



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108343** (13) **C2**  
(51) МПК (2015.01)  
**C12P 5/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	<b>а 2010 14744</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Кейт А. Уолкер (US), Марк І. Кнут (US), Ноель М. Фонг (US), Пітер Р. Бітем (AU/US)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>22.05.2009</b>	(73) Власник(и):	<b>НУЦЕЛІС ІНК., 6455 Nancy Ridge Drive, Suite 100, San Diego, CA 92121, United States of America (US)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>27.04.2015</b>	(74) Представник:	<b>Дубинський Михайло Ілліч, реєстр. №70</b>
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/055,931</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>US 20070254354 A1, 01.11.2007 US 7183089 B2, 27.02.2007 HIROSHI SHIMADA ET AL: "Increased carotenoid production by the food yeast Candida utilis through metabolic engineering of the isoprenoid pathway.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 64, no. 7, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 2676-2680</b>
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>23.05.2008</b>		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		
(41) Публікація відомостей про заявку:	<b>25.03.2011, Бюл.№ 6</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>27.04.2015, Бюл.№ 8</b>		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2009/045080, 22.05.2009</b>		

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ СКВАЛЕНУ ЗА ДОПОМОГОЮ ДРІЖДЖІВ

### (57) Реферат:

Винахід належить до способу продукування сквалену генетично зміненими жировими дріжджами.

UA 108343 C2



Перехресне посилання на споріднену заявку

Дана заявка на винахід заявляє пріоритет на основі попередньої заявки на патент США № 61/055931, що має назву "Одержання сквалену за допомогою дріжджів", яка подана в Патентне Відомство США 23 травня 2008 р. та повністю включена в даний опис за допомогою посилання для будь-яких цілей.

Галузь техніки

Даний винахід забезпечує способи і композиції для одержання ізопреноїдів, наприклад сквалену, за допомогою дріжджів.

Попередній рівень техніки

Нижченаведений опис галузі техніки винаходу наведений лише з метою полегшення розуміння винаходу, і не передбачається, що він описує або становить попередній рівень техніки винаходу.

Ізопреноїди, наприклад сквален, представляють з комерційної точки зору важливий тип ліпідів. Вони мають чудову змащувальну здатність, стійкість до окиснення, низьку температуру текучості, низьку температуру замерзання, високу температуру спалаху, а також легко піддаються біодеградації. У цей час сквален одержують шляхом екстракції з маслинової олії або жиру печінки холодноводних акул, при високій собівартості одиниці продукції. Через високу собівартість одиниці продукції економічно можливі види застосування сквалену та сквалану (повністю гідрогенізована похідна сквалену) мають вузьке ринкове застосування: як мастило для годинників, лікарський засіб/нутрицевтик, косметичний засіб, парфумерія і проміжні хімічні продукти для дорогих продуктів.

Проте, існують значні потенційні ринки для мастильних матеріалів, присадок для мастил і гідравлічних рідин, що біодеградуються. Здатність таких продуктів до біодеградації особливо важлива для видів застосування, які можуть впливати на навколишнє середовище, наприклад для застосування в сільському господарстві, або ж у випадках, коли можливий витік значної кількості мастильного матеріалу або гідравлічної рідини в навколишнє середовище. Потенційні ринки для мастильних матеріалів, присадок для мастил і гідравлічних рідин, що біодеградуються, досить великі і за оцінкою досягають порядку п'яти мільйонів метричних тонн на рік.

Існують мастильні матеріали, присадки для мастил і гідравлічні рідини, що біодеградуються, отримані з рослинних і тваринних жирів, але вони мають ряд недоліків. Зазвичай вони тверднуть при порівняно високих температурах (тобто вони тверднуть у холодній воді) і мають температуру спалаху, занадто низьку для застосування в гарячих умовах (тобто вони руйнуються або згорають у нормальних умовах гарячого двигуна).

Таким чином, існує потреба в економічному способі одержання сквалену, який давав би можливість великомасштабного виробництва і широкого застосування сквалену і сквалану як мастильних матеріалів, присадок для мастил і гідравлічних рідин, що біодеградуються.

Chang et al., (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 78, 963-72) описують відкриття дріжджів дикого типу, *Pseudozyma* sp. JCC207, які продукують "велику кількість сквалену і деяких поліненасичених жирних кислот". Chang et al. описують виділення *Pseudozyma* sp. JCC207 з морської води, зібраної недалеко від острова Гуам, США, і висловлюють невпевненість у тому, є чи *Pseudozyma* sp. JCC207 новим видом або варіантом *P. regulosa* або *P. aphidis*. У даній статті "ефективність продукування сквалену [*Pseudozyma* sp. JCC207] вивчали за різних умов".

В одному джерелі (Dow Agrosiences LLC, Using Yeast Fermentation to Produce Cost-Effective and Biodegradable Lubricants, <http://statusreports.atp.nist.gov/reports/95-01-0148PDF.pdf>) розкрито, що "компанія пропонує використовувати генну інженерію для зміни метаболічних характеристик жирових (oleaginous) дріжджів для збільшення здатності дріжджів продукувати ізопрени під час біосинтезу". Зокрема, були намічені чотири ферменти: ACCase, гідроксиметилглутарил-КоА-редуктаза (HMGR), скваленсинтетаза та скваленоксидаза.

Патент США № 5460949 розкриває "[a] спосіб підвищення накопичення сквалену і особливих стеролів у дріжджах". Зокрема, він розкриває, що "накопичення сквалену і стеролів підвищується при збільшенні рівня експресії гену, що кодує поліпептид, який має активність HMG-КоА-редуктази".

Короткий опис винаходу

Даний винахід забезпечує композиції і способи одержання сквалену з дріжджів.

Один з аспектів забезпечує генетично модифіковані дріжджі, які продукують ізопреноїди. У деяких варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі продукують сквален.

Пов'язаний з вищезгаданим аспект забезпечує генетично модифіковані дріжджі, причому дріжджі модифіковані таким чином, щоб вони продукували підвищену кількість сквалену, у порівнянні з відповідними нативними дріжджами. У деяких варіантах здійснення вищезгаданих

аспектів генетично модифіковані дріжджі експресують один або більше модифікованих ферментів, що мають одну або більше мутацію. У деяких варіантах здійснення вищезгаданих аспектів рівень експресії одного або більше ферментів у генетично модифікованих дріжджах підвищений або знижений, відносно відповідних нативних дріжджів. У споріднених варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі експресують один або більше модифікованих ферментів, які мають одну або більше мутацій, і рівень експресії одного або більше ферментів у генетично модифікованих дріжджах підвищений або знижений відносно відповідних нативних дріжджів. У деяких кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі відповідно до даного винаходу піддають генній модифікації шляхом введення мутації у фермент за допомогою ген-репаруючого олігонуклеотиду (gene repair oligobase). У деяких варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі відповідно до даного винаходу піддають генній модифікації шляхом введення однієї або більше мутацій безпосередньо в сайт початку трансляції (або поблизу цього сайту) гену, що кодує фермент, наприклад, як описано в заявках на патент США №№ 10/411969 і 11/625586. У деяких варіантах здійснення фермент, модифікований у генетично модифікованих дріжджах відповідно до даного винаходу, включає один або більше ферментів, вибраних з групи, яка складається з ацетил-КоА-карбоксилази (або "ACCCase"), HMG-КоА-редуктази, скваленоксидази, скваленсинтази і АТФ-цитрат-ліази.

