата подачи заявки
2019.05.21

(51) Int. Cl. **C12N 9/10** (2006.01)
C12P 33/00 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СТЕРОЛ-АЦИЛТРАНСФЕРАЗЫ

(31) **00628/18**

(32) **2018.05.22**

(33) **CH**

(43) **2021.04.02**

(86) **PCT/EP2019/063078**

(87) **WO 2019/224188 2019.11.28**

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

(72) Изобретатель:
**Леманн Отто Мартин (CH), Пихлер
Гаральд, Штольтерфот Холли (AT)**

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

(56) YU C ET AL.: "Molecular cloning and characterization of two isoforms of Saccharomyces cerevisiae Acyl-CoA: Sterol Acyltransferase", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 271, no. 39, 27 September 1996 (1996-09-27), pages 24157-24163, XP002094336, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.271.39.24157 abstract page 24157, right-hand column, paragraph 3 page 24160; figure 3

WO-A1-2017108799

DAGMAR ZWEYTICK ET AL.: "Contribution of Are1p and Are2p to sterol ester synthesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 267, no. 4, 1 February 2000 (2000-02-01), pages 1075-1082, XP055059359, ISSN: 0014-2956, DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01103.x, the whole document

WRIESSNEGGER TAMARA ET AL.: "Yeast metabolic engineering - Targeting sterol metabolism and terpenoid forma", PROGRESS IN LIPID RESEARCH, PERGAMON PRESS PARIS, FR vol. 52, no. 3, 6 April 2013 (2013-04-06), pages 277-293, XP028553555, ISSN: 0163-7827, DOI: 10.1016/J.PLIPRES.2013.03.001, the whole document

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

B1

045290

045290

B1

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

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

Для промышленного производства витамина D₃ доступен (в принципе) как химический, так и биотехнологический синтез. Химический синтез начинается с холестерина, выделенного, например, из шёрстного жира, который дегидрогенизируется до 7-DHC, важного промежуточного продукта как при химическом, так и биотехнологическом синтезе. Под воздействием УФ-излучения и дополнительных стадий очистки/экстракции 7-DHC превращается в витамин D₃. Для биосинтеза 7-DHC можно использовать модифицированные штаммы дрожжей, в которых ацетил-СоА 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 стероловых 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 стероловых эфиров), запускается под действием нескольких белков (ферментов), включая действие стерол-ацилтрансфераз. У дрожжей, особенно у *Saccharomyces cerevisiae*, образование сложных эфиров стеролов в основном осуществляется двумя стерол-ацилтрансферазами: Are1p и Are2p.

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

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

Неожиданно оказалось, что специфичность и/или активность ферментов стерол-ацилтрансфераз в клетках хозяина можно сместить посредством введения определенных аминокислотных замен в последовательность ARE2 и/или ARE1, что приведет к повышению продуктивности клеток хозяина в отношении 7-DHC как важного промежуточного продукта при получении витамина D₃.

Итак, настоящее изобретение направлено на модифицированные ферменты со стерол-ацилтрансферазной активностью, т.е. модифицированные стерол-ацилтрансферазы, в частности, на изоформы стерол-ацилтрансферазы Are1p и/или Are2p, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам, выбранным из группы, состоящей из 11, 281, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 626, 627, 636 и их комбинаций в полипептиде по SEQ ID NO: 1, причем данные модифицированные ферменты обладают большей специфичностью к 7-DHC, чем к побочным/промежуточным продуктам, включая зимостерол, и/или повышенной активностью в отношении образования сложных эфиров, включая эфиры 7-DHC.

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

Термины "стерол-ацилтрансфераза", "ацилтрансфераза", "ARE", "фермент, обладающий ацилтрансферазной активностью" или просто "фермент" применяются здесь взаимозаменяемо и относятся к ферментам EC 2.3.1.26, то есть к ацилтрансферазам, переносящим жирноацильные группы из одной молекулы к другой. Такой перенос или ферментативную активность можно измерить известными специа-

листам способами. Стерол-ацилтрансферазы были выделены из различных источников, в том числе из млекопитающих, дрожжей или растений. ARE1 и ARE2 способны ацилировать такие стеролы, например, как зимостерол и/или 7-DHC, в соответствующие сложные эфиры. В настоящем изобретении "модифицированный" фермент, то есть модифицированная ацилтрансфераза, обладает предпочтительной активностью и/или специфичностью в отношении эстерификации 7-DHC по сравнению с эстерификацией, например, зимостерола, и/или лучшим образованием сложных эфиров стеролов вообще, включая, например, 7-DHC или зимостерол. Предпочтительными изоформами ацилтрансферазы являются Are2p или Are1p. "Немодифицированная" стерол-ацилтрансфераза, в частности ARE1 и ARE2, в настоящем изобретении означает соответствующий эндогенный фермент, не несущий одну или несколько аминокислотных замен, как определено здесь.

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

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

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

В частности, модификации соответствуют модифицированной активности стерол-ацилтрансферазы 2 и/или 1, т.е. активности ARE2 и/или ARE1, содержащих аминокислотные замены, причем предпочтительно по меньшей мере одна аминокислотная замена соответствует остатку в положении, выбранном из группы, состоящей из 11, 281, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 626, 627, 636 и их комбинаций в полипептиде по SEQ ID NO: 1, что соответствует замене аминокислоты E11 и/или L281 и/или D366 и/или I442 и/или H551 и/или H554 и/или F572 и/или F624 и/или L626 и/или G627 и/или C636. Более предпочтительно модификация соответствует модифицированному ферменту ARE2, еще более предпочтительно модифицированному полипептиду по SEQ ID NO: 1, в который была введена по меньшей мере одна аминокислотная замена в положении, выбранном из группы, состоящей из 11, 281, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 626, 627, 636 и их комбинаций. Предпочтительно фермент с модифицированной активностью ARE2 и/или ARE1 происходит из *Saccharomyces* типа *S. cerevisiae*.

В одном воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2 и/или ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 11 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену глутаминовой кислоты на глицин (E11G). Данная аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку E11G в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами, как определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 281, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 626, 627 и/или 636 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, как описано здесь. Предпочтительно аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку E11G в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами типа аминокислотных замен в положениях, соответствующих F624L, G627D, D366V, C636S и/или I442V в SEQ ID NO: 1, причем более предпочтительны комбинации замен, соответствующие остаткам E11G-F624L, E11G-G627D, E11G-D366V-C636S, E11G-D366V-G627D-C636S, E11G-D366V-F624L-C636S, E11G-D366V-I442V-F624L-C636S или E11G-D366V-I442V-G627D-C636S в SEQ ID NO: 1, а наиболее предпочтительны комбинации из числа E11G-D366V-C636S, E11G-D366V-G627D-C636S, E11G-D366V-F624L-C636S, E11G-D366V-I442V-G627D-C636S или E11G-D366V-I442V-F624L-C636S. При использовании вырабатывающих холестерин дрожжей, несущих такие модифицированные ферменты, в частности ферменты по SEQ ID NO: 1, содержащие одну из указанных аминокислотных замен, специфичность фермента может повышаться в пределах по меньшей мере от 3 до 5 раз по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2 и/или ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 281 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену лейцина на изолейцин (L281I). Данная аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку L281I в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами, как определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 626, 627 и/или 636 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, как описано здесь. При использовании вырабатывающих холестерин дрожжей, несущих такие модифицированные ферменты, в частности ферменты по SEQ ID NO:

