(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390925 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.01

(22) Дата подачи заявки
2021.09.27

(51) Int. Cl. ***C12N 9/10*** (2006.01)
C12N 9/48 (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12R 1/84 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ДРОЖЖИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОЛИГОПЕПТИДА

(31) **102020000022846**
(32) **2020.09.28**
(33) **IT**
(86) **PCT/EP2021/076468**
(87) **WO 2022/064027 2022.03.31**

(71) Заявитель:
ЛЕСАФФР Э КОМПАНИ (FR)

(72) Изобретатель:
Дали Симона, Галльяни Стефано (IT), Бузиелло Иммаколата, Гриджис Маттео (CH), Тальяни Ауро Роберто (IT)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к рекомбинантным дрожжам, у которых инактивирован ген PEP4. Указанные дрожжи применяют для получения олигопептидов.

202390925 A1

202390925 A1

PCT/EP2021/076468

МПК:
C12N 9/10 (2006.01) ***C12N 1/19*** (2006.01)
C12N 9/48 (2006.01) *C12R 1/84* (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01) *C12R 1/865* (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ДРОЖЖИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОЛИГОПЕПТИДА

Область изобретения

Данное изобретение относится к генетически модифицированным дрожжам, которые применяют для ферментативного получения олигопептидов, в частности, для получения γ-глутамил-цистеинил-глицина.

Предшествующий уровень техники

Глутатион (J. De Rey Pallade, Bull. Chem. Soc. France, 31, 987-91, 1904) представляет собой трипептид (гамма-глутамил-цистеинил-глицин, часто обозначаемый как восстановленный глутатион (GSH)), обычно присутствующий в клетках животных и участвующий в качестве ферментативного субстрата в многочисленных биохимических процессах, главным образом в роли детоксифицирующего агента (для выведения токсинов в виде глутатионил-содержащего производного), металл-хелатирующего агента и восстанавливающего агента. В последней роли он имеет большое значение для уменьшения содержания свободных радикалов и противодействия процессам старения клеток в целом. Глутатион склонен к окислению с образованием димера, характеризующегося наличием дисульфидного мостика и часто обозначаемого как GSSG или «окисленный глутатион». Эти две формы, окисленная и восстановленная, сосуществуют *in vivo*. Ввиду своей физиологической важности глутатион (как в восстановленной, так и в окисленной формах) используется в качестве активного ингредиента в составе фармацевтических, нутрицевтических и косметических продуктов.

Глутатион может быть получен путем химического синтеза, но обычно его получают методами биотехнологии, что дешевле и дает продукт в оптически чистой форме (Li et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 233-42, 2004). Биомассу отделяют от ферментационных бульонов, и затем ее можно подвергнуть лизису для высвобождения глутатиона в супернатант; далее глутатион очищают и выделяют в твердой форме. Наиболее распространенный метод очистки включает взаимодействие с оксидом меди или солями меди (US2702799) и последующее взаимодействие с сернистоводородной

кислотой или ее солями (CN106220708) либо электрохимическое восстановление (EP2439312, EP2963156). Альтернативно (EP1391517), глутатион может быть очищен исключительно хроматографией, что позволяет таким образом избежать использования меди и H_2S по соображениям безопасности и защиты окружающей среды.

В литературе описаны различные примеры продуцирования глутатиона дрожжами дикого типа или генетически модифицированными дрожжами родов *Saccharomyces, Pichia* и *Candida* (EP1391517, EP1512747, US2018/0135142) или другими микроорганизмами бактериального происхождения, такими как генетически модифицированные *Escherichia coli* (EP2088153).

GSH может накапливаться в биомассе или выделяться в супернатант (M. Rollini et al., Production of glutathione in extracellular form by Saccharomyces cerevisiae, *Process Biochemistry*, 45, 441-445, 2010).

Биосинтез глутатиона в *S. cerevisiae* включает 2 последовательные реакции. Первая реакция, катализируемая ферментом глутамат-цистеинлигазой, обуславливает синтез γ-L-глутамил-цистеина начиная с L-глутамата и цистеина. Вторая реакция катализируется ферментом глутатионсинтетазой, которая катализирует связывание глицина с дипептидом γ-L-глутамил-цистеин, в результате чего образуется глутатион или трипептид γ-L-глутамил-L-цистеинил-глицин (γ-Glu-Cys-Gly). В рекомбинантных штаммах процесс биосинтеза может быть усилен с использованием методов молекулярной биологии.

Кроме того, конкуренцию методам биосинтеза составляют методы биодеградации, которые препятствуют накоплению глутатиона в биомассе; глутатион метаболизируется и превращается обратно в три составляющие его аминокислоты в результате осуществления реакций, катализируемых соответствующими ферментами. В главном известном пути деградации первый фермент, γ-глутамилтранспептидаза (GT, кодируемая геном ECM38), катализирует гидролитическое отщепление γ-L-глутамила, что приводит к образованию дипептида цистеинил-глицин и высвобождению глутаминовой кислоты; второй фермент, цистеинил-глицинпептидаза, катализирует гидролиз данного дипептида с высвобождением цистеина и глицина. Таким образом, в ходе деградации глутатиона образуется дипептид цистеинил-глицин (Cys-Gly).

В случае рекомбинантных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, в которых главный путь был делетирован, теоретически допускалось наличие второго пути деградации GSH (Kumar et al., *FEMS Microbiology Lett.*, 219, 187-94, 2003). Указанный второй путь

впоследствии был идентифицирован, и оказалось, что он катализируется «комплексом dug», содержащим три фермента, кодируемых генами DUG1, DUG2 и DUG3. В частности, он обуславливает объединенное действие пептидазы (DUG2) и глутаминамидотрансферазы (DUG3) вместе с протеазой (DUG1, также называемой дипептидазой) (Bachhawat et al., *Genetics*, 175, 1137-51, 2007).

В случае промышленного производства важно ограничить деградацию глутатиона по окончании ферментации, когда достигнут максимальный уровень концентрации в биомассе; для обработки промышленных количеств биомассы обязательно потребуются затраты времени продолжительностью в несколько часов, в течение которых деградация продукта приведет к уменьшению выхода и усложнению очистки. Следовательно, было бы разумным рассмотреть возможность предотвращения деградации путем инактивации как пути гамма-GT, кодируемого геном ECM38, так и пути DUG, кодируемого генами DUG1, DUG2 и DUG3, которые описаны в Kumar *et al., J. Biol. Chem.*, 287, 4552-61, 2012.

Однако, двойной делеции указанных двух путей деградации глутатиона недостаточно, что описано ниже.

Описание изобретения

Теперь установлено существование третьего пути деградации глутатиона. Действительно, в случае рекомбинантных дрожжей, несущих двойную делецию двух вышеупомянутых путей деградации, все еще отмечается способность к деградации глутатиона; наблюдается тенденция к быстрому снижению содержания GSH в биомассе по окончании ферментации, намного более быстрому, чем присуще химической (спонтанной) деградации. Таким образом, указанная деградация имеет ферментативную природу и несомненно оказывает неблагоприятное влияние на выход, получаемый при промышленном производстве.