Нуклеїнова основа включає основу, яка представляє собою пурин, пиримідин або ж їх похідну або аналог. Нуклеозиди являють собою нуклеїнові основи, які містять залишок пентозофуранозилу, наприклад, можливо заміщений рибозид або 2'-дезоксирибозид. Нуклеозиди можуть бути з'єднані за рахунок однієї з декількох сполучних груп, які можуть містити або не містити фосфор. Нуклеозиди, з'єднані за рахунок незаміщених фосфодіефірних зв'язків, називаються нуклеотидами. Використовуваний у даному описі термін "нуклеїнові основи" включає пептидо-нуклеїнові основи, субдиниці пептидо-нуклеїнових кислот і морфоліно-нуклеїнові основи, а також нуклеозиди і нуклеотиди.

Олігонуклеотид являє собою полімер нуклеїнових основ, причому цей полімер здатний до гібридизації за рахунок спарювання основ за Уотсоном-Криком з ДНК, що має комплементарну послідовність. Ланцюг олігонуклеїнової основи має єдині 5'- і 3'-кінці, які є крайніми нуклеїновими основами полімеру. Зокрема, ланцюг олігонуклеїнової основи може містити нуклеїнові основи будь-якого типу. З'єднання олігонуклеїнової основи являє собою з'єднання, що включає один або більше ланцюгів олігонуклеїнової основи, які є комплементарними і гібридизовані за допомогою спарювання основ за Уотсоном-Криком. Нуклеїнові основи можуть бути або ДНК-типу, або РНК-типу. Рибонуклеїнові основи являють собою нуклеїнові основи, що містять пентозофуранозил, причому вуглець у положенні 2' являє собою гідрокси-, алкокси- або галоген-заміщений метилен. Дезоксирибонуклеїнові основи являють собою нуклеїнові основи іншого типу, ніж рибонуклеїнові основи, і включають усі нуклеїнові основи, які не містять залишок пентозофуранозилу.

Нитка олігонуклеїнової основи зазвичай включає обидва ланцюги олігонуклеїнових основ і сегменти або ділянки ланцюгів олігонуклеїнових основ. Нитка олігонуклеїнової основи має 3'-кінець і 5'-кінець. У випадку якщо нитка олігонуклеїнової основи має однакову довжину з ланцюгом, 3'- і 5'-кінці нитки є також 3'- і 5'-кінцями ланцюга.

Термін "ген-репаруючий олігонуклеотид" у даному тексті відноситься до олігонуклеотидів, включаючи змішані дуплексні олігонуклеотиди, не-нуклеотид вмісних молекул, одноланцюгові олігодезоксинуклеотиди та інші ген-репаруючі молекули, детально описані нижче.

У деяких варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі відповідно до даного винаходу виведені з жирових дріжджів. У деяких кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі відповідно до даного винаходу виведені з дріжджів, вибраних із групи, яка складається з *Cryptococcus curvatus*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinus* і *Rhodosporidium toruloides*. У деяких кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі виведені з дріжджів, вибраних із групи, яка складається з *Cryptococcus curvatus*, *Yarrowia lipolytica* і *Rhodotorula glutinus*. У споріднених варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі виведені з дріжджів, вибраних із групи, яка складається з *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinus*. У деяких кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі виведені не з *Yarrowia lipolytica*.

У деяких кращих варіантах здійснення фермент, який модифікують у генетично модифікованих дріжджах відповідно до даного винаходу, являє собою ацетил-КоА-карбоксилазу (або "ACCCase"). У деяких кращих варіантах здійснення ацетил-КоА-карбоксилаза в генетично модифікованих дріжджах модифікована таким чином, що її активність та/або експресія знижені, відносно відповідних нативних дріжджів; або ж така активність та/або експресія еліміновані. В інших варіантах здійснення ацетил-КоА-карбоксилазу можна модифікувати таким чином, щоб

змінити її субстратну селективність. У деяких кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі модифіковані таким чином, що активність та/або експресія ацетил-КоА-карбоксилази знижені, відносно відповідних нативних дріжджів, а активність не елімінована. У деяких кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі модифіковані таким

5 чином, що активність та/або експресія ацетил-КоА-карбоксилази в генетично модифікованих дріжджах знижені приблизно до 90 %; або приблизно до 80 %; або приблизно до 70 %, або приблизно до 60 %, або приблизно до 50 %; або приблизно до 40 %; або приблизно до 30 %; або приблизно до 20 %; або приблизно до 10 % або приблизно до 5 % від активності та/або експресії у відповідних нативних дріжджах. У споріднених варіантах здійснення генетично

10 модифіковані дріжджі модифіковані таким чином, що активність та/або експресія ацетил-КоА-карбоксилази в генетично модифікованих дріжджах знаходяться в інтервалі 90-95 %; або 80-90 %, або 70-80 %; 60-70 %; або 50-60 %; або 40-50 %; або приблизно 30-40 %; або приблизно 20-30 %; приблизно 10-20 %; або приблизно 5-10 %, або приблизно 2-5 % від активності та/або експресії у відповідних нативних дріжджах.

15 У деяких кращих варіантах здійснення фермент, який модифікують у генетично модифікованих дріжджах відповідно до даного винаходу, являє собою HMG-КоА-редуктазу. У деяких кращих варіантах здійснення HMG-КоА-редуктази в генетично модифікованих дріжджах модифікована таким чином, що її активність та/або експресія підвищена, відносно відповідних нативних дріжджів. В інших варіантах здійснення HMG-КоА-редуктазу можна модифікувати

20 таким чином, щоб змінити її субстратну селективність. У деяких кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі модифіковані таким чином, що активність та/або експресія HMG-КоА-редуктази в генетично модифікованих дріжджах збільшені щонайменше в 1,2 рази; або в 1,5 рази, або в 2 рази; або в 3 рази, або в 4 рази; або в 5 разів; або в 10 разів; або в 20 разів; або в 50 разів; або в 100 разів, або в 1000 разів; або в 10000 разів, або в 100000 разів,

25 або в 100000 разів, у порівнянні з активністю та/або експресією у відповідних нативних дріжджах.