1, содержащие одну из указанных аминокислотных замен, выработка сложных эфиров может повышаться по меньшей мере в 1,5 раза по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2 и/или ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 366 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену аспарагиновой кислоты на валин (D366V). Данная аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку D366V в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами, как определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 281, 442, 551, 554, 572, 624, 626, 627 и/или 636 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, как описано здесь. При использовании вырабатывающих холестерин дрожжей, несущих такие модифицированные ферменты, в частности ферменты по SEQ ID NO: 1, содержащие одну из указанных аминокислотных замен, специфичность фермента может повышаться по меньшей мере в 3 раза по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

В другом воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2 и/или ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 442 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену изолейцина на валин (I442V). Данная аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку I442V в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами, как определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 281, 366, 551, 554, 572, 624, 626, 627 и/или 636 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, как описано здесь. Предпочтительно аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку I442V в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами типа аминокислотных замен в положениях, соответствующих F624L, L626F и/или G627D в SEQ ID NO: 1, причем более предпочтительны комбинации замен, соответствующие остаткам I442V-L626F, I442V-G627D, I442V-F624L-L626F или I442V-L626F-G627D в SEQ ID NO: 1, а наиболее предпочтительны комбинации из числа I442V-G627D, I442V-F624L-L626F или I442V-L626F-G627D. При использовании вырабатывающих холестерин дрожжей, несущих такие модифицированные ферменты, в частности ферменты по SEQ ID NO: 1, содержащие одну из указанных аминокислотных замен, специфичность фермента может повышаться в пределах по меньшей мере от 2,2 до 4,5 раз по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

В следующем воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2 и/или ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 551 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену гистидина на тирозин (H551Y). Данная аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку H551Y в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами, как определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 281, 366, 442, 554, 572, 624, 626, 627 и/или 636 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, как описано здесь. При использовании вырабатывающих холестерин дрожжей, несущих такие модифицированные ферменты, в частности ферменты по SEQ ID NO: 1, содержащие одну из указанных аминокислотных замен, специфичность фермента может повышаться по меньшей мере в 1,7 раз по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2 и/или ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 554 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену гистидина на глутамин (H554Q). Данная аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку H554Q в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами, как определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 281, 366, 442, 551, 572, 624, 626, 627 и/или 636 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, как описано здесь. Предпочтительно аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку H554Q в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами типа аминокислотных замен в положениях, соответствующих F624L, F572L и/или G627D в SEQ ID NO: 1, причем более предпочтительны комбинации замен, соответствующие остаткам H554Q-F572L-F624L или H554Q-F572L-G627D в SEQ ID NO: 1. При использовании вырабатывающих холестерин дрожжей, несущих такие модифицированные ферменты, в частности ферменты по SEQ ID NO: 1, содержащие одну из указанных аминокислотных замен, специфичность фермента может повышаться в пределах по меньшей мере от 1,4 до 12 раз по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

В другом воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2 и/или ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 572 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену фенилаланина на лейцин (F572L). Данная аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку F572L в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами, как определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 281, 366, 442, 551, 554, 624, 626, 627 и/или 636 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, как описано здесь. При использовании вырабатывающих холестерин дрожжей, несущих такие модифицированные ферменты, в частности ферменты по SEQ ID NO:

1, содержащие одну из указанных аминокислотных замен, специфичность фермента может повышаться по меньшей мере в 1,7 раз по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2 и/или ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 624 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену фенилаланина на лейцин (F624L), которая соответствует замене F592L в полипептиде по SEQ ID NO: 3. Данная аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку F624L в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами, как определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 281, 366, 442, 551, 554, 572, 626, 627 и/или 636 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, как описано здесь. При использовании вырабатывающих холестерин дрожжей, несущих такие модифицированные ферменты, в частности ферменты по SEQ ID NO: 1, содержащие одну из указанных аминокислотных замен, специфичность фермента может повышаться по меньшей мере в 3,1 раза по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2 и/или ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 626 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену лейцина на фенилаланин (L626F). Данная аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку L626F в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами, как определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 281, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 627 и/или 636 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, как описано здесь. При использовании вырабатывающих холестерин дрожжей, несущих такие модифицированные ферменты, в частности ферменты по SEQ ID NO: 1, содержащие одну из указанных аминокислотных замен, специфичность фермента может повышаться по меньшей мере в 2,2 раза по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2 и/или ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 627 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену глицина на аспарагиновую кислоту (G627D), которая соответствует замене G595D в полипептиде по SEQ ID NO: 3. Данная аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку G627D в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами, как определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 281, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 626 и/или 636 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, как описано здесь. При использовании вырабатывающих холестерин дрожжей, несущих такие модифицированные ферменты, в частности ферменты по SEQ ID NO: 1, содержащие одну из указанных аминокислотных замен, специфичность фермента может повышаться по меньшей мере в 2,2 раза по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

В одном воплощении модифицированный фермент, как определено здесь, в частности, модифицированный фермент ARE2 и/или ARE1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 636 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно замену цистеина на серин (C636S). Данная аминокислотная замена в положении, соответствующем остатку C636S в SEQ ID NO: 1, может комбинироваться с другими заменами, как определено здесь, т.е. заменами в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 281, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 626 и/или 627 в полипептиде по SEQ ID NO: 1, как описано здесь. При использовании вырабатывающих холестерин дрожжей, несущих такие модифицированные ферменты, в частности ферменты по SEQ ID NO: 1, содержащие одну из указанных аминокислотных замен, специфичность фермента может повышаться по меньшей мере в 3 раза по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

Модифицированная стерол-ацилтрансфераза по настоящему изобретению, как-то, например, ARE2 и/или ARE1, предпочтительно содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, соответствующем F624L в полипептиде по SEQ ID NO: 1, что ведет к повышению специфичности фермента примерно в 4 раза. Она может повышаться и больше при введении еще одной или нескольких других аминокислотных замен, например, аминокислотной замены в положении, соответствующем F572L и/или H554Q, что ведет к повышению специфичности фермента более чем в 12 раз по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

Модифицированная стерол-ацилтрансфераза по настоящему изобретению, как-то, например, ARE2 и/или ARE1, предпочтительно содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, соответствующем G627D в полипептиде по SEQ ID NO: 1, что ведет к повышению специфичности фермента более чем в 4 раза. Она может повышаться и больше при введении еще одной или нескольких других аминокислотных замен, например, аминокислотной замены в положении, соответствующем F572L и/или H554Q, что ведет к повышению специфичности фермента примерно в 5 раз по сравнению с немодифицированными дрожжами, как определено здесь.

В настоящем изобретении активность ARE2 и/или ARE1 подвергается модификации. Это осуществляется, например, путем введения мутаций в эндогенный ген, кодирующий ARE2 и/или ARE1, то есть аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, как описано здесь. Специалистам известно, как проводятся генетические манипуляции дрожжевых клеток, приводящие к модификации активности

ARE2 и/или ARE1. Эти генетические манипуляции включают, без ограничения, например, замену генов, амплификацию генов, разрушение генов, трансфекцию, трансформацию с помощью плазмид, вирусов или других векторов.

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

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

Подходящие клетки хозяина могут подвергаться дополнительным модификациям для дальнейшего повышения продукции 7-DHC, важного промежуточного продукта для биосинтеза витамина D3, и/или для снижения накопления побочных продуктов.

Так, в одном воплощении изобретение направлено на штаммы дрожжей с модифицированной активностью ARE2 и/или ARE1, 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 (например, холеста-5,7,25-триенол), предпочтительно растительной или Δ 24-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 Δ 24-стеролредуктаза выбрана из *Danio rerio*, крысы или человека. Последовательности, экспрессирующие данные ферменты Δ 24-стеролредуктазы, являются общедоступными, включая, без ограничения, ссылки Q15392, Q60HC5, Q8VCH6, Q5BQE6, Q39085 или P93472 из UniProtKB/Swiss-Prot (например, см. WO 2003/064650).