В настоящее время неожиданным образом обнаружено, что уже известный и в норме присутствующий в дрожжах фермент, а именно, протеаза, известная как аспартильная протеаза или протеиназа А и кодируемая геном PEP4 (ген вакуолярной протеазы) (Ammerer et al., *Mol. Cell. Biology*, 6, 2490-2499, 1986), катализирует деградацию глутатиона в реакции его гидролиза до глицина и γ-L-глутамил-цистеина (γ-Glu-Cys).

Протеиназа А представляет собой протеолитический фермент, присутствующий в вакуолях *S. cerevisiae*, который известен давно и классифицируется как

пепсиноподобная аспартильная протеиназа; аспартильные протеиназы широко распространены в позвоночных, грибах, растениях и ретровирусах, характеризуются разными функциями и разными диапазонами оптимума pH. Различие в функциях является отражением низкой гомологии между последовательностями в геноме, кодирующими ферменты, принадлежащие данному семейству (Parr et al., *Yeast*, 2007).

При производстве пива протеиназа A из *S. cerevisiae* вовлечена в деградацию белков, способствующих образованию пены; делеция гена PEP4 приводит к достижению лучшего качества и большей стабильности пены на пиве (Wang et al., *Int. J. of Food Microbiol.*, 2007; CN1948462).

Инактивация протеиназы A также описана в случае рекомбинантного штамма *Pichia pastoris*, используемого для получения паратиреоидного гормона человека, с целью предотвращения протеолитической деградации указанного паратиреоидного гормона (Wu et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2013).

Однако, действие, которое протеиназа A может оказывать на глутатион, вызывая его деградацию с образованием дипептида γ-Glu-Cys, никогда не было описано. Поэтому нельзя было ожидать, что инактивация гена PEP4 будет улучшать стабильность глутатиона в биомассе.

Действительно, было продемонстрировано, что присутствие протеиназы A в активной форме оказывает неблагоприятное влияние на накопление в биомассе частично гидролизованного глутатиона. Продуктом гидролиза является не дипептид цистеинил-глицин (Cys-Gly), как ожидалось согласно пути деградации глутатиона, а дипептид γ-L-глутамил-цистеин (γ-Glu-Cys). Таким образом, присутствие протеиназы A в активной форме оказывает неблагоприятное влияние на стабильность продуцируемого глутатиона. Особенно это наблюдается в период времени между окончанием процесса ферментации и последующими стадиями лизиса биомассы, экстракции и очистки глутатиона. В указанных условиях процесса наблюдается уменьшение содержания глутатиона в биомассе и одновременно увеличение содержания дипептида γ-L-глутамил-цистеин (γ-Glu-Cys).

Кроме того, дипептид γ-L-глутамил-цистеин (γ-Glu-Cys) представляет собой примесь, которую трудно отделить от глутатиона, поскольку он имеет химические характеристики (наличие свободной тиольной группы со способностью к восстановлению и образованию комплексов с металлами) и биохимические характеристики (молекулярную массу, изоэлектрическую точку), весьма схожие с

таковыми у глутатиона. Таким образом, присутствие дипептида γ-Glu-Cys в высоких концентрациях может мешать процессу очистки глутатиона. Поэтому еще одним преимуществом делеции гена PEP4 является более эффективный способ очистки глутатиона, полученного из штамма дрожжей.

Настоящее изобретение относится к штамму дрожжей, в котором функциональная активность гена PEP4 снижена, например, путем изменения структуры или экспрессии гена, либо подавлена посредством частичной или полной делеции гена; в результате чего фермент протеиназа А не продуцируется или продуцируется в форме, не являющейся каталитически активной. Это повышает стабильность во времени глутатиона, продуцируемого клетками и содержащегося в биомассе, и поддерживает низкую концентрацию дипептида γ-Glu-Cys, улучшая качество продукта и выход способа получения.

Другим путем инактивации данного фермента является добавление ингибиторов протеаз, более конкретно, ингибиторов аспартильных протеаз. Указанные вещества ингибируют активность фермента, который, в свою очередь, больше не может проявлять свою активность в отношении деградации глутатиона.

Таким образом, конечным результатом указанных действий является повышение эффективности способа получения глутатиона.

Подробное описание изобретения

Предметом настоящего изобретения является рекомбинантный микроорганизм, способный продуцировать глутатион, характеризующийся тем, что в указанном микроорганизме инактивирован ген PEP4, кодирующий протеиназу А.

Согласно одному из аспектов изобретения необходимо, чтобы указанный микроорганизм представлял собой дрожжи, такие как гаплоидные или диплоидные дрожжи. В конкретном воплощении изобретения указанный микроорганизм представляет собой диплоидные дрожжи, при этом инактивированы обе копии гена PEP4.

Согласно данному изобретению, ген PEP4 может быть инактивирован путем его полной или частичной делеции либо путем мутагенеза или вставки экзогенной ДНК, как например, селективного маркера, с использованием процесса гомологической рекомбинации. В любом случае, инактивация данного гена устраняет или ослабляет экспрессию протеиназы А или приводит к экспрессии нефункциональной протеиназы А.

Согласно изобретению продемонстрировано, что:

- инактивация гена PEP4 повышает стабильность продуцируемого глутатиона, при этом значение его титра остается постоянным при комнатной температуре;

- инактивация гена PEP4 снижает содержание дипептида γ-глутамил-цистеин (γ-Glu-Cys) в условиях ферментации;

- деградация глутатиона до γ-L-глутамил-цистеина (γ-Glu-Cys) также ослабляется в условиях, не относящихся к ферментации, во время очистки продукта (на последующих стадиях).

В предпочтительном воплощении согласно изобретению предложены генетически модифицированные дрожжи, полученные путем инактивации гена PEP4 и по меньшей мере одного гена, вовлеченного в деградацию глутатиона посредством пути с участием гамма-GT или DUG. Указанный ген, вовлеченный в деградацию глутатиона посредством пути с участием гамма-GT или DUG, предпочтительно выбран из ECM38, DUG1, DUG2 и DUG3.

Инактивацию конкретного целевого гена в дрожжах можно осуществить, используя механизм рекомбинации, благодаря которому происходит замена данного гена на другой (маркерный) ген, такой как гены, придающие устойчивость к какому-либо антибиотику или другому токсичному веществу, ауксотрофные маркеры или другие гены. Для облегчения выполнения последующих стадий маркерные гены конструируют таким образом, чтобы они были фланкированы короткими повторяющимися последовательностями, распознаваемыми специфическими рекомбиназами, которые катализируют удаление фрагмента ДНК и при этом устраняют маркерный ген. Например, в этом пути можно использовать последовательности LoxP или LoxR, распознаваемые рекомбиназами, называемыми «Cre» или «R», и имеются многочисленные альтернативные, по существу эквивалентные, способы.

Кроме того, согласно изобретению могут быть осуществлены другие генетические модификации микроорганизма, предназначенные для повышения способности к биосинтезу глутатиона, например, путем встраивания одной или нескольких копий генов GSH1 (гамма-глутамат-цистеинлигаза) и GSH2 (глутатионсинтетаза), как описано ниже.