У деяких кращих варіантах здійснення фермент, який модифікують у генетично модифікованих дріжджах відповідно до даного винаходу, являє собою скваленепоксидазу. У деяких кращих варіантах здійснення скваленепоксидази в генетично модифікованих дріжджах

30 модифікована таким чином, що її активність та/або експресія знижені, відносно відповідних нативних дріжджів, або ж таким чином, що її активність та/або експресія еліміновані. В інших варіантах здійснення скваленепоксидазу можна модифікувати таким чином, щоб змінити її субстратну селективність. У деяких кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі модифіковані таким чином, що активність та/або експресія скваленепоксидази знижені,

35 відносно відповідних нативних дріжджів, але активність не елімінована. У деяких кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі модифіковані таким чином, що активність та/або експресія скваленепоксидази в генетично модифікованих дріжджах знижені приблизно до 90 %; або приблизно до 80 %; або приблизно до 70 %; або приблизно до 60 %; або приблизно до 50 %; або приблизно до 40 %; або приблизно до 30 %; або приблизно до 20 %;

40 або приблизно до 10 %; або приблизно до 5 % від активності та/або експресії у відповідних нативних дріжджах. У споріднених варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі модифіковані таким чином, що активність та/або експресія скваленепоксидази в генетично модифікованих дріжджах знаходяться в інтервалі 90-95 %; або 80-90 %; або 70-80 %; 60-70 %; або 50-60 %; або 40-50 %; або приблизно 30-40 %; або приблизно 20-30 %; приблизно 10-20 %;

45 або приблизно 5-10 %; або приблизно 2-5 % від активності та/або експресії у відповідних нативних дріжджах.

У деяких кращих варіантах здійснення фермент, який модифікують у генетично модифікованих дріжджах відповідно до даного винаходу, являє собою скваленсинтазу. У деяких кращих варіантах здійснення скваленсинтази в генетично модифікованих дріжджах

50 модифікована таким чином, що її активність та/або експресія підвищені відносно відповідних нативних дріжджів. В інших варіантах здійснення скваленсинтазу можна модифікувати таким чином, щоб змінити її субстратну селективність. У деяких кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі модифіковані таким чином, що активність та/або експресія скваленсинтази в генетично модифікованих дріжджах підвищені щонайменше в 1,2 рази; або в 1,5 рази; або в 2 рази; або в 3 рази; або в 4 рази; або в 5 разів; або в 10 разів; або в 20 разів;

55 або в 50 разів; або в 100 разів; або в 1000 разів; або в 10000 разів; або в 100000 разів; або в 1000000 разів, у порівнянні з активністю та/або експресією відповідних нативних дріжджів.

У деяких кращих варіантах здійснення фермент, який модифікують у генетично модифікованих дріжджах відповідно до даного винаходу, являє собою АТФ-цитрат-ліазу. У деяких варіантах здійснення або одна з субодиниць, або обидві субодиниці генів АТФ-цитрат-

60

ліази (наприклад, АТФ-цитрат-ліаза *Yarrowia lipolytica*; Genoleveres YALI0D24431g і YALI0E34793g) модифіковані, як описано тут. У деяких варіантах здійснення активність АТФ-цитрат-ліази в модифікованих дріжджах підвищують за рахунок вставки та/або гетерологічної експресії гену АТФ-цитрат-ліази тварин, що включає єдину субодиницю холоферменту. У деяких кращих варіантах здійснення АТФ-цитрат-ліаза в генетично модифікованих дріжджах модифікована таким чином, що її активність та/або експресія підвищені відносно відповідних нативних дріжджів. У деяких кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі модифіковані таким чином, що активність та/або експресія АТФ-цитрат-ліази в генетично модифікованих дріжджах підвищені щонайменше в 1,2 рази; або в 1,5 рази; або в 2 рази; або в 3 рази; або в 4 рази; або в 5 разів; або в 10 разів; або в 20 разів; або в 50 разів; або в 100 разів; або в 1000 разів; або в 10000 разів; або в 100000 разів; або в 1000000 разів, у порівнянні з активністю та/або експресією відповідних нативних дріжджів.

У деяких кращих варіантах здійснення вищезгаданих аспектів генетично модифіковані дріжджі являють собою генетично модифіковані дріжджі; в інших кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі являють собою трансгенні дріжджі. Ще одним варіантом здійснення є дріжджі, які включають як трансгенні, так і генетичні зміни.

Використовуваний в даному описі вираз "генетично модифіковані дріжджі" відноситься до трансгенних дріжджів або до генетично модифікованих дріжджів.

Використовуваний в описі термін "нативні дріжджі" відноситься до дріжджів, які не були генетично модифіковані (тобто, змінені трансгенно або генетично). Нативні дріжджі включають дріжджі дикого типу, а також такі дріжджі, які були селективно виведені для одержання особливих характеристик.

Вираз "трансгенні дріжджі" відноситься до дріжджів, що включають ген з дріжджів іншого виду або ж видів, що не є дріжджами. Такий ген можна позначити як "трансген".

Використовуваний у даному описі термін "цільовий ген" відноситься до гену, що кодує фермент, який слід модифікувати.

Вираз "генетично модифіковані дріжджі" відноситься до дріжджів, що включають одну або більше генетичних модифікацій, наприклад трансгени та/або модифіковані ферменти, які містять одну або більше бажаних мутацій(ій). Такі бажані мутації можуть приводити до модифікованих ферментів, що мають активність, відмінну від нативного ферменту. Подібні відмінності можуть включати відмінності в субстратній специфічності або рівні активності. Використовуваний в описі термін "трансгенні дріжджі" представляє один з типів "генетично модифікованих дріжджів".

Вираз "жирові дріжджі" відноситься до дріжджів, які містять щонайменше близько 20 % від сухої клітинної ваги (CDW, cell dry weight) ліпідів, що екстрагуються з клітин. Здатність накопичувати ліпіди на рівні щонайменше близько 20 % CDW не обмежена конкретними генами; більше ніж приблизно 20 % CDW повідомлялося в *Lipomyces lipofer*, *L. starkeyi*, *L. tetrasporus*, *Candida lipolytica*, *C. diddensiae*, *C. paralipolytica*, *C. curvata*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula graminus*, *Trichosporon pullulans*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinus*, *Rhodotorula gracilis* і *Yarrowia lipolytica*. Див., наприклад: Tatsumi, et al. патент США № 4032405, а також Rattray, *Microbial Lipids*, Vol. 1 (1998).

Використовуваний в описі термін "приблизно" означає в кількісному вираженні плюс або мінус 10 %. Наприклад, "приблизно 3 %" буде включати 2,7-3,3 %, а "приблизно 10 %" буде включати 9-11 %.