В другом воплощении клетки хозяина по настоящему изобретению могут подвергаться дополнительной модификации посредством введения гомологов эндогенных ферментов, участвующих в биосинтезе 7-DHC, таких, например, как C5-стеролдесатураза (ERG3) и/или 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.

В одном конкретном воплощении изобретение касается способа улучшения клеток хозяина в отношении продукции 7-DHC, причем модифицированных клеток хозяина, как определено здесь, т.е. модифицированных путем введения одной или нескольких аминокислотных замен в стерол-ацилтрансферазы ARE2 и/или ARE1, как определено здесь, в частности, дрожжевых клеток, вырабатывающих холестерин, предпочтительно таких дрожжевых клеток, в которых инактивированы ERG5 и ERG6 и при этом обязательно экспрессируется гетерологичный фермент, обладающий активностью C24-редуктазы, как определено здесь, и/или обязательно экспрессируются гомологи эндогенных ERG2 и/или ERG3, причем клетки хозяина улучшаются таким образом, что повышается содержание 7-DHC в общем количестве стеролов, вырабатываемых данными клетками хозяина, и/или повышается активность клеток хозяина в отношении продукции стеролов по сравнению с немодифицированными клетками хозяина, как определено здесь.

В одном воплощении настоящее изобретение направлено на модифицированные стерол-ацилтрансферазы, в частности, модифицированные ARE2 и/или ARE1, содержащие по меньшей мере одну или несколько аминокислотных замен, как определено здесь, при этом специфичность фермента повышается по сравнению со специфичностью немодифицированных ферментов, что ведет к повышению соотношения 7-DHC к побочным продуктам, включая, например, зимостерол, в смеси стеролов, вырабатываемых подходящими клетками хозяина, несущими такую модифицированную стерол-ацилтрансферазу. Соотношение может повышаться по меньшей мере в 1,4 раза, как-то, например, при введении аминокислотных замен, соответствующих H554Q в соответствующей последовательности ARE2 и/или ARE1, как-то повышаться по меньшей мере в 3 раза, как-то, например, при введении аминокислотных замен, соответствующих E11G-F624L, I442V-G627D или I442V-F624L-L626F в соответствующей последовательности ARE2 и/или ARE1, как-то повышаться по меньшей мере в 4 раза, как-то, например, при введении аминокислотных замен, соответствующих F624L или G627D в соответствующей последовательности ARE2 и/или ARE1, либо по меньшей мере в 5, 10 или даже в 12 раз и более, как-то,

например, при введении аминокислотных замен, соответствующих H554Q-F572L-G627D или E11G-D366V-I442V-G627D-C636S в соответствующей последовательности ARE2 и/или ARE1.

В одном воплощении настоящее изобретение направлено на модифицированные стерол-ацилтрансферазы, в частности, модифицированные ARE2 и/или ARE1, содержащие по меньшей мере одну или несколько аминокислотных замен, как определено здесь, при этом активность фермента повышается по сравнению с активностью немодифицированных ферментов, что ведет к повышению общей продукции стеролов и/или стеридовых эфиров, включая повышение количества 7-DHC, вырабатываемого подходящими клетками хозяина, несущими такую модифицированную стерол-ацилтрансферазу. Так, общая продукция эфиров, т.е. соотношение всех сложных эфиров к свободному 7-DHC, может повышаться по меньшей мере в 1,2 раза, как-то, например, при введении аминокислотных замен, соответствующих H55Q или H554Q-F572L в соответствующей последовательности ARE2 и/или ARE1, типа повышаться по меньшей мере в 2 или 3 раза, как-то, например, при введении аминокислотных замен, соответствующих I442V-G627D или I442V-L626F-G627D в соответствующей последовательности ARE2 и/или ARE1. Общая продукция 7-DHC может повышаться по меньшей мере от 1,2 до 1,4 раз при введении одной или нескольких аминокислотных замен, как описано здесь.

При использовании модифицированных клеток хозяина, например, дрожжевых типа вырабатывающих стеролы дрожжей, в частности дрожжей, вырабатывающих холестерин, как описано здесь, содержание 7-DHC в смеси стеролов может повышаться по меньшей мере на 40%, как-то до 50, 60, 70, 80, 90% 7-DHC от общего количества стеролов.

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

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

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

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

Термины "C-8-стеролизомераза", "дельта-8,7-изомераза" или "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, например, по меньшей мере на 44, 45, 48, 49, 53, 56, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 или вплоть до 100% идентичен SEQ ID NO: 5 и проявляет активность C-8-стеролизомеразы, а полинуклеотиды, кодирующие такой полипептид, получены из *Ustilago maydis*. Предпочтительно в модифицированных клетках хозяина экспрессируется 1 или несколько копий типа по меньшей мере 1, 2, 3, 5 копий данного гомолога ERG2, как определено здесь.

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. У дрожжей этот фермент кодируется erg3. Предпочтительным го-

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

"Относительная продукция сложных эфиров" определяется здесь как соотношение

(все эфиры/свободный 7-ДНС)_{мутанта} / (все эфиры/свободный 7-ДНС)_{дикого типа (wt)}.

"Специфичность" фермента определяется здесь как соотношение (эфиры 7-ДНС/эфиры зимостерола)_{мутанта} / (эфиры 7-ДНС/эфиры зимостерола)_{wt}. "Общая продукция 7-ДНС" определяется здесь как соотношение (общий 7-ДНС)_{мутанта} / (7-ДНС)_{wt}.

В настоящем изобретении термин "удельная активность" или "активность" в отношении ферментов означает их каталитическую активность, то есть способность катализировать образование продукта из данного субстрата. Удельная активность определяется количеством потребленного субстрата и/или образовавшегося продукта за определенный период времени на определенное количество белка при определенной температуре. Как правило, удельная активность выражается в мкмольх 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*, то есть внутри клеток хозяина, как определено здесь, или в подходящей (бесклеточной) системе в присутствии подходящего субстрата. Специалистам известно, как измеряется активность ферментов, как-то, например, методом HPLC.

В настоящем изобретении подразумевается, что организмы, как-то, например, микроорганизмы, грибы, водоросли или растения также включают синонимы или базонимы данных видов, обладающие такими же физиологическими свойствами, как определено Международным кодексом номенклатуры прокариот или Международным кодексом номенклатуры водорослей, грибов и растений (Мельбурнский кодекс).

В частности, в настоящем изобретении представлены следующие воплощения.

1. Модифицированный фермент, как определено здесь, с активностью стерол-ацилтрансферазы, обладающий стерол-ацилтрансферазной активностью, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам, выбранным из группы, состоящей из 11, 281, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 626, 627, 636 и их комбинаций в полипептиде по SEQ ID NO: 1, предпочтительно одну или несколько аминокислотных замен, соответствующих E11G и/или L281I и/или D366V и/или I442V и/или H551Y и/или H554Q и/или F572L и/или F624L и/или L626F и/или G627D и/или C636S и/или их комбинациям.

2. Модифицированный фермент, как определено здесь и по п.1, катализирующий эстерификацию стеролов, содержащих 7-дегидрохолестерин (7-ДНС) и зимостерол, причем соотношение 7-ДНС к зимостеролу в сложных эфирах стеролов повышается по меньшей мере в 1,4 раза по сравнению с соотношением 7-ДНС к зимостеролу при катализе с использованием соответствующего немодифицированного фермента.