В конкретном воплощении изобретения рекомбинантный микроорганизм, полученный путем инактивации гена PEP4, представляет собой микроорганизм, принадлежащий виду *Saccharomyces cerevisiae*. Ген PEP4 у *S. cerevisiae*, который состоит из 1218 нуклеотидов (ссылочная последовательность согласно Национальному центру

биотехнологической информации (NCBI): NM_001183968.1), располагается в геноме *S. cerevisiae* в хромосоме XVI, при этом в диплоидной клетке присутствуют 2 ее копии.

Несмотря на то, что согласно репрезентативному воплощению изобретения рекомбинантный микроорганизм, способный продуцировать глутатион, происходит из *S. cerevisiae*, можно использовать любой микроорганизм, принадлежащий группе дрожжей. Примеры указанных микроорганизмов включают дрожжи, принадлежащие родам Candida, как например, виду *C. utilis*, Pichia, как например, виду *P. pastoris*, Kluyveromyces, как например, виду *K. lactis*, и Schizosaccharomyces, как например, виду *S. pombe*.

Дрожжи, из которых происходит рекомбинантный микроорганизм по изобретению, предпочтительно представляют собой *S. cerevisiae*, диплоидный штамм GN2361, или GN2362, или GN2373, каждый из которых в природе содержит ген PEP4, кодирующий белок с протеазной активностью. Штаммы *S. cerevisiae* GN2361, GN2362 и GN2373 в свою очередь происходят из штамма BY4742 *S. cerevisiae*, хранящегося в Американской коллекции типовых культур (ATCC), с присвоенным номером ATCC 201389. Используя штамм BY4742 в качестве исходного штамма и применяя генно-инженерные манипуляции, проводимые в соответствии с известным уровнем техники, осуществляли инактивацию всех ранее известных путей деградации глутатиона, кодируемых генами ECM38, DUG2 и GCG1 (гамма-глутамил-циклотрансфераза) (Ganguli et al., 2007, *Genetics*, и Baudouin-Cornu et al., 2012, *J. Biol. Chem.*).

Однако, несмотря на дезактивацию метаболических путей, в биомассах, полученных из указанных штаммов, происходила деградация глутатиона на последующих стадиях; в процессе очистки продукта наблюдалось снижение содержания глутатиона наряду с увеличением содержания примеси, позже идентифицированной как γ-глутамил-цистеин (γ-Glu-Cys).

Затем инактивировали другой ген, не связанный с путем биосинтеза или известными путями метаболизма глутатиона, а именно ген PEP4, с получением биомасс, в которых устранена биохимическая деградация глутатиона до γ-Glu-Cys; указанные биомассы с улучшенной стабильностью отвечают требованиям в плане продолжительности промышленной обработки и, следовательно, обеспечивают преимущество в плане лучшей очистки продукта.

Неожиданным образом для указанных биомасс также продемонстрировано более низкое содержание γ-Glu-Cys в бульонах по окончании ферментации. Ферментируя

исходные штаммы, содержащие ген PEP4, и соответствующие производные штаммы, лишенные протеиназы A, в одинаковых условиях, лучшее соотношение между желаемым продуктом (глутатионом) и нежелательным продуктом (γ-Glu-Cys) получают в последних штаммах.

Согласно настоящему изобретению продемонстрировано, что инактивация гена PEP4 приводит к получению биомасс лучшего качества при ферментативном получении глутатиона и одновременно способствует промышленной переработке биомасс.

Другим видом дрожжей, из которого может происходить рекомбинантный микроорганизм по изобретению, является *S. cerevisiae*, гаплоидный штамм GN2357, при этом ген PEP4 расположен в геноме опять же в хромосоме XVI; однако, в гаплоидной клетке присутствует только одна ее копия.

Инактивация гена PEP4 в рекомбинантном диплоидном или гаплоидном микроорганизме может быть достигнута путем замены нуклеотидной последовательности данного гена на последовательность экзогенного гена, который придает устойчивость к G418 (генетецину), аминогликозидному антибиотику со структурой, схожей со структурой гентамицина. Встроенный экзогенный ген впоследствии удаляется в ходе процесса рекомбинации в дрожжевых клетках. Результатом является делеция гена PEP4 и утрата его функции.

Способ, используемый для получения рекомбинантного штамма *S. cerevisiae*, способного накапливать глутатион с большей стабильностью благодаря инактивации гена PEP4, в целом может быть применен к другим дрожжам, стабильность глутатиона в которых необходимо улучшить.

В одном из воплощений настоящего изобретения деградация глутатиона и образование γ-Glu-Cys снижены в штаммах *Pichia pastoris*; в частности, в одних и тех же экспериментальных условиях штамм, лишенный гена PEP4, демонстрирует более низкий уровень образования γ-Glu-Cys даже в течение длительных периодов времени.

Приведенные далее примеры иллюстрируют изобретение более подробно.

Краткое описание фигур

Фиг. 1: делеция гена DUG2 путем замены на ген URA3 из *K. lactis*, фланкированный 2 повторяющимися последовательностями loxP.

Фиг. 2: делеция гена PEP4 путем замены на ген устойчивости к канамицину KanMX4, фланкированный двумя последовательностями FRT (мишени распознавания флиппазой) и двумя участками, гомологичными гену PEP4.

Фиг. 3: стабильность GSH - на графике показан уровень дипептида γ-Glu-Cys, присутствующего в биомассах *S. cerevisiae* в разные моменты времени.

Фиг. 4: стабильность GSH - на графике показан уровень дипептида γ-Glu-Cys, присутствующего в биомассах *P. pastoris* в разные моменты времени.

Пример 1 (сравнительный)

Штамм NCYC2958 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* культивируют, как описано в EP1391517, примере 3; по окончании ферментации дрожжи центрифугируют и затем промывают в центрифуге деминерализованной водой. Полученную биомассу диспергируют в 10 объемах водного раствора, содержащего глюкозу и другие описанные нутриенты, для увеличения содержания восстановленного глутатиона в биомассе; по окончании указанной процедуры весь бульон центрифугируют и биомассу промывают деминерализованной водой для удаления супернатанта.

Затем биомассу дрожжей, обогащенную GSH, подвергают термокислотному лизису, после чего выполняют микрофильтрацию через керамические мембраны с пористостью 0,2 микрон, как описано в примере 1 из EP1391517. Полностью прозрачный полученный раствор наносят на колонку с ионообменной смолой, затем на адсорбирующую смолу и в конце концентрируют с использованием нанофильтрации, как описано в абзацах [0060] и [0061] указанного патента.

Восстановленный глутатион в порошковой форме получают из очищенного водного раствора с использованием распылительной сушки; полученный продукт соответствует требованиям по чистоте, установленным Европейской Фармакопеей.

Пример 2. Конструирование рекомбинантного штамма S. cerevisiae с делецией ECM38 и DUG2

Используя штамм BY4742 в качестве исходного штамма, осуществляли инактивацию ранее известных путей деградации глутатиона, кодируемых генами ECM38 и DUG2, применяя генно-инженерные манипуляции, проводимые так, как описано в предшествующем уровне техники (Ganguli et al., 2007, *Genetics*, и Baudouin-Cornu et al., 2012, *J. Biol. Chem.*).