Якщо не зазначено інше, будь-яке наведене в описі відсоткове відношення являє собою частку у відсотках за масою.

Інші ознаки і переваги даного винаходу стануть очевидні з нижченаведеного опису кращих варіантів здійснення, а також з формули винаходу.

Докладний опис винаходу

Підвищена кількість ізопреноїдів, що продукуються генетично модифікованими дріжджами, може бути результатом мутації або модифікації одного або більше ферментів, що брав участь у біосинтезі ізопреноїдів. Наприклад, можна проводити модифікацію або мутацію ацетил-КоА-карбоксилази (або "ACCase"), HMG-КоА-редуктази, скваленепоксидази і скваленсинтази.

У кращих варіантах здійснення генетично модифіковані дріжджі, що експресують модифікований фермент, одержують шляхом введення мутації в молекулу ферменту шляхом застосування ген-репаруючого олігонуклеотиду, як описано тут. Даний спосіб включає (і) введення ген-репаруючого олігонуклеотиду, що містить специфічну мутацію для цільового гену, який цікавить, у дріжджову клітину за допомогою будь-якого зі способів, добре відомих у даній галузі техніки (наприклад, за допомогою мікроносіїв, мікроволокон, електропорації, мікроін'єкції, LiOAc, біолистики, сферопластингу (spheroplasting) та/або агробактерій (див., наприклад,

McClelland, CM., Chang, Y.C., and Kwon-Chung, KJ. (2005) *Fungal Genetics and Biology* 42:904-913) і (ii) ідентифікацію клітини, що містить мутований ензим.

Один з пунктів формули винаходу забезпечує ізопреноїди, екстраговані з генетично модифікованих дріжджів, розкритих у даному описі. Пов'язаний з ним пункт забезпечує сквален, екстрагований з генетично модифікованих дріжджів, як описано тут.

Інший пункт формули винаходу забезпечує спосіб одержання ізопреноїдів, переважно сквалену. У деяких варіантах здійснення спосіб включає забезпечення генетично модифікованих дріжджів, як описано тут, і екстракцію сквалену з дріжджів.

Ще один варіант здійснення вищезгаданих аспектів винаходу забезпечує ізопреноїди, екстраговані з вищезгаданих генетично змінених або трансгенних дріжджів.

#### Типи дріжджів

Розкриті в описі композиції і методи можуть мати в основі будь-який з багатьох видів або штамів дріжджів. У деяких варіантах здійснення дріжджі являють собою жирові дріжджі. Наприклад, це можуть бути дріжджі *Cryptococcus curvatus* (наприклад, ATCC 20508), *Yarrowia lipolytica* (наприклад, ATCC 20688 або ATCC 90811), *Rhodotorula glutinis* (наприклад, ATCC 10788 або ATCC 204091) і *Rhodosporidium toruloides*. Автори винаходу виявили, що відносно конкретних дріжджів інших типів (наприклад, *Yarrowia lipolytica*), *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* ростуть до дуже високої клітинної щільності у різноманітних субстратах і продукують велику кількість сумарних ліпідів при великій різноманітності культуральних умов. Відповідно, у деяких варіантах здійснення *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* можуть бути особливо кращі для композицій і способів, розкритих у даному описі. Існує множина генетичних підходів (наприклад, протоколи трансформації, селекційовані маркери), які добре розроблені і спеціально призначені для *Yarrowia lipolytica*; так, у деяких варіантах здійснення *Yarrowia lipolytica* можуть бути особливо кращі для композицій і способів, розкритих у даному описі.

#### Ген-репаруючі олігонуклеотиди

Даний винахід можна здійснювати за допомогою "ген-репаруючого олігонуклеотиду" що має конформацію та хімічні особливості, детально описані нижче. "Ген-репаруючі олігонуклеотиди" відповідно до винаходу включають змішані дуплексні олігонуклеотиди, не-нуклеотид вмісні молекули, одноланцюгові олігодезоксинуклеотиди та інші ген-репаруючі молекули, описані в зазначених нижче патентах і публікаціях патентів. "Ген-репаруючі олігонуклеотиди" відповідно до винаходу були також описані в опублікованій науковій і патентній літературі під іншими назвами, включаючи "рекомбінагенні олігонуклеотиди", "РНК/ДНК химерні олігонуклеотиди"; "химерні олігонуклеотиди"; "змішані дуплексні олігонуклеотиди (MDONs)»; "РНК ДНК олігонуклеотиди (RDOs)»; "націлені на ген олігонуклеотиди"; "генопласти" ("genoplasts"), "одноланцюгові модифіковані олігонуклеотиди"; "одноланцюгові олігодезоксинуклеотидні мутаційні вектори"; "дуплексні мутаційні вектори", а також "гетеродуплексні мутаційні вектори".

Олігонуклеотиди, що мають конформацію і хімічну природу, які описує Kmies у патенті США № 5565350 (Kmies I), а також у патенті США № 5731181 (Kmies II), включених у даний опис за допомогою посилання, підходять для застосування як "ген-репаруючі олігонуклеотиди" відповідно до винаходу. Ген-репаруючі олігонуклеотиди в Kmies I та/або Kmies II містять дві комплементарні нитки, одна з яких містить щонайменше один сегмент нуклеотидів РНК-типу ("РНК-сегмент"), які утворюють пари з нуклеотидами ДНК-типу іншої нитки.

У джерелі Kmies II розкрито, що не-нуклеотидні ланки, які містять пуринову або піримідинову основу, можна замінювати нуклеотидами. Додаткові ген-репаруючі молекули, які можна застосовувати в даному винаході, описані в патентах США №№ 5756325, 5871984, 5760012, 5888983, 5795972, 5780296, 5945339, 6004804 і 6010907; у міжнародній заявці на патент № PCT/USOO/23457; і в Міжнародних патентних публікаціях №№ WO 98/49350, WO 99W865, WO 99/58723, WO 99/58702 і WO 99/40789. Кожне з цих джерел повністю включене у даний опис.