3. Модифицированный фермент, как определено здесь и по п.1 или 2, при этом аминокислотные замены выбраны из F624L, G627D, E11G, H554Q, I442V и их комбинаций.

4. Клетки хозяина, предпочтительно дрожжевые, более предпочтительно вырабатывающих стеролы дрожжей, еще более предпочтительно дрожжей, вырабатывающих холестерин, содержащие модифицированный фермент, как определено здесь и по любому из п.1, 2 или 3, причем данные клетки хозяина необязательно также содержат одну или несколько аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам, выбранным из 592 и/или 595 в полипептиде по SEQ ID NO: 3, предпочтительно замен, соответствующих F592L и/или G595D.

5. Клетки хозяина, как определено здесь и по п.4, которые применяются для получения смеси стеролов, содержащей 7-ДНС и зимостерол, причем соотношение 7-ДНС к зимостеролу повышается по меньшей мере в 1,4 раза по сравнению с клетками хозяина, экспрессирующими немодифицированный фермент.

6. Клетки хозяина, как определено здесь и по п.4 или 5, которые необязательно также включают: инактивацию ERG5 и ERG6 и/или экспрессию гетерологичного фермента из числа ЕС 1.3.1.72, обладающего активностью Δ²⁴-стеролредуктазы, причем предпочтительно гетерологичный фермент происходит из растения или позвоночного, более предпочтительно из человека, свиньи, собаки, мыши, крысы, лошади или *Danio rerio*.

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

рование клеток хозяина, как определено здесь и по п.4, 5 или 6, в соответствующих условиях и необязательно выделение и/или очистку 7-DHC из смеси стеролов.

8. Способ получения 7-DHC, включающий ферментативное превращение ацетил-CoA в смесь стеролов, содержащую зимостерол и 7-DHC, используя клетки хозяина, как определено здесь и по п.4, 5 или 6, причем содержание 7-DHC в смеси стеролов составляет по меньшей мере 40%, а 7-DHC необязательно дополнительно превращается в витамин D3 и/или 25-гидроксивитамин D3.

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

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Анализ методом HPLC липидных экстрактов от штаммов с ARE2 дикого типа ("WT") и с вариантами Are2 #2 и #1 (см. табл. 1). Что касается сложных эфиров 7-DHC ("эфиры 7-DHC") и сложных эфиров зимостерола ("эфиры Zum"), то детектировали обе формы эфиров, которые обозначены темно-серым и светло-серым цветом в соответствующих столбцах, а свободный 7-DHC обозначен черным цветом. (A) Соотношение продукции 7-DHC к эфирам, (B) соотношение общего 7-DHC (включая свободные и сложноэфирные формы) к общему количеству эфиров зимостерола, (C) продукция свободного 7-DHC, эфиров 7-DHC и эфиров зимостерола представлена в разных столбцах. Штаммы культивировали в течение двух суток с двумя подпитками глюкозой в колбах без отводов. Данные представляют значения для 3 независимых трансформантов, каждый из которых культивировался один раз.

Фиг. 2. Анализ методом HPLC липидных экстрактов от штаммов с ARE2 дикого типа ("WT") и с вариантами Are2 #2 и #1 (см. табл. 1). Более подробно см. в подписи к фиг. 1. Штаммы культивировали в течение 4 дней с одной подпиткой глюкозой в колбах без отводов. Данные представляют значения для 2 независимых трансформантов, каждый из которых культивировался один раз.

Фиг. 3. Анализ методом HPLC липидных экстрактов от штаммов с ARE2 дикого типа ("WT") и с вариантами Are2 #9 и #1 (см. табл. 1). Более подробно см. в подписи к фиг. 1. HPLC проводили по стандартной методике. Насчет других подробностей см. текст.

Фиг. 4. Анализ методом HPLC липидных экстрактов от штаммов с ARE2 дикого типа ("WT") и с вариантами Are2 #22 и #20 (см. табл. 1). Более подробно см. в подписи к фиг. 1. HPLC проводили по стандартной методике. Насчет других подробностей см. текст.

Фиг. 5. Анализ методом HPLC липидных экстрактов от штаммов с ARE2 дикого типа ("WT") и с вариантами Are2 #24 и #27 (см. табл. 1). Более подробно см. в подписи к фиг. 1. HPLC проводили по стандартной методике. Насчет других подробностей см. текст.

Фиг. 6. Анализ методом HPLC липидных экстрактов от штаммов с ARE2 дикого типа ("WT") и с вариантами Are2 #20, #22, #27 и #22 (см. табл. 1). Более подробно см. в подписи к фиг. 1. HPLC проводили по стандартной методике. Насчет других подробностей см. текст.

Фиг. 7. Анализ методом HPLC липидных экстрактов от штаммов с ARE2 дикого типа ("WT") и с вариантами Are2 #34, #32, #43, #24, #20, #22 и #27 (см. табл. 1). Более подробно см. в подписи к фиг. 1. HPLC проводили по стандартной методике. Насчет других подробностей см. текст.

Фиг. 8. Анализ методом HPLC липидных экстрактов от штаммов с ARE2 дикого типа ("WT") и с вариантами Are2 #9, #35, #36, #39 и #40 (см. табл. 1). Более подробно см. в подписи к фиг. 1. HPLC проводили по стандартной методике. Насчет других подробностей см. текст.

Фиг. 9. Анализ методом HPLC липидных экстрактов от штаммов с ARE2 дикого типа ("WT") и с вариантами Are2 #27, #33, #34, #37 и #38 (см. табл. 1). Более подробно см. в подписи к фиг. 1. HPLC проводили по стандартной методике. Насчет других подробностей см. текст.

Фиг. 10. Анализ методом HPLC липидных экстрактов от штаммов с ARE2 дикого типа ("WT") и с вариантами Are2 #41, #42, #43, #24 и #20 (см. табл. 1). Более подробно см. в подписи к фиг. 1. HPLC проводили по стандартной методике. Насчет других подробностей см. текст.

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

Примеры.

Пример 1. Получение и скрининг мутантов ARE2.

Проводили скрининг подверженной ошибкам библиотеки из 10000 клонов дрожжей, экспрессирующих варианты ацилтрансферазы-2 *Saccharomyces cerevisiae* (ScAre2), методом тонкослойной хроматографии (TLC) на предмет улучшения содержания 7-DHC во фракции сложных эфиров стеролов (насчет последовательностей ARE1 и ARE2 дикого типа см. Перечень последовательностей). Метод скрининга включает одновременную экстракцию и выделение стеролов из клеток со слегка расщепленными клеточными стенками. Обработанную биомассу наносили прямо на пластинку для TLC и погружали в растворитель, при этом происходила экстракция и разделение содержащих стеролы фракций за один прием. Во фракции сложных эфиров стеролов устанавливали соотношение стеролов с конъюгированными двойными связями (например, типа 7-DHC) относительно стеролов без конъюгированных двойных связей,

используя отличия в спектрофотометрических свойствах соединений с конъюгированными двойными связями (например, по способности к гашению флуоресценции, УФ-детекции).

Наилучшие варианты подвергали повторному скринингу в пяти повторах, секвенировали, культивировали в качалочных колбах и анализировали в трех биологических повторах методом HPLC-UV для определения состава стеролов и сложных эфиров стеролов.