Устранение гена DUG2 в штамме BY4742 выполняли путем замены на ген URA3 из *Kluyveromyces lactis* (гомолог гена URA3 из *Saccharomyces cerevisiae*), фланкированный 2-мя повторяющимися последовательностями loxP (Фиг. 1).

Для трансформации штамма BY4742 использовали фрагмент ДНК, содержащий кассету LoxP-URA3-LoxP и фланкированный 5'- и 3'-участками гена DUG2;

трансформанты, отобранные по их способности расти на не содержащей урацила синтетической среде, очищали и анализировали для подтверждения замены гена DUG2 на маркерный URA3. Экспрессионную кассету, содержащую гены GSH1 и GSH2, которые кодируют 2 фермента, необходимые для биосинтеза глутатиона, затем встраивали в данный локус, который изначально содержал ген DUG2.

Устранение гена ECM38 (в штамме с уже делетированным DUG2) выполняли путем замены на маркерный ген LEU2 из *Kluyveromyces lactis* (гомолог гена LEU2 из *Saccharomyces cerevisiae*), следуя тем же стадиям, которые описаны для DUG2. В конце, эти 2 маркерных гена URA3 и LEU2 устраняли с использованием последующей индукции рекомбиназы.

Таким образом получали штамм, который, наряду с делецией генов DUG2 и ECM38 (отвечающих за деградацию глутатиона), также содержит дополнительные копии генов GSH1 и GSH2, наличие которых усиливает биосинтез и продуцирование глутатиона.

Пример 3. Конструирование рекомбинантного штамма S. cerevisiae с делецией PEP4

Микроорганизм из предыдущего примера трансформируют фрагментом ДНК, содержащим последовательность (KanMX4), которая придает устойчивость к соединению G418. В результате трансформации указанная последовательность встраивается на место эндогенного гена PEP4, вызывая тем самым нокаут. В случае гаплоидных штаммов результатом является нокаут только одной копии гена PEP4, существующей в геноме микроорганизма; в случае диплоидных дрожжей этот процесс повторяют, чтобы устранить также и вторую копию гена PEP4.

Фрагмент ДНК, использованный для трансформации, содержит последовательность гена KanMX4 (810 пар оснований (п.о.)), фланкированную двумя последовательностями рекомбинационных сайтов FRT (мишени распознавания флиппазой) и двумя участками, гомологичными гену PEP4 (первая часть Фиг. 2), которые служат для обеспечения сайт-специфической рекомбинации данного фрагмента в локус PEP4.

Ген KanMX4 получают путем амплификации из плазмиды pWKW (Storici et al., 1999, Yeast, 15: 271-283) с использованием сайтов связывания праймеров P1 и P2.

Два разных фрагмента ДНК, каждый из которых получают посредством определенной пары олигонуклеотидов, используют для осуществления нокаута каждой из двух копий гена PEP4, присутствующих в геноме микроорганизма.

Для амплификации первого фрагмента и нокаута первой копии гена PEP4 используют следующие олигонуклеотиды:

ПРЯМОЙ 1

TTGTTATCTACTTATAAAAGCTCTCTAGATGGCAGAAAAGGATAGGGCGGAGAAG TAAGAAAAGTTTAGCAAAAATAGGCGTATCACGAG (SEQ ID NO:1),

ОБРАТНЫЙ 1

AAAGAAAAAAAAAAAGCCTAGTGACCTAGTATTTAATCCAAATAAAATTCAAAC AAAAACCAAAACTAACTCGATGATAAGCTGTCAAAC (SEQ ID NO:2).

Для амплификации второго фрагмента и нокаута второй копии гена PEP4 используют следующие олигонуклеотиды:

ПРЯМОЙ 1

TCAAATTGCTTTGGCCAAACCAACCGCATTGTTGCCCAAATCGTAAATAGAATAG TATTTACGCAAGAAGAAAAATAGGCGTATCACGAG (SEQ ID NO:3),

ОБРАТНЫЙ 1

ATGTTCAGCTTGAAAGCATTATTGCCATTGGCCTTGTTGTTGGTCAGCGCCAACCA AGTTGCTGCAAAAGTCGATGATAAGCTGTCAAAC (SEQ ID NO:4).

Полученные таким образом фрагменты 1 и 2 очищают и используют для трансформации микроорганизма методом с применением ацетата лития (Kawai et al., 2010, *Bioeng. Bugs.*, 1(6) 395-403).

Дрожжи трансформируют фрагментом 1 и высевают на среду, состоящую из дрожжевого экстракта, пептона и декстрозы (YPD), содержащую селекционный агент G418; получают и выделяют 3 устойчивые к G418 колонии. Чтобы проверить осуществление трансформации и рекомбинации фрагмента 1 в локус PEP4, эти 3 колонии анализируют посредством амплификации с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), применяя приведенные далее праймеры и условия:

F1 TGATTTCAAATGTTTCTAGAGCGCA (SEQ ID NO:5),

R1 AATGCTGAAATTGGGGCCAA (SEQ ID NO:6),

F2 GCGTTCAAGTAATTTGTCAATGGAA (SEQ ID NO:7),

R2 TTTGAGAAGCCTACCACGTAAGG (SEQ ID NO:8),

K1 R1 TACAATCGATAGATTGTCGCAC (SEQ ID NO:9) используется с F1 и R1,

K2 F2 AGTCGTCACTCATGGTGATT (SEQ ID NO:10) используется с F2 и R2.

Продукты ПЦР анализируют электрофорезом в 0,8%-ном геле, в результате чего идентифицируют фрагмент размером 953 п.о. и фрагмент размером 720 п.о., как и ожидалось.

Эти 3 трансформанта используют для инокуляции жидкой среды YPD и оставляют расти с перемешиванием при 200 оборотах в минуту (об./мин), 30°C, в течение 20 часов. В процессе инкубирования клеток эндогенная система рекомбинации Flp (флиппаза)/*FRT* в *S. cerevisiae* активируется, что приводит к вырезанию гетерологичного гена KanMX4 (Park YN et al., *Yeast*, 28(9), 673-681, 2011). Каждую из этих 3-х культур, соответствующим образом разбавленных, высевают на среду YPD (в отсутствие селективного агента G418). Затем колонии, выращенные на чашках, переносят путем посева реплик на чашки со средой YPD+G418. Колонии, которые не способны расти даже на указанных чашках, представляют собой колонии, утратившие гетерологичный ген KanMX4 вследствие Flp/FRT рекомбинации. Указанные колонии отбирают с исходных чашек со средой YPD и анализируют посредством ПЦР с использованием приведенных далее праймеров и условий:

F1 TGATTTCAAATGTTTCTAGAGCGCA (SEQ ID NO:11),

R2 TTTGAGAAGCCTACCACGTAAGG (SEQ ID NO:12).