В одному варіанті здійснення ген-репаруючий олігонуклеотид являє собою змішаний дуплексний олігонуклеотид, у якому нуклеотиди РНК-типу змішаного дуплексного олігонуклеотиду набули стійкості до дії РНК-ази за рахунок заміни 2'-гідроксилу на фтор-, хлор- або бром-групу або за рахунок введення замісника в положення 2'-О. Придатні замісники, включають замісники, розкриті в Kmies II. Інші варіанти замісників включають замісники, розкриті в патенті США № 5334711 (Sproat) і замісники, розкриті в патентних публікаціях EP 629 387 і EP 679 657 (спільно, заявки Martin), які включені в даний опис за допомогою посилання. У даному тексті 2'-фтор-, хлор- або бром-похідна рибонуклеотиду, або рибонуклеотид, що містить замісник при 2'-ОН, описаний у заявках Martin або в Sproat, позначені терміном "2'-заміщений рибонуклеотид". Використовуваний в описі термін "нуклеотид РНК-типу" позначає 2'-гідроксильний або 2'-заміщений нуклеотид, який приєднаний до інших нуклеотидів змішаного

дуплексного олігонуклеотиду за рахунок незаміщеного фосфодіефірного зв'язку або за рахунок будь-яого зі зв'язків, що не зустрічаються в природі, розкритих в Кміес I або Кміес II. Використовуваний в описі термін "нуклеотид ДНК-типу" позначає нуклеотид, що містить 2'-Н, який можна приєднати до інших нуклеотидів ген-репаруючого олігонуклеотиду за допомогою

5 незаміщеного фосфодіефірного зв'язку або за допомогою будь-якого зі зв'язків, що не зустрічаються в природі, розкритих в Кміес I або Кміес II.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу ген-репаруючий олігонуклеотид являє собою змішаний дуплексний олігонуклеотид, який приєднаний винятково за рахунок незаміщених фосфодіефірних зв'язків. В альтернативних варіантах здійснення приєднання

10 здійснюється за рахунок заміщених фосфодіефірів, похідних фосфодіефірів і фосфор-невмісних зв'язків, розкритих в Кміес II. У ще одному варіанті здійснення будь-який нуклеотид РНК-типу в змішаному дуплексному олігонуклеотиді являє собою 2'-заміщений нуклеотид. Особливо кращими варіантами 2'-заміщених рибонуклеотидів є 2'-фтор-, 2'-метокси-, 2'-пропілокси-, 2'-алілокси-, 2'-гідроксилетилокси-, 2'-метоксиетилокси-, 2'-фторпропілокси- і 2'-трифторпропілокси-заміщені рибонуклеотиди. Найбільш кращими варіантами 2'-заміщених

15 рибонуклеотидів є 2'-фтор-, 2'-метокси-, 2'-метоксиетилокси- і 2'- алілокси-заміщені нуклеотиди. В іншому варіанті здійснення змішаний дуплексний олігонуклеотид з'єднаний за допомогою незаміщених фосфодіефірних зв'язків.

Незважаючи на те, що змішані дуплексні олігонуклеотиди, що містять єдиний тип 2'-заміщених нуклеотидів РНК-типу, синтезуються легше, способи згідно з винаходом можна здійснювати на практиці також зі змішаними дуплексними олігонуклеотидами, що містять два і більше різновидів нуклеотидів РНК-типу. На функцію РНК-сегменту може не впливати переривання, обумовлене введенням дезоксинуклеотиду між двома тринуклеотидами РНК-типу, відповідно, термін "РНК-сегмент" включає в себе такі фрагменти, як "РНК-сегмент з перериванням". Сегмент РНК без переривання позначають терміном "безперервний сегмент РНК". В іншому варіанті здійснення сегмент РНК може містити стійкі до РНК-ази і незаміщені 2'-ОН нуклеотиди, що чергуються. Змішані дуплексні олігонуклеотиди переважно містять менше

20 100 нуклеотидів і, більш переважно, менше 85 нуклеотидів, але більше, ніж 50 нуклеотидів. Перша і друга нитка утворюють комплементарну пару за Уотсоном-Криком. В одному варіанті здійснення нитки змішаного дуплексного олігонуклеотиду ковалентно пов'язані з допомогою лінкеру, наприклад, одноланцюгового гекса-, пента- або тетрануклеотиду, таким чином, що перша і друга нитки є сегментами єдиного олігонуклеотидного ланцюгу, що має один 3'-кінець і один 5'-кінець. 3'- і 5'-кінці можна захищати шляхом додавання "кеп-шпильки" (hairpin cap), причому 3'- і 5'-кінцеві нуклеотиди утворюють комплементарну пару основ за Уотсоном-Криком з суміжними нуклеотидами. Другу кап-шпильку можна додатково помістити в місці з'єднання між

25 першим і другим ланцюгом, віддалено від 3'- і 5'-кінців, так щоб спарювання основ за Уотсоном-Криком між першою і другою нитками було стабілізовано.

Перша і друга нитки містять дві ділянки, які гомологічні двом фрагментам цільового гену, тобто мають таку ж послідовність, як і цільовий ген. Гомологічна ділянка містить нуклеотиди сегменту РНК і може містити один або більше нуклеотидів ДНК-типу в з'єднуючому сегменті ДНК, а також може містити нуклеотиди ДНК-типу, розташовані за межами проміжного сегменту. Дві ділянки гомології розділені за допомогою і примикають до ділянки з послідовністю, що відрізняється від послідовності цільового гену, який позначений терміном "гетерологічна ділянка". Гетерологічна ділянка може містити один, два або три неспівпадаючі нуклеотиди.

30 Неспівпадаючі нуклеотиди можуть примикати один до одного або, можливо, можуть бути розділеними одним або двома нуклеотидами, які гомологічні цільовому гену. Як варіант, гетерологічна ділянка може також містити вставку з одного, двох, трьох або п'яти або менше нуклеотидів. В іншому варіанті послідовність змішаного дуплексного олігонуклеотиду може відрізнятися від послідовності цільового гену тільки делецією одного, двох, трьох або п'яти або

35 менше нуклеотидів у змішаному дуплексному олігонуклеотиді. Передбачається, що довжина і положення гетерологічної ділянки в цьому випадку відповідають довжині делеції, навіть якщо жоден нуклеотид змішаного дуплексного олігонуклеотиду не присутній у межах гетерологічної ділянки. Відстань між фрагментами цільового гену, які комплементарні двом гомологічним ділянкам, у точності дорівнює довжині гетерологічної ділянки, якщо передбачається зробити заміну або заміни. Якщо гетерологічна ділянка містить вставку, гомологічні ділянки при цьому розділені в змішаному дуплексному олігонуклеотиді і знаходяться одна від іншої далі, ніж їх комплементарні гомологічні ділянки в гені, і навпаки, у випадку якщо гетерологічна ділянка кодує делецію.