Выделяли плазмиды, содержащие наилучшие варианты, и трансформировали ими штамм 10A *Saccharomyces cerevisiae*, вырабатывающий холестерина-5,7,24-триенол (*are1 are2 erg5 erg6::24R*; насчет конструирования см. пример 1 в WO 2017/108799). У вариантов с множественными заменами аминокислот выделяли мутации путем введения соответствующей мутации в ARE2 методом сайт-направленного мутагенеза (молчащие мутации не принимали во внимание), чтобы выяснить, какая мутация вызывает требуемый эффект. Штаммы культивировали и анализировали методом HPLC.

Пример 2. Стандартная процедура анализа HPLC-UV.

Представляющие интерес штаммы инокулировали в предварительные культуры по 10 мл YPD с генетицином (100 мкг/мл) (по 3 трансформанта на каждый вариант *Are2*) и культивировали при 30°C до соответствующей плотности (от 24 до 48 ч). Для лучшего сравнения также инокулировали по три разных трансформанта с плазмидой ARE2 дикого типа, которые были трансформированы одновременно с вариантами. Основные культуры по 50 мл YPD с генетицином инокулировали до $OD_{600} = 0,1$ в качалочные колбы на 250 мл без отводов и культивировали в течение 3 дней с 3-кратной подпиткой глюкозой (глюкозу добавляли до конечной концентрации 2% примерно через 30, 45 и 60 ч) при 200 об/мин и влажности 80% при 30°C. Отбирали по 200 единиц OD биомассы (центрифугировали в течение 5 мин при 1600×g и удаляли супернатанты) в пробирки Greiner на 15 мл и хранили при -20°C до анализа.

Для экстракции оттаивали осадок клеток в 200 OD, ресуспендировали в 1 мл раствора зимолиазы (зимолиаза 20T, 5 мг/мл в 50 mM KPi, pH 7, с 1M D-сорбитолом) и инкубировали 15 мин при 37°C (750 об/мин на термомиксере). После центрифугирования (2500×g, 5 мин) удаляли раствор зимолиазы, а к осадку добавляли 3,73 мл абсолютного EtOH (ресуспендировали в 1 мл, осторожно пропуская через пипетку вверх-вниз, а затем добавляли еще 2,73 мл). Добавляли 267 мкл внутреннего стандарта (холестерилацетат, 1 мг/мл в EtOH), суспензию клеток обрабатывали на вибромешалке и нагревали до 70°C в течение 1 ч с перемешиванием (750 об/мин на термомиксере). Пробирки оставляли на несколько минут для охлаждения до комнатной температуры, осаждали обломки клеток (2500×g, 10 мин при комнатной температуре) и переносили по 3 мл супернатанта в пробирки Rugeh, которые упаривали досуха в атмосфере N₂. Липиды растворяли в 200 мкл этилацетата (обрабатывали на вибромешалке и перемешивали при 750 об/мин на термомиксере при 40°C в течение 15 мин). Раствор центрифугировали еще раз (2500×g, 5 мин) и переносили в стеклянный флакон с вкладкой для последующего анализа HPLC-UV.

Липидные экстракты анализировали методом HPLC с УФ-детектированием при двух длинах волн (210 нм и 280 нм). Соединения зимостерола выявляли при 210 нм, а соединения 7-DHC определяли при 280 нм.

Растворитель: 80% EtOH/20% MeOH с 0,1% TFA.

Колонка: YMC-Pack Pro C18 RS.

Метод: вводимый объем: 10 мкл,

термостат инжектора: 40°C,

поток: 0,6 мл/мин,

термостат колонки: 20°C.

УФ-детектирование: 210 нм, 280 нм (стеролы с конъюгированными двойными связями).

Также анализировали стандартные смеси из 7-DHC, зимостерола, холестерилацетата и сквалена при 3 различных концентрациях (0,5, 1,0 и 2,0 мг/мл каждого вещества) и для каждого вещества строили стандартные кривые для расчета концентрации стеролов в экстракте в мкг/мл или в мкг/OD₆₀₀.

Пример 3. Оценка вариантов ARE2 в отношении активности и/или специфичности.

Для прямого сравнения штамм 10A опять трансформировали плазмидой с ARE2 дикого типа вместе с плазмидами, экспрессирующими варианты *Are2* (см. пример 1), и анализировали полученные штаммы (см. пример 2) за один заход. Результаты анализов HPLC приведены в табл. 1 и на фиг. 1-10. Значения в таблице представляют кратность изменений между штаммами, экспрессирующими мутанты/варианты, в сравнении с диким типом. Первое значение означает улучшение по соотношению между фракцией сложных эфиров и фракцией свободного 7-DHC, тогда как второе значение означает улучшение по соотношению 7-DHC и зимостерола во фракциях сложных эфиров. Третье значение представляет сравнение общего содержания 7-DHC в биомассе у мутантов и дикого типа. Некоторые из приведенных вариантов проявляли главным образом улучшение уровня сложных эфиров, тогда как другие проявляли лучшее соотношение 7-DHC/зимостерол во фракции сложных эфиров.

Таблица 1А

Сводка по относительной продукции сложных эфиров у вариантов Age2 на основании нескольких независимых экспериментов

#	Замена а.к.	Относ. продукция эфиров	Эфиры 7-DHC/ эфиры Zym	Общий 7-DHC/ общий Zym
1	H554Q	1,2	1,0-2,0	3,0-4,2
9	H554Q-F572L	1,2	1,7-3,4	3,9-8,5
15	L28II	1,5		
24	I442V-L626F	3,5	1,0-1,3	1,7-2,4
27	E11G-D366V-C636S	2,2	1,2-1,5	2,3-3,4
32	E11G-D366V-F624L-C636S	1,3	5,3	12,7
33	E11G-D366V-F624L-C636S	1,5	6,0	15,4
34	E11G-D366V-G627D-C636S	1,4	7,1-7,3	16,4-17,8
37	E11G-D366V-I442V-F624L-C636S	1,6	5,4	13,9
38	E11G-D366V-I442V-G627D-C636S	1,3	7,1	20,5
41	I442V-F624L-L626F	1,9	4,8	10,4
42	I442V-L626F-G627D	2,5	3,4	6,7
43	I442V-G627D	1,9	5,5-5,9	11,76-11,7

"Относительная продукция эфиров" означает кратность повышения содержания 7-DHC от общего количества стеролов, вырабатываемых при указанных заменах аминокислот вместо ARE2 дикого типа; "эфиры 7-DHC/эфиры Zym" означает соотношение сложных эфиров 7-DHC к сложным эфирам зимостерола ("Zym"); "общий 7-DHC/общий Zym" представляет соотношение общего 7-DHC (свободного и эфиров) к общему зимостеролу (свободному и эфирам). См. дополнительные объяснения в тексте.

Таблица 1В

Сводка по специфичности вариантов Age2 на основании нескольких независимых экспериментов

#	Замена а.к.	Специфичность
1	H554Q	1,4
2	V286V-H551Y-F572L-S633S	1,7
9	H554Q-F572L	1,8
20	F624L	3,9
22	G627D	4,4
32	E11G-D366V-F624L-C636S	3,1
33	E11G-D366V-F624L-C636S	3,8
34	E11G-D366V-G627D-C636S	4,4
35	E11G-F624L	3,2
36	E11G-G627D	4,2
37	E11G-D366V-I442V-F624L-C636S	3,4
38	E11G-D366V-I442V-G627D-C636S	4,5
39	H554Q-F572L-F624L	12,2
40	H554Q-F572L-G627D	5,0
41	I442V-F624L-L626F	3,1
42	I442V-L626F-G627D	2,2
43	I442V-G627D	3,5

Цифры означают кратность повышения содержания 7-DHC по сравнению с содержанием зимостерола в смеси стеролов, вырабатываемых при указанных заменах аминокислот вместо ARE2 дикого типа. См. дополнительные объяснения в тексте.