Продукты ПЦР анализируют электрофорезом в 0,8%-ном геле, в результате чего идентифицируют фрагмент размером 600 п.о., как и ожидалось, что подтверждает нокаут первой копии гена PEP4.

Пример 4. Конструирование рекомбинантного диплоидного штамма S. cerevisiae

Конструирование штаммов GN2363 (из GN2361), GN2364 (из GN2362) и GN2376 (из GN2373). Методику выполняют на исходных штаммах GN2361, GN2362 и GN2373, как описано в эксперименте 2, получая соответствующие штаммы с делецией PEP4: GN2363, GN2364 и GN2376.

Доказано, что методика воспроизводима и применима к различным штаммам дрожжей.

Дрожжи GN2363 депонируют в Национальную коллекцию культур микроорганизмов (CNCM; от франц.: Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) - институт Пастера (Париж, Международный орган по депонированию согласно

Будапештскому договору) и регистрируют в ней под регистрационным номером **CNCM I-5574**.

Дрожжи GN2364 депонируют в Национальную коллекцию культур микроорганизмов - институт Пастера (Париж, Международный орган по депонированию согласно Будапештскому договору) и регистрируют в ней под регистрационным номером **CNCM I-5575**.

Пример 5. Культивирование дрожжей в лабораторном масштабе и тестирование стабильности GSH

Штаммы GN2361 и GN2363 (исходный и рекомбинантный) культивируют в одних и тех же условиях, используя процесс выращивания в жидкой культуре в колбе Эрленмейера, включающий вегетативную стадию, за которой следует стадия продуцирования.

Вегетативную стадию осуществляют путем инокулирования 0,5 мл исходной суспензии клеток (замороженных и хранившихся при -80°C) в 20 мл среды для вегетативной стадии (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы). Культуры оставляют расти при 28°C в течение 16 часов с перемешиванием при 200 об./мин.

В конце периода инкубации 10 мл культуры с вегетативной стадии используют для инокуляции 90 мл среды для стадии продуцирования (2% дрожжевого экстракта, 8% глюкозы, 0,2% цистеина, 0,2% глицина, 0,2% L-глутамата). Культуры оставляют расти при 28°C в течение 48 часов с перемешиванием при 250 об./мин.

В конце периода инкубации культуры делят на 2 равные аликвоты, чтобы получить 2 равных образца для применения при тестировании стабильности.

Для каждой культуры одну из аликвот незамедлительно подвергают лизису нагреванием и содержание в ней глутатиона и дипептида γ-Glu-Cys анализируют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Вторую аликвоту инкубируют при 25°C в течение 24 часов. После периода инкубации образец подвергают лизису нагреванием и анализируют содержание в ней глутатиона и дипептида γ-Glu-Cys.

Результаты представлены в Таблице 1, где показано среднее значение, полученное для 4 независимых образцов.

Таблица 1

Штамм	Время (часы)	GSH, мг/л	Содержание оставшегося GSH, %	γ-GC, мг/л	Увеличение содержания γ-GC, %

GN2361	0	1083	100	42,7	0
	24	1025	95	90,7	112
GN2363	0	949	100	12,0	0
	24	927	98	14,3	19

Результаты демонстрируют, что штамм GN2363 с делецией PEP4 продуцирует дипептид γ-Glu-Cys в меньшем количестве, и оно остается неизменным даже после инкубирования в течение 24 часов при 25°C. Исходный штамм GN2361 (который содержит ген PEP4) показывает увеличение количеств дипептида γ-Glu-Cys на 112%, а также более выраженную деградацию GSH (содержание оставшегося GSH 95% против 98%).

Пример 6. Культивирование дрожжей в лабораторном масштабе и тестирование стабильности глутатиона в биомассе

Штаммы GN2362 и GN2364 (исходный и рекомбинантный) культивируют в лабораторном масштабе и проводят тестирование неизменности содержания GSH и дипептида γ-Glu-Cys, используя те же методики, которые описаны в примере 4.

Результаты представлены в Таблице 2, где показано среднее значение, полученное для 4 независимых образцов.

Таблица 2

Штамм	Время (часы)	GSH, мг/л	Содержание оставшегося GSH, %	γ-GC, мг/л	Увеличение содержания γ-GC, %
GN2362	0	1147	100	42,1	0
	24	1095	95	79,3	88
GN2364	0	924	100	13,6	0
	24	890	96	15,5	14

Результаты демонстрируют, что штамм GN2364 (Δpep4, соответствующий GN2362) продуцирует дипептид γ-Glu-Cys в меньшем количестве, чем исходный штамм. Увеличение содержания γ-Glu-Cys в случае штамма GN2364 значительно меньше, чем в случае исходного штамма GN2362 (14% против 88% после инкубирования в течение 24 часов).

Пример 7. Культивирование дрожжей в лабораторном масштабе и тестирование стабильности GSH

Штаммы GN2373 и GN2376 (исходный и рекомбинантный) культивируют в лабораторном масштабе и проводят тестирование неизменности содержания GSH и дипептида γ-Glu-Cys, используя те же методики, которые описаны в примере 4.

Результаты представлены в Таблице 3, где показано среднее значение, полученное для 4 независимых образцов.

Таблица 3

Штамм	Время (часы)	GSH, мг/л	Содержание оставшегося GSH, %	γ-GC, мг/л	Увеличение содержания γ-GC, %
GN2373	0	1056	100	41,5	0
	24	1054	100	71,0	71
GN2376	0	926	100	20,9	0
	24	918	99	20,1	-3

Результаты демонстрируют, что рекомбинантный штамм GN2376 продуцирует дипептид γ-Glu-Cys в меньшем количестве, которое остается неизменным даже после инкубирования в течение 24 часов при 25°C. Исходный штамм GN2373 (который все еще содержит ген PEP4) показывает увеличение количества дипептида γ-Glu-Cys на 71%.

Пример 8. Культивирование гаплоидного штамма S. cerevisiae в лабораторном масштабе и тестирование стабильности GSH

Штаммы GN2357 и GN2357-Δpep4 культивируют в лабораторном масштабе и проводят тестирование неизменности содержания GSH и дипептида γ-Glu-Cys, используя те же методики, которые описаны в примере 4.

Результаты представлены в Таблице 4, где показано среднее значение, полученное для 4 независимых образцов.

Таблица 4

Штамм	Время (часы)	GSH, мг/л	Содержание оставшегося GSH, %	γ-GC, мг/л	Увеличение содержания γ-GC, %
GN2357	0	594,1	100	77,0	0

	24	565,7	95	112,5	46
GN2357-Δ*pep4*	0	683,1	100	20,8	0
	24	661,4	97	21,3	2

Результаты демонстрируют, что штамм GN2357-Δpep4 продуцирует дипептид γ-Glu-Cys в меньшем количестве, которое остается неизменным даже после инкубирования в течение 24 часов при 25°C. Напротив, штамм, который все еще содержит ген PEP4, показывает увеличение количества дипептида γ-Glu-Cys на 46%.