Кожний з сегментів РНК змішаних дуплексних олігонуклеотидів є частиною гомологічної ділянки, тобто ділянки, яка ідентична за своєю послідовністю ділянці цільового гену, причому

40 45 50 55 60



такі сегменти переважно містять разом щонайменше 13 нуклеотидів РНК-типу, більш переважно, від 16 до 25 нуклеотидів РНК-типів або, ще більш переважно, 18-22 нуклеотидів РНК-типу, і найбільш переважно, 20 нуклеотидів. В одному варіанті здійснення сегменти РНК гомологічних ділянок розділені за допомогою і примикають до, тобто, "з'єднані за допомогою"

5 перехідного сегменту ДНК. В одному варіанті здійснення будь-який нуклеотид гетерологічної ділянки являє собою нуклеотид перехідної ділянки ДНК. Перехідну ділянку ДНК, що містить гетерологічну ділянку змішаного дуплексного олігонуклеотиду, позначають терміном "мутаторний сегмент".

В іншому варіанті здійснення даного винаходу ген-репаруючий олігонуклеотид являє собою

10 мутаційний вектор одноланцюгового олігодезоксинуклеотиду (SSOMV, single stranded oligodeoxynucleotide mutational vector), розкритий у міжнародній заявці на патент РСТ/US00/23457, патентах США №№ 6271360, 6479292 і 7060500, які повністю включені в даний опис шляхом посилання. Послідовність SSOMV заснована на тих же принципах, що і мутаторні вектори, описані в патентах США №№ 5756325, 5871984, 5760012, 5888983, 5795972,

15 5780296, 5945339, 6004804 і 6010907, а також у міжнародних публікаціях №№ WO 98/49350, WO 99/07865, WO 99/58723, WO 99/58702 і WO 99/40789. Послідовність SSOMV містить дві ділянки, гомологічної цільової послідовності, розділені ділянкою, що містить бажану генетичну зміну, яку позначають терміном "мутаторна ділянка". Мутаторна ділянка може мати послідовність такої ж довжини, як і послідовність, яка розділяє гомологічні ділянки в

20 послідовності цільового гену, але має іншу послідовність. Така мутаторна ділянка може викликати заміну. В іншому варіанті гомологічні ділянки в SSOMV можуть примикати одна до іншої, у той час як ділянки в цільовому гені, що мають однакову послідовність, розділено одним, двома або більше нуклеотидами. Такий SSOMV викликає делецію в цільовому гені тих нуклеотидів, які відсутні в SSOMV. Нарешті, послідовність цільового гену, яка ідентична

25 гомологічним ділянкам, може примикати в цільовому гені, але бути розділеною одним, двома або більше нуклеотидами в послідовності SSOMV. Такий SSOMV викликає вставку в послідовність цільового гену.

Нуклеотиди SSOMV являють собою дезоксирибонуклеотиди, які зв'язані за рахунок немодифікованих фосфодіефірних зв'язків, за винятком того, що 3'-кінцевий та/або 5'-кінцевий

30 міжнуклеотидний зв'язок або, як варіант, два 3'-кінцевих та/або 5'-кінцевих міжнуклеотидних зв'язки можуть бути фосфоротіоатними або фосфоамідатними. Використовуваний в описі термін "міжнуклеотидний зв'язок" являє собою зв'язок між нуклеотидами SSOMV і не включає зв'язок між 3'-кінцевим нуклеотидом або 5'-кінцевим нуклеотидом і блокувальним замісником, див. вище. В одному варіанті здійснення довжина SSOMV знаходиться між 21 і 55

35 дезоксинуклеотидами, а довжини гомологічних ділянок, відповідно, становлять загальну довжину щонайменше 20 дезоксинуклеотидів, і щонайменше дві гомологічних ділянки повинні мати довжину, що становить для будь-якого з них щонайменше 8 дезоксинуклеотидів.

SSOMV можна розробити так, щоб він був комплементарним кодуєчій або некодуєчій нитці цільового гену. Якщо бажаною мутацією є заміна єдиної основи, переважно, щоб обидва

40 мутаторних нуклеотиди були піримідиновими. У тих випадках, які відповідають одержанню потрібної функціональності, є кращим, щоб мутаторний нуклеотид і цільовий нуклеотид у комплементарній нитці були піримідиновими. Особливо кращі SSOMV, які кодують трансверсійні мутації, тобто, С- або Т-мутаторний нуклеотид не співпадає, відповідно, з С- або Т-нуклеотидом у комплементарній нитці.

На додаток до олігодезоксинуклеотидів SSOMV може містити 5'-блокувальний замісник, який приєднаний до 5'-кінцевим вуглецам за допомогою лінкеру. Хімічна структура лінкеру не має великого значення; важливо, щоб його довжина переважно становила щонайменше 6

45 атомів і щоб лінкер був гнучким. Можна застосовувати різноманітні нетоксичні замісники, такі як біотин, холестерин або інші стероїди, або ж неінтеркалюючий катіонний флуоресцентний барвник. Особливо кращими як реагенти для створення SSOMV є реагенти, наявні в продажу за

50 назвою Cy3.TM. і Cy5.TM. (Glen Research, Sterling Va.), що являють собою блоковані фосфороамідити, які при впровадженні в олігонуклеотид дають 3,3,3',3'-тетраметил-N, N'-ізопропіл-заміщені індомонокарбоціаніновий і індодикарбоціаніновий барвники, відповідно. Найбільше кращий Cy3. Якщо індокарбоціанін є N-оксіалкіл-заміщеним, його легко можна

55 приєднати до 5'-кінця олігодезоксинуклеотиду за рахунок фосфодіефірного зв'язку за допомогою 5'-кінцевого фосфату. Хімічна природа лінкеру барвника між барвником і олігодезоксинуклеотидом не має великого значення, і його можна вибирати з погляду зручності синтезу. Якщо використовують наявний у продажу фосфороамідит Cy3 згідно з інструкцією, одержувана 5'-модифікація складається спільно з блокувального замісника і лінкеру, які

60 являють собою N-гідроксипропіл, N'-Фосфатидилпропіл 3,3,3',3'-тетраметил

індомонакарбоціанін.

У кращому варіанті здійснення індокарбоціаніновий барвник є тетразаміщеним у положеннях 3 і 3' індольних кілець. Не обмежуючись будь-якою теорією, вважають, що завдяки таким заміщенням, барвник не стає інтеркалюючим барвником. Ідентичність замісників у цих положеннях не є критичною. Крім того, SSOMV може містити 3'-блокувальний замісник. Хімічна природа 3'-блокувального замісника тут також не має значення.