Таблица 1С

Сводка по общей продукции 7-DHC у вариантов Age2 на основании нескольких независимых экспериментов

#	Замена а.к.	Общая продукция 7-DHC
1	H554Q	1,0
20	F624L	1,0

22	G627D	1,0
24	I442V-L626F	1,3
27	E11G-D366V-C636S	1,2
32	E11G-D366V-F624L-C636S	1,4
33	E11G-D366V-F624L-C636S	1,4
34	E11G-D366V-G627D-C636S	1,3
35	E11G-F624L	1,1
36	E11G-G627D	1,1
37	E11G-D366V-I442V-F624L-C636S	1,4
38	E11G-D366V-I442V-G627D-C636S	1,1
39	H554Q-F572L-F624L	1,0
40	H554Q-F572L-G627D	1,3
41	I442V-F624L-L626F	1,4
42	I442V-L626F-G627D	1,4
43	I442V-G627D	1,4

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фермент, выбранный из ЕС 2.3.1.26, обладающий стерол-ацилтрансферазной активностью, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам 11, 281, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 626, 627, 636 и их комбинаций в полипептиде по SEQ ID NO: 1, где одна или несколько аминокислотных замен выбраны из группы, состоящей из E11G, L281I, D366V, I442V, H551Y, H554Q, F572L, F624L, L626F, G627D, C636S и их комбинаций.

2. Фермент по п.1, катализирующий эстерификацию стеролов, содержащих 7-дегидрохолестерин (7-ДНС) и зимостерол, причем соотношение 7-ДНС к зимостеролу в сложных эфирах стеролов повышается по меньшей мере в 1,4 раза по сравнению с соотношением 7-ДНС к зимостеролу при катализе с использованием соответствующего фермента, где аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 11, 281, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 626, 627, 636, и их комбинации в полипептиде в соответствии с SEQ ID NO: 1 выбраны из группы, состоящей из 11E, 281L, 366D, 442V, 551H, 554H, 572F, 624F, 626F, 627G, 636C и их комбинаций.

3. Фермент по п.1 или 2, в котором аминокислотные замены выбраны из F624L, G627D, E11G, H554Q, I442V и их комбинаций.

4. Клетка дрожжей, вырабатывающая стеролы, содержащая модифицированный фермент по любому из пп.1-3.

5. Клетка дрожжей по п.4, в которой полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 3 дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен в положениях, соответствующих остаткам 592 и/или 595, выбранных из F592L и/или G595D.

6. Клетка дрожжей по п.4 или 5 для получения смеси стеролов, содержащей 7-ДНС и зимостерол, причем соотношение 7-ДНС к зимостеролу повышается по меньшей мере в 1,4 раза по сравнению с клеткой дрожжей, экспрессирующей соответствующий фермент, где (1) аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 11, 281, 366, 442, 551, 554, 572, 624, 626, 627, 636, и их комбинации в полипептиде в соответствии с SEQ ID NO: 1 выбраны из группы, состоящей из 11E, 281L, 366D, 442V, 551H, 554H, 572F, 624F, 626F, 627G, 636C и их комбинаций.

7. Клетка дрожжей по любому из пп.4-6, в которой инактивированы ERG5, кодирующий С-22 стеролдесатуразу, и ERG6, кодирующий стерол 24-С-метилтрансферазу.

8. Клетка дрожжей по любому из пп.4-7, экспрессирующая гетерологичный фермент из числа ЕС 1.3.1.72, обладающий активностью Δ 24-стеролредуктазы.

9. Способ снижения содержания зимостерола в смеси стеролов, содержащей зимостерол и 7-ДНС, включающий культивирование клеток хозяина по любому из пп.4-8 в соответствующих условиях.

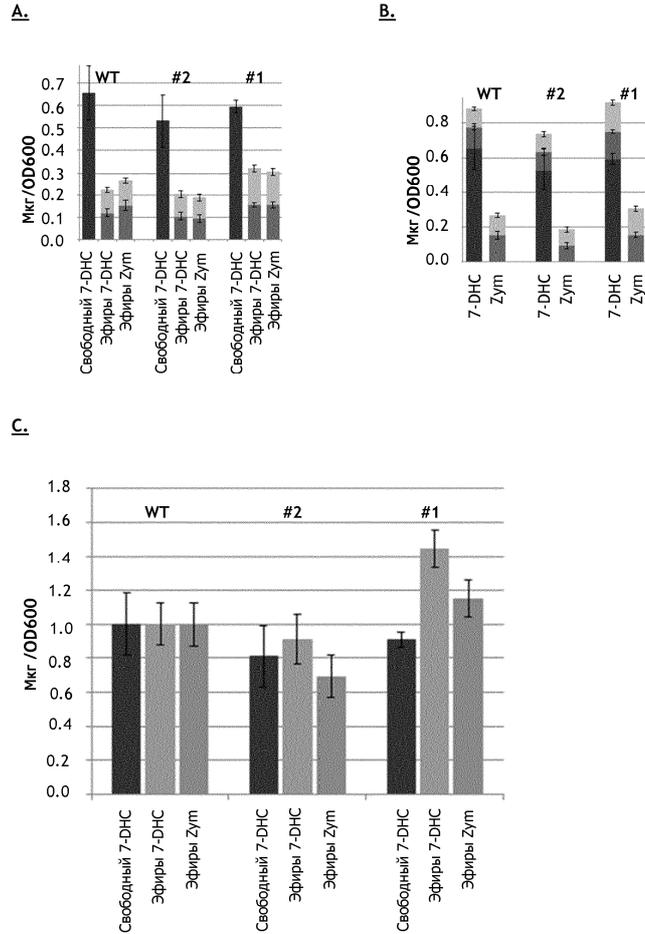
10. Способ повышения содержания 7-ДНС в смеси стеролов, содержащей 7-ДНС и зимостерол, включающий культивирование клеток хозяина по любому из пп.4-8 в соответствующих условиях.

11. Способ получения 7-ДНС, включающий ферментативное превращение ацетил-СоА в смесь стеролов, содержащую зимостерол и 7-ДНС, используя клетки хозяина по любому из пп.4-8, причем содержание 7-ДНС в смеси стеролов составляет по меньшей мере 40%.

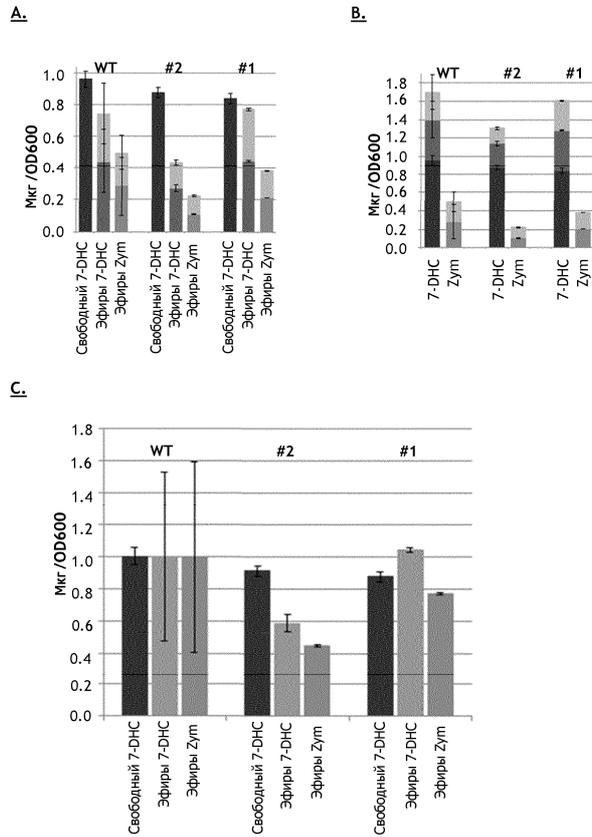
12. Способ по п.11, при этом 7-ДНС дополнительно превращается в витамин D3.