Пример 9. Культивирование дрожжей в пилотном масштабе и тестирование стабильности GSH

Штаммы GN2361 и соответствующий ему GN2363 (рекомбинантный, Δpep4) культивируют, используя процесс выращивания в жидкой среде, включающий предвегетативную стадию и вегетативную стадию в колбе Эрленмейера, а также ферментативную стадию и стадию продуцирования в биореакторе.

Предвегетативную стадию проводят так, как описано в примере 4.

Вегетативную стадию проводят путем переноса 0,1 мл культуры с предвегетативной стадии в 400 мл среды для вегетативной стадии (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы) в колбе Эрленмейера. Культуру инкубируют при 28°C в течение 24 часов с перемешиванием при 240 об./мин.

Ферментативную стадию проводят путем переноса в биореактор емкостью 7 л, содержащий среду для стадии продуцирования (дрожжевой экстракт, глюкоза, цистеин, аммоний, фосфат, сульфат и витаминно-минеральные добавки) при 28°C, с аэрированием (1-2 объёма потока воздуха на единицу объёма жидкости в минуту (об./об./мин)) и перемешивают (600-1200 об./мин).

Биомассу культуры с ферментативной стадии собирают, концентрируют до половины ее объема, используя центрифугирование, и повторно вносят в биореактор емкостью 7 л, содержащий среду для стадии продуцирования (глюкоза, аммоний, фосфат, сульфат, цистеин, глицин и глутаминовая кислота) при 28°C, с аэрированием (воздухом, 1 об./об./мин) и перемешивают (600 об./мин).

В конце периода инкубации культуру делят на 4 равные аликвоты, чтобы получить 4 равных образца для применения при тестировании стабильности.

Для каждой культуры одну из аликвот незамедлительно подвергают лизису нагреванием и содержание в ней глутатиона и дипептида γ-Glu-Cys анализируют

методом HPLC. Остальные 3 аликвоты инкубируют при 25°C в течение 24, 48 и 72 часов, соответственно. После каждого периода инкубации образец подвергают лизису нагреванием и анализируют содержание в нем глутатиона и дипептида γ-Glu-Cys.

Результаты представлены в Таблице 5, где показаны данные, полученные с использованием исходного штамма GN2361, и данные двух независимых тестирований с использованием соответствующего штамма генетически модифицированных дрожжей GN2363.

Таблица 5

Штамм	Время (ч)	GSH, %	γ-GC (мг/л)	γ-GC, %
GN2361	0	100	1326	100
	24	68	2983	225
	48	44	2932	221
GN2363, испытание 1	0	100	100	100
	24	92	130	130
	48	71	135	135
GN2363, испытание 2	0	100	180	100
	24	93	278	154
	48	84	270	150

GSH и γ-GC: титр глутатиона и γ-глутамил-цистеина по данным HPLC.

Эти данные демонстрируют повышенную стабильность глутатиона в генетически модифицированных биомассах, с меньшими значениями общей деградации (снижения титра, %) и почти устраненной ферментативной деградацией (небольшим повышением уровня γ-GC).

Пример 10. Культивирование дрожжей в пилотном масштабе и тестирование стабильности GSH

Штамм GN2362 и соответствующий ему штамм GN2364 (модифицированный, Δpep4) культивируют так, как описано в примере 9.

Результаты показаны в приведенной ниже таблице и на Фиг. 3.

Таблица 6

Штамм	Время (ч)	GSH, %	γ-GC (мг/л)	γ-GC, %
GN2362	0	100	1503	100
	24	70	4170	277

	48	56	4451	296
GN2364	0	100	548	100
	24	99	428	78
	48	90	300	55

GSH и γ-GC: титр глутатиона и γ-глутамил-цистеина по данным HPLC.

Эти данные демонстрируют более высокую стабильность глутатиона в генетически модифицированных биомассах, с меньшими значениями общей деградации (снижения титра, %) и почти устраненной ферментативной деградацией (с небольшим повышением уровня γ-GC). В ходе химического процесса наблюдается медленная деградация γ-GC.

В штамме GN2362 в результате лизиса клеток быстро высвобождается протеиназа A, при этом повышение уровня γ-Glu-Cys происходит быстрее, но затем медленно снижается вследствие спонтанной деградации.

В штамме GN2364 повышение уровня γ-Glu-Cys происходит медленнее как в цельных, так и в лизированных клетках.

Пример 11. Ферментация Pichia pastoris и тестирование стабильности глутатиона

Штаммы *Pichia pastoris* X-33 (который содержит PEP4), SMD1168H (который не содержит PEP4) и GN2364 (рекомбинантный *S. cerevisiae*, описанный выше) культивируют в подходящей среде в течение 48 ч при 28°C и 250 об/мин. По окончании ферментации клеточную биомассу собирают центрифугированием и ресуспедируют в деионизованной воде (dH_2O), получая по одной суспензии для каждого штамма.

Готовят концентрированный раствор глутатиона в dH_2O в концентрации 150 г/л. В суспензию клеточной биомассы добавляют одну аликвоту этого концентрированного раствора, получая конечную концентрацию GSH 10 г/л. Клеточную биомассу с добавленным GSH разделяют на аликвоты по 1,5 мл, которые инкубируют при регулируемой температуре 25°C с перемешиванием при 900 об./мин. Образование γ-Glu-Cys регистрируют в течение до 96 часов включительно, анализируя образцы, инкубируемые в течение разных промежутков времени, посредством HPLC. Полученные данные приведены на Фиг. 4.

Эти данные демонстрируют деградацию глутатиона штаммом *Pichia* X-33 с образованием γ-Glu-Cys, в то время как в случае двух штаммов дрожжей, лишенных гена

PEP4, *Pichia* SMD1168H и *Saccharomyces* GN2364, показано одинаковое поведение и не показано повышение продуцирования γ-Glu-Cys.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Дрожжи, генетически модифицированные путем инактивации гена PEP4 (ген вакуолярной протеазы) и по меньшей мере одного гена, вовлеченного в деградацию глутатиона посредством пути с участием γ-глутамилтранспептидазы (γ-GT) или ферментов семейства DUG.

2. Дрожжи по п. 1, где указанный ген, вовлеченный в деградацию глутатиона посредством пути с участием γ-GT или DUG, выбран из ECM38, DUG1, DUG2 и DUG3.

3. Дрожжи по п.п. 1-2, где указанная инактивация гена PEP4 осуществлена путем полной или частичной делеции гена, либо путем мутагенеза, либо путем вставки экзогенной ДНК, в частности, с использованием гомологической рекомбинации с экзогенной ДНК.

4. Дрожжи по любому из п.п. 1-3, являющиеся гаплоидными или диплоидными и в которых инактивированы одна или обе копии гена PEP4.

5. Дрожжи по любому из п.п. 1-4, принадлежащие роду, выбранному из *Saccharomyces* и *Pichia*.

6. Дрожжи по п. 5, выбранные из *S. cerevisiae* и *P. pastoris*.

7. Дрожжи по любому из п.п. 1-6, дополнительно генетически модифицированные путем введения одной или более чем одной дополнительной копии гена GSH1 (гамма-глутамат-цистеинлигаза) или GSH2 (глутатионсинтетаза).