Гетерологічна експресія

У деяких варіантах здійснення застосовують гетерологічну експресію для експресії чужорідних генів або додаткових копій ендегенних генів у дріжджах (наприклад, в *Yarrowia lipolytica*). Гетерологічну експресію в дріжджах можна здійснювати за допомогою методів, добре відомих у даній галузі техніки. Експресія чужорідних генів або додаткових копій ендегенних генів у дріжджах за допомогою гетерологічної експресії може мати на увазі застосування вектору, що включає (а) послідовності промоторів для ініціації транскрипції, (b) послідовності термінаторів для завершення транскрипції і (c) селекційований маркер. Гетерологічна експресія і вектори експресії можуть бути такими, як описані, наприклад, у наступному джерелі: Madzak, C, Gaillardin, C, and Beckerich, J-M., 2004 Heterologous Protein Expression and Secretion in the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica*: a review, *Journal of Biotechnology* 109:63-81. Не обмежуючий перелік селекційованих маркерних генів, які можна використовувати, включає *ura3*, *lys5*, *trp1*, *leu2*, *ade1*, *E.coli hph*, що кодують стійкість до гідроміцину, і *SUC2* з *Saccharomyces cerevisiae*. Необмежуючий перелік промоторів, які можна використовувати, включає *pLEU2*, *pXPR2*, *pPOX2*, *pPOT1*, *pCL1*, *pG3P*, *pMTP*, *pTEF* і *pRPS7*. Необмежуючий перелік послідовностей термінатора, які можна використовувати, включає *XPR2t*, *LIP2t* і *PHO5t*.

У деяких варіантах здійснення застосовують один або більше генів з *Yarrowia lipolytica* *LYSI* (Genolevures YALIOB 15444g), *TRPI* (Genolevures YALIOB07 667 g) і *ADE1* (Genolewres YALIOE33O33g) як селекційовані маркери

У деяких варіантах здійснення інтегративний вектор експресії включає одну або більше послідовностей промотору та/або термінатору, вибраних із групи, яка складається з генів гліколітичного шляху *Yarrowia lipolytica*, генів утилізації алкану або гліцерину, *ACCI*, *HMGI*, *ERGI* і *ERG9*.

У деяких варіантах здійснення відбувається надекспресія однієї або обох субодиниць АТФ-цитрат-ліази з *Yarrowia lipolytica* (Genoleveres YALIOD24431g і YAL10E34793g) в *Yarrowia lipolytica*.

Модифіковані ферменти

Гени, які кодують ферменти, що приймають участь у біосинтезі жирних кислот і біосинтезі ізопреноїдів, є кращою мішенню для модифікації. У деяких варіантах здійснення цільовий ген кодує ацил-КоА-карбоксилазу. В інших варіантах здійснення цільовий ген кодує HMG-КоА-редуктазу. В інших варіантах здійснення цільовий ген кодує скваленепоксидазу. В інших варіантах здійснення цільовий ген кодує АТФ-цитрат-ліазу. Можна розробити мутації, які знижують або елімінують активність ферменту, підвищують активність ферменту або змінюють активність ферменту (наприклад, змінюють субстратну селективність).

У жирових дріжджах дикого типу ацетил-КоА значною мірою залучений у біосинтез жирних кислот за участі ацетил-КоА-карбоксилази (ACCCase). Таким чином, для того, щоб збільшити кількість ацетил-КоА, доступного для синтезу сквалену, бажано знизити ферментну експресію або специфічну активність ACCCase. Прикладом генної послідовності для ACCCase є ген *ACC1* з *Saccharomyces cerevisiae*, присутній у базі даних під реєстраційним номером Z71631. Відповідно, у деяких варіантах здійснення зниження внутрішньоклітинної активності ацетил-КоА-карбоксилази, яка є ферментом у точці розгалуження між біосинтезом мевалонату і біосинтезом тригліцеридів, приведе до зниження кількості ацетил-КоА, відведеного на синтез жирів, і, таким чином, зросте його доступність для ізопренового шляху синтезу.

Активність HMG-КоА-редуктази є швидкість-лімітуючим ферментом у біосинтезі ізопрену. Приклади генних послідовностей для HMG-КоА-редуктази включають гени *HMG1* і *HMG1* в *Saccharomyces cerevisiae*, наведені під реєстраційними номерами NC\_001145 і NC\_001144, відповідно. Таким чином, у деяких варіантах здійснення активність HMG-КоА-редуктази підвищують шляхом модифікації гену *HMGR* з метою підвищення рівня транскрипції, стабілізації одержуваного білка та/або зниження інгібування продуктом за принципом зворотного зв'язку.

Шляхом зниження активності ACCCase та/або підвищення активності HMG-КоА-редуктази в дріжджах можна створити організм, що продукує ізопреноїдне ядро, здатний продукувати цілий ряд споріднених ізопреноїдних продуктів за рахунок маніпуляції ферментами, які беруть участь в подальшому шляху синтезу.

Скваленепоксидаза каталізує першу певну стадію біосинтезу стеролів. Прикладом генної послідовності скваленепоксидази є ген ERG1 з *Saccharomyces cerevisiae*, наведений під реєстраційним номером NC\_001139. Відповідно, у деяких варіантах здійснення активність та/або експресію скваленепоксидази в дріжджах слід знизити, наприклад, за рахунок каталітично важливих залишків в амінокислотній послідовності ферменту.

Скваленсинтаза каталізує синтез сквалену шляхом конденсації двох п'ятнадцятиуглецевих (с15) попередників ізопрену (фарнезилдифосфат (FPP)). Прикладом генної послідовності скваленсинтази є ген ERG9 в *Saccharomyces cerevisiae*, наведений під реєстраційним номером NC\_001140. Відповідно, у деяких варіантах здійснення активність та/або експресію скваленсинтази в дріжджах слід підвищити.

АТФ-цитрат-ліаза (E.C. 4,1,3,8) каталітично розщеплює цитрат з утворенням ацетил-КоА і оксалоацетату. Ацетил-КоА може бути використаний ферментами ацетил-КоА-карбоксилазою для біосинтезу жирних кислот або ацетил-КоА-ацетилтрансферазою для синтезу ізопренів та їх похідних, наприклад сквалену.

Результатом метаболічних змін повинен стати перенос вуглецю з ацетил-КоА на сквален, при одночасному стримуванні основних конкуруючих шляхів метаболізму, що зачіпають цей вуглецевий атом, що приведе до значного збільшення кількості синтезованого сквалену.

Доставка ген-репаруючих олігонуклеотидів у дріжджові клітини

У способах відповідно до даного винаходу для трансформації дріжджових клітин за допомогою ген-репаруючих олігонуклеотидів можна використовувати будь-який загальновідомий метод. Приклади таких методів включають застосування мікроносіїв або мікроволокон, мікроін'єкції, LiOAc, біолістики, сферопластингу та/або агробактерій (див., наприклад, McClelland, C.M., Chang, Y. C, and Kwon-Chung, KJ. (2005) *Fungal Genetics and Biology* 42:904-913).

У деяких варіантах здійснення використовують металеві мікроносії (мікросфери) для введення більших фрагментів ДНК у дріжджові клітини, що мають клітинні стінки, шляхом бомбардування проникнення (біолістична доставка), які добре відомі фахівцям у відповідній галузі техніки. Загальноприйняті способи добору мікроносіїв і обладнання для їх доставки в клітину описані в патентах США №№ 4945050, 5100792 і 5204253.