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

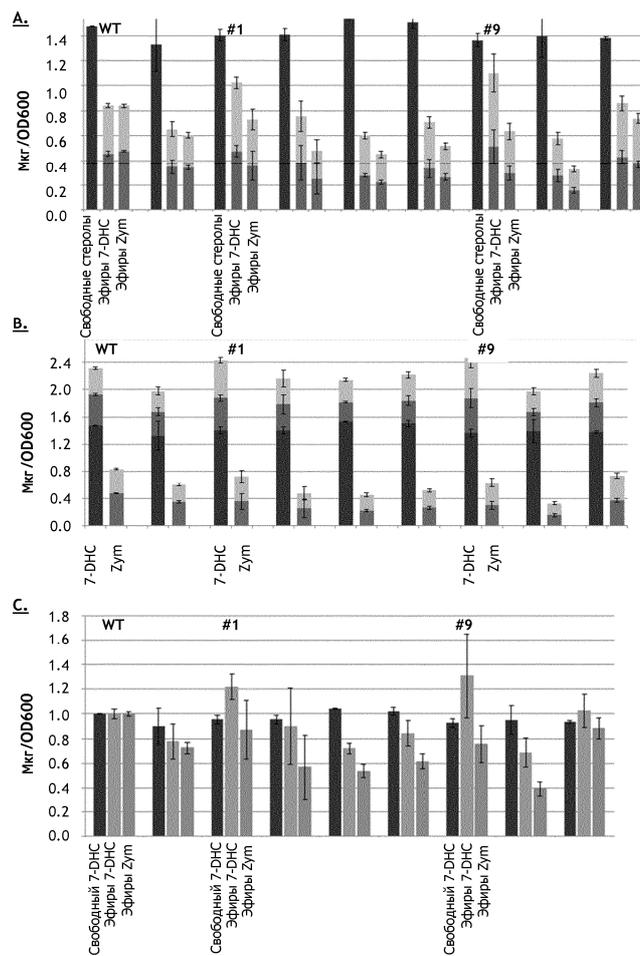
14. Применение клетки дрожжей по любому из пп.4-8 в способе получения 7-ДНС, причем 7-ДНС выделяют из смеси стеролов, содержащей зимостерол и 7-ДНС, а соотношение 7-ДНС к зимостеролу повышается по меньшей мере в 1,4 раза по сравнению со способом с использованием соответствующего немодифицированного фермента и немодифицированных клеток хозяина, соответственно.