8. Дрожжи по любому из п.п. 1-7, принадлежащие виду *S. cerevisiae*, штамм которого депонирован в Национальную коллекцию культур микроорганизмов (CNCM) - институт Пастера с регистрационным номером CNCM I-5574 или CNCM I-5575.

9. Способ ферментативного получения глутатиона, включающий следующие стадии:

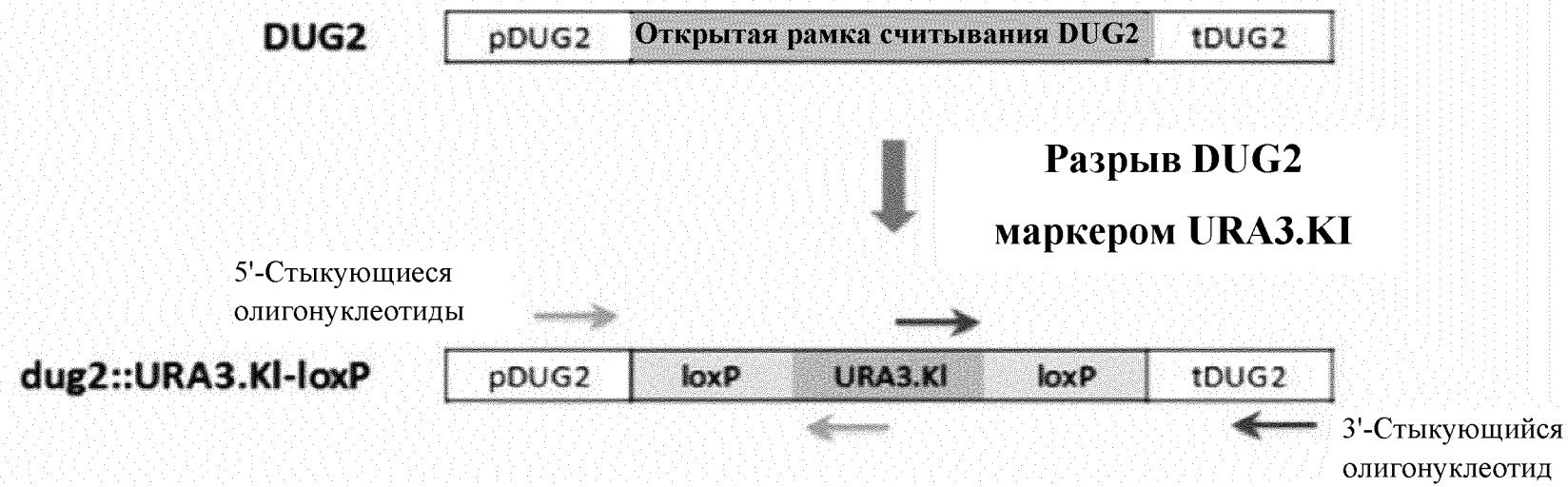
(1) культивирование дрожжей по любому из п.п. 1-7 с образованием тем самым биомассы;

(2) выделение и очистка глутатиона из биомассы.

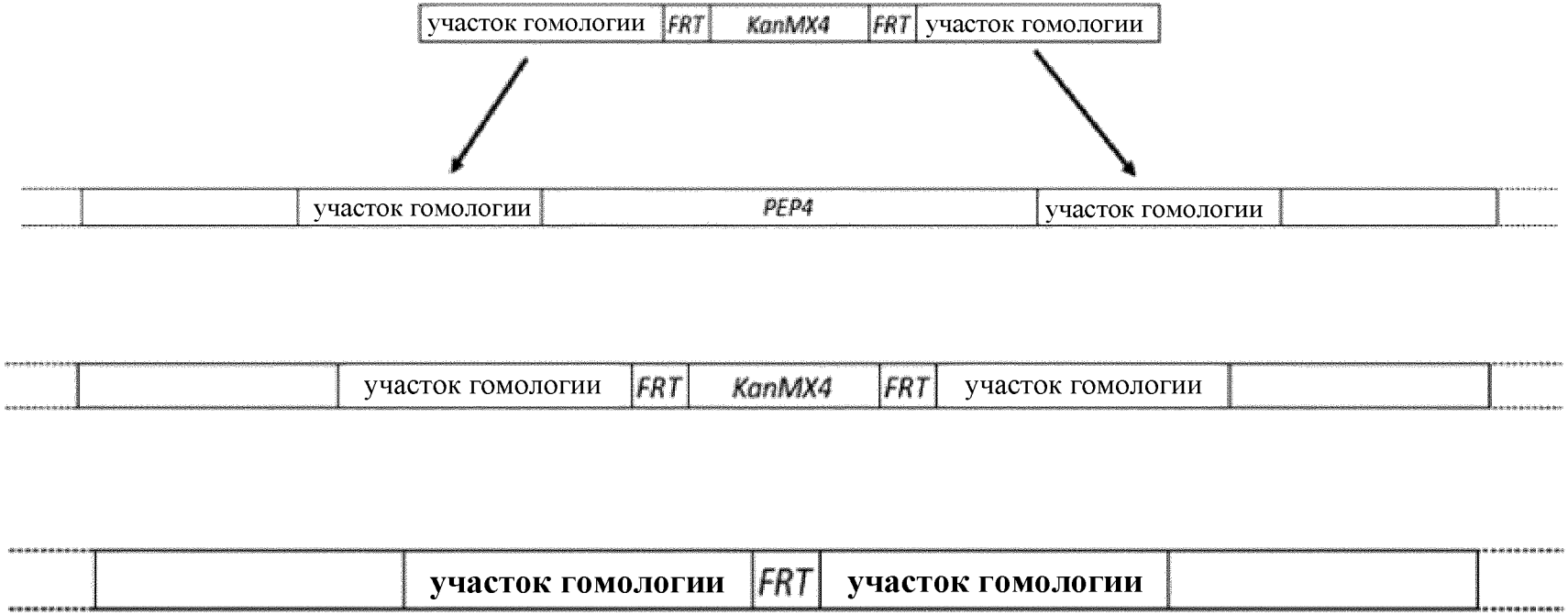
10. Биомасса для получения глутатиона, полученная способом по п. 9, стадия (1).

11. Применение дрожжей по любому из п.п. 1-8 для получения глутатиона.

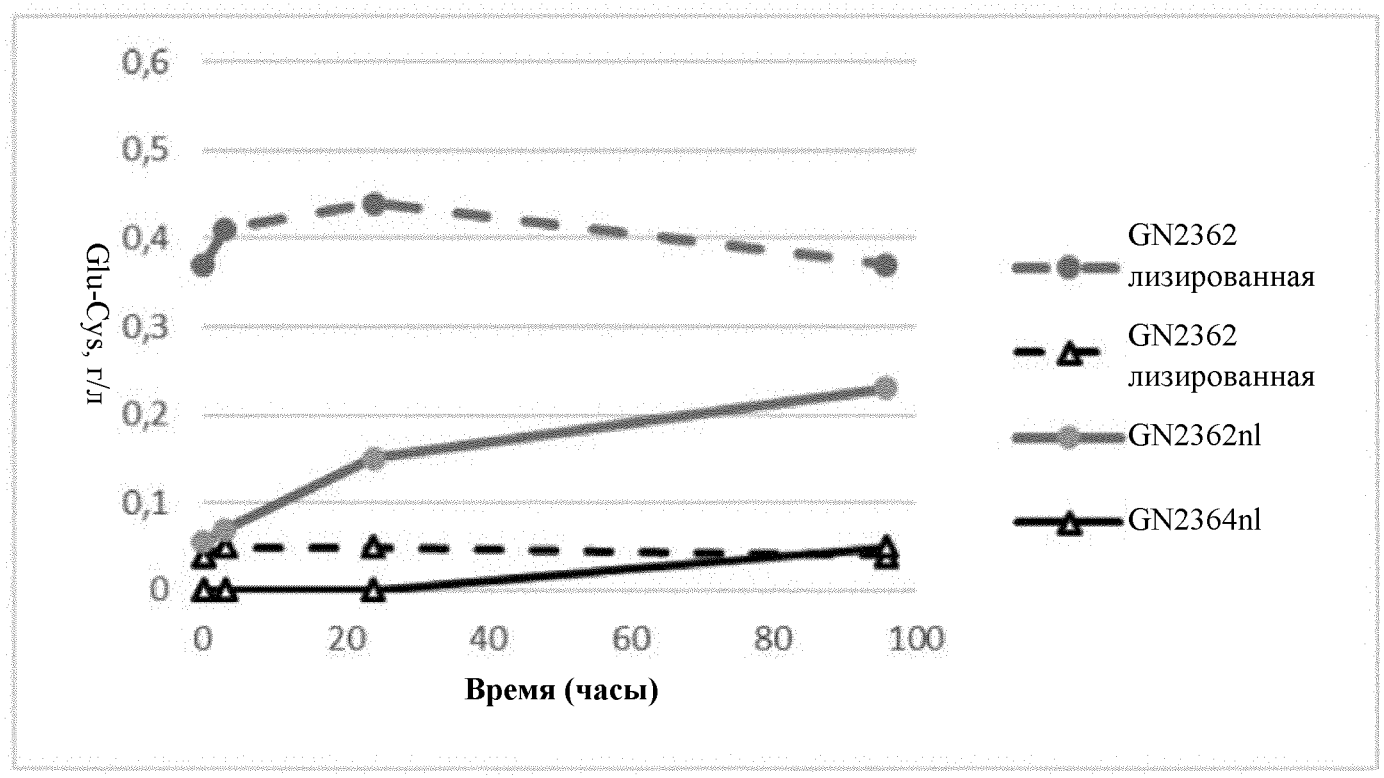
Фиг.1


DUG2
pDUG2
Открытая рамка считывания DUG2
tDUG2
Разрыв DUG2
маркером URA3.KI
5'-Стыкующиеся
олигонуклеотиды
dug2::URA3.KI-loxP
pDUG2
loxP
URA3.KI
loxP
tDUG2
3'-Стыкующийся
олигонуклеотид

Фиг.2


участок гомологии
FRT
KanMX4
FRT
участок гомологии
участок гомологии
PEP4
участок гомологии
участок гомологии
FRT
KanMX4
FRT
участок гомологии
участок гомологии
FRT
участок гомологии

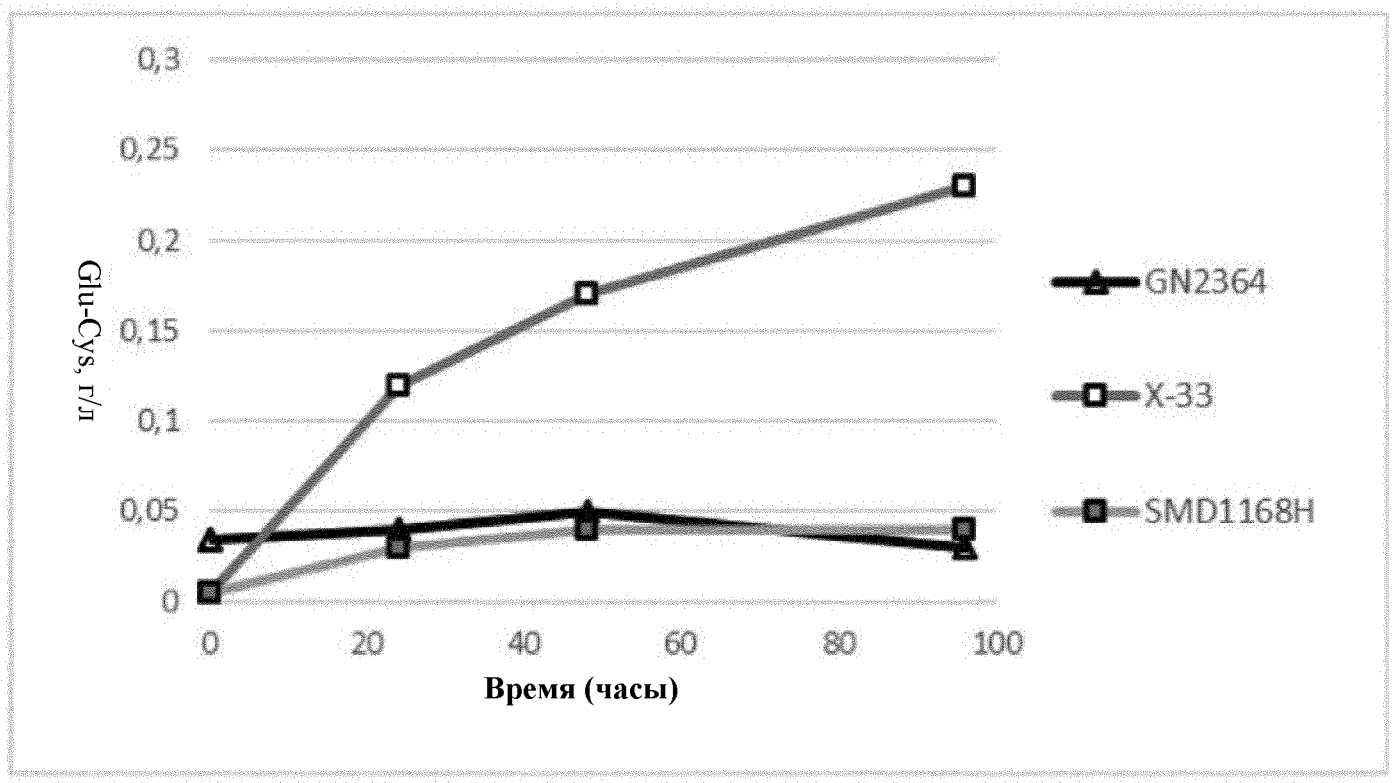
Фиг.3



GN2362 и GN2364: лизированная нагреванием биомасса

GN2362nl и GN2364nl: нелизированная (nl) биомасса

Фиг.4



GN2364: *Saccharomyces cerevisiae*

X-33 и SMD1168H: *Pichia pastoris*