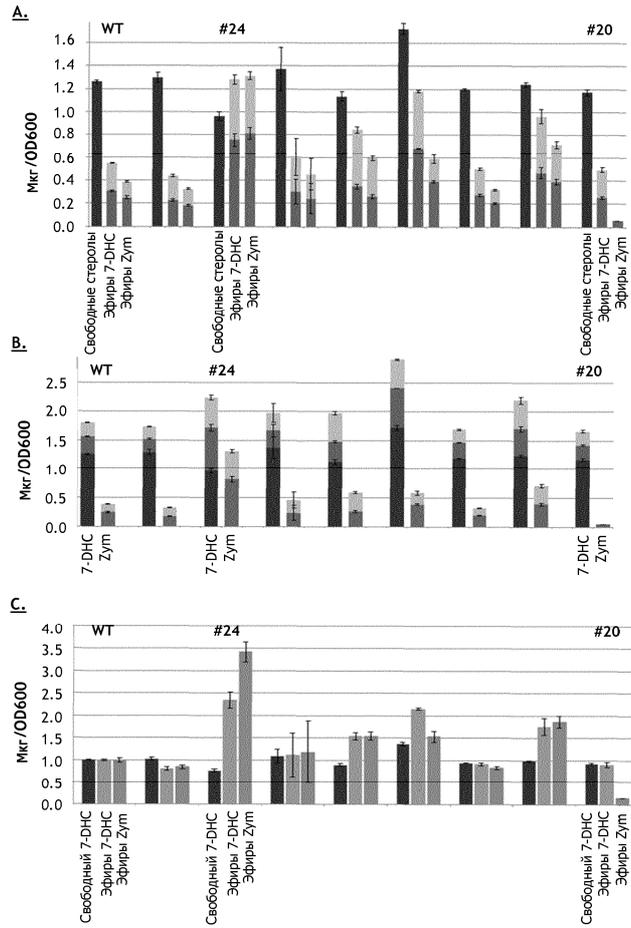
Фиг. 1



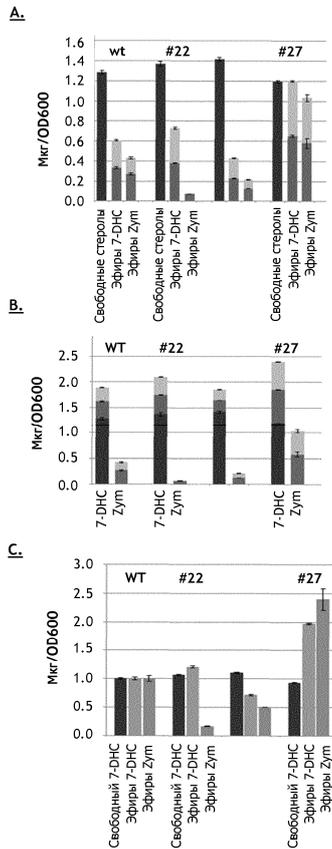
Фиг. 2



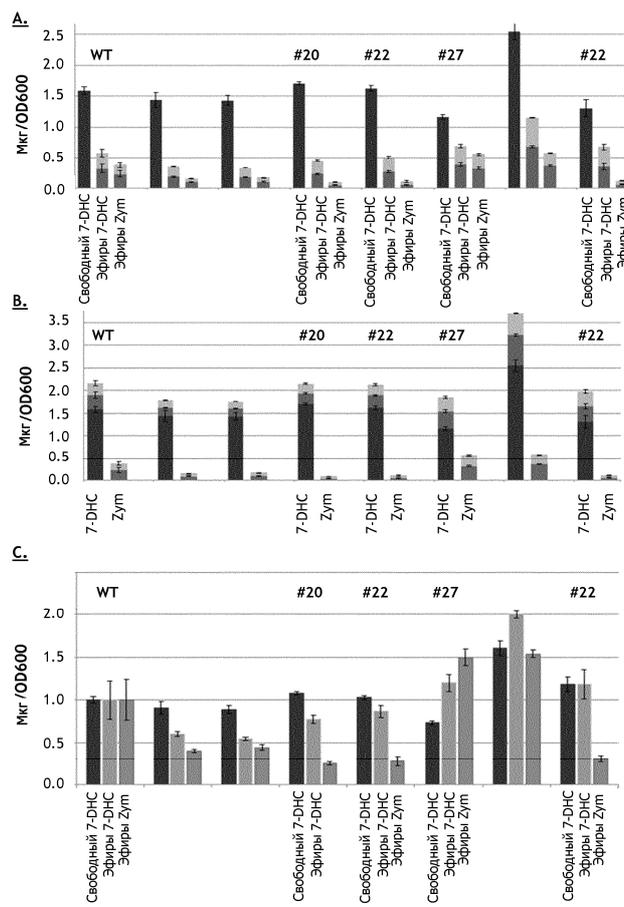
Фиг. 3



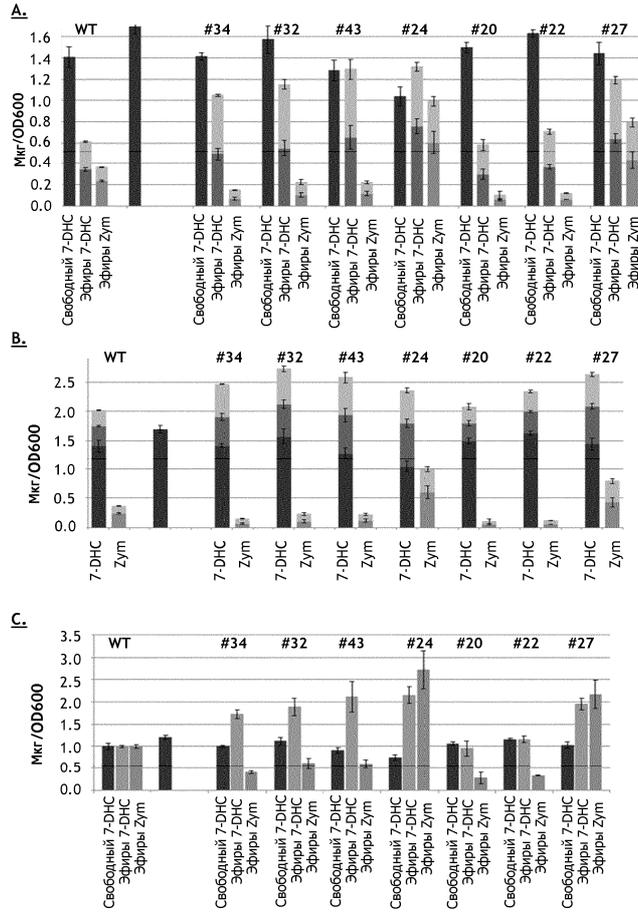
Фиг. 4



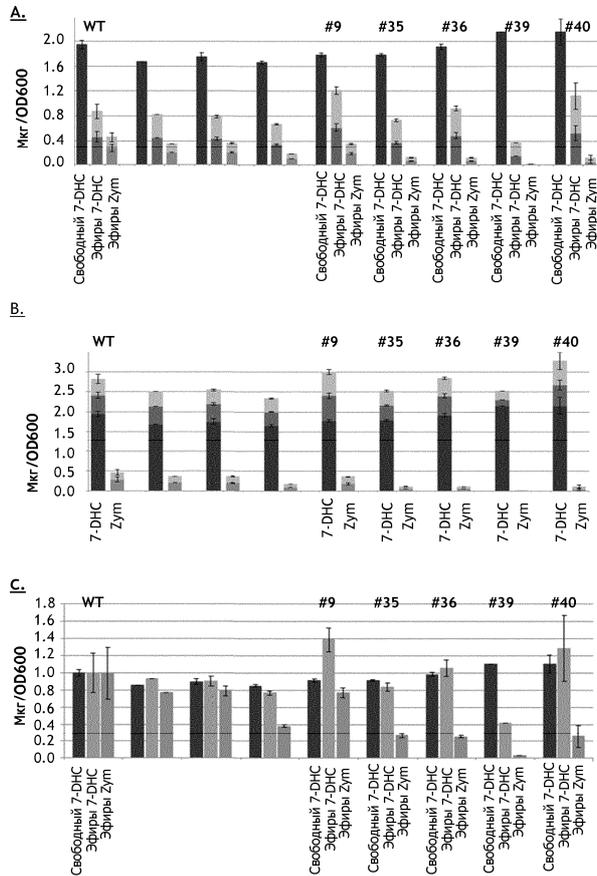
Фиг. 5



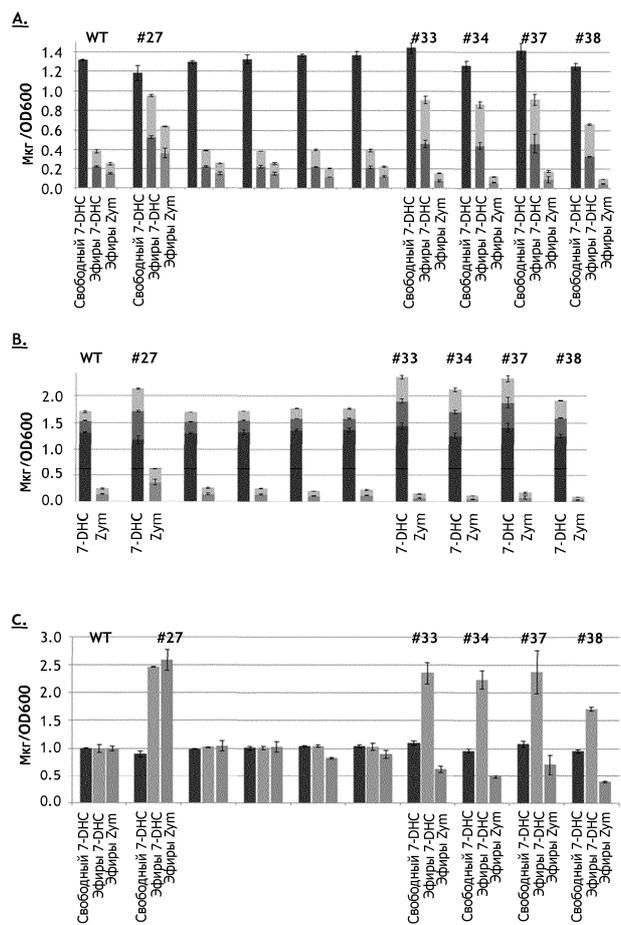
Фиг. 6



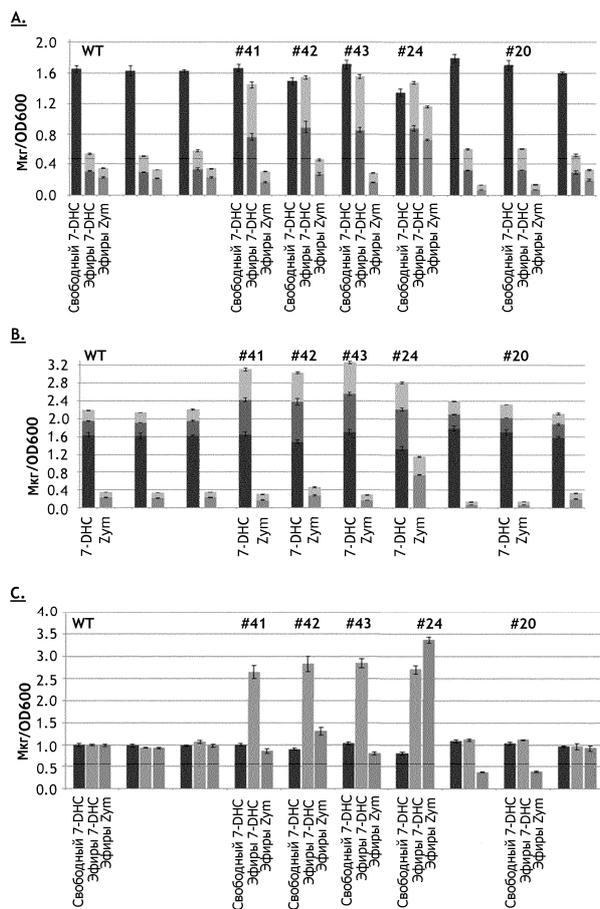
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