Особливі умови для використання мікроносіїв у способах за даним винаходу описані в міжнародній публікації WO 99/07865, US09/129,298. Наприклад, охолоджені на льоді (60 мг/мл) мікроносії, змішаний дуплексний олігонуклеотид (60 мг/мл), 2,5 М CaCl<sub>2</sub> і 0,1 М спермідин додають у зазначеному порядку; суміш обережно струшують, наприклад, шляхом перемішування на вортексі 10 хвил. і залишають при кімнатній температурі на 10 хв, після чого мікроносії розбавляють п'ятьма обсягами етанолу, центрифугують і ресуспендують в 100 % етанолі. Приклади концентрацій компонентів у прилипаючому розчині включають 8-10 мкг/мкл мікроносіїв, 14-17 мкг/мкл змішаного дуплексного олігонуклеотиду, 1,1-1,4 М CaCl<sub>2</sub> і 18-22 мМ спермідину. В одному прикладі концентрації компонентів становлять 8 мкг/мкл мікроносіїв, 16,5 мкг/мкл змішаного дуплексного олігонуклеотиду, 1,3 М CaCl<sub>2</sub> і 21 мМ спермідин.

При здійсненні на практиці даного винаходу ген-репаруючі олігонуклеотиди можна також уводити в дріжджові клітини з використанням мікроволокон для проникнення крізь клітинну стінку і клітинну мембрану. Патент США № 5302523 (Coffee et al.) описує застосування силіконкарбідних волокон 30 × 0,5 мкм і 10 × 0,3 мкм, що сприяють трансформації суспензійної культури кукурудзи (Black Mexican Sweet). Можна застосовувати будь-який механічний спосіб для впровадження ДНК для трансформації дріжджових клітин за допомогою мікроволокон з метою доставки ген-репаруючих олігонуклеотидів.

Нижче представлений один з прикладів доставки за допомогою мікроволкон ген-репаруючого олігонуклеотиду. Стерильні мікроволокна (2 мкг) суспендують в 150 мкл живильного середовища для дріжджів, що містить приблизно 10 мкг змішаного дуплексного олігонуклеотиду. Культури дріжджів дають осісти, після чого струшують за допомогою вортексу рівні обсяги упакованих клітин і стерильної суспензії "волокно/нуклеотид" протягом 10 хв і висівають на чашки. Селективні середовища вносять негайно або із затримкою приблизно аж до 120 годин, у відповідності зі специфічною ознакою.

В іншому варіанті здійснення ген-репаруючі олігонуклеотиди можна доставляти в дріжджові клітини шляхом електропорації протопласту, отриманого з дріжджових клітин. Протопласти утворюються в під час ензиматичної обробки дріжджових клітин згідно зі способами, добре відомими фахівцями в даній галузі техніки. (Див., наприклад: Gallois et al., 1996, *Methods in Molecular Biology* 55:89-107, Humana Press, Totowa, N.J.; Kipp et al., 1999, *Methods in Molecular Biology* 133:213-221, Humana Press, Totowa, N.J.) Протопласти не потрібно культивувати в живильному середовищі перед електропорацією. Прикладом умов для електропорації є: 3 × 10<sup>5</sup>

протопласти в сумарному обсязі 0,3 мл з концентрацією ген-репаруючого олігонуклеотиду в інтервалі 0,6-4 мкг/мл.

Відповідно до ще одного варіанту здійснення ген-репаруючий олігонуклеотид можна доставляти в дріжджові клітини за допомогою "вусів", або мікроін'єкції в дріжджову клітину. Так звану "технологію вусів" (whiskers technique) здійснюють в основному, як описано в літературі: Frame et al., 1994, Plant J. 6:941-948. Ген-репаруючий олігонуклеотид додають до "вусів" для трансформації дріжджових клітин. Ген-репаруючий олігонуклеотид можна інкубувати разом з плазмідами, що включають послідовності, які кодують білки, здатні утворювати комплекси з рекомбіазою та/або комплекси репарації генів (gene repair complexes) у дріжджових клітинах таким чином, що каталізується генна репарація між олігонуклеотидом і цільовою послідовністю в цільовому гені.

Селекція дріжджів, що містять бажаний модифікований фермент

Дріжджі, що експресують модифікований фермент, можна ідентифікувати будь-якими з множини способів. В одному способі використовується стратегія спільної конверсії (co-conversion), із застосуванням ген-репаруючих олігонуклеотидів (GRONs) для націлювання як на селекційовану конверсію (тобто, маркер), так і на неселекційовану конверсію (наприклад цільовий ген, що цікавить) у тому самому експерименті. Таким чином, клітини, до яких не були доставлені GRONs або які були не здатні передавати конверсію, обумовлену RON, будуть еліміновані. Оскільки очікується, що доставка GRONs, націлених на неспоріднені гени, не є селективною, з деякою частотою очікується також, що колонія з успішно селекційованою конверсією буде містити конверсію в одному з інших цільових генів. Випадки конверсії можна встановити за допомогою аналізу одонуклеотидного поліморфізму (SNP).

Таким чином, геномну ДНК екстрагують із дріжджів і роблять скринінг індивідуальних зразків ДНК за допомогою технології SNP-детекції, наприклад, алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (ASPCR), для кожного гену-мішені. Для незалежного підтвердження зміни послідовності в позитивних дріжджах, відповідну ділянку цільового гену можна ампліфікувати за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), і отриманий амплікон або безпосередньо секвенувати, або клонувати і секвенувати множинні вставки.

В іншому варіанті, впровадження мутації в ген, що цікавить, можна ідентифікувати за допомогою будь-якого з множини методів молекулярної біології, розроблених для детектування одонуклеотидних мутацій в екстрагованій нуклеїновій кислоті (наприклад, методи ампліфікації, такі як ПЛР і аналіз методом одонуклеотидного подовження праймеру). Більші мутації можна детектувати шляхом ампліфікації і секвенування тієї ділянки цільового гену, де слід провести мутацію.

В іншому варіанті дріжджі або дріжджові клітини, що містять модифікований фермент, можна ідентифікувати, наприклад, за допомогою аналізу композиції ізопреноїдів, що продукується дріжджами. Таким чином, можна виростити дріжджі, екстрагувати ліпіди і аналізувати їх способами, відомими в даній галузі техніки (наприклад, за допомогою газової хроматографії).

#### Приклади

Приклад 1. Системи трансформації на основі *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis*.

Для розробки системи трансформації на основі *Cryptococcus curvatus* (штам 20508 у базі ATCC) і *Rhodotorula glutinis* (штами 10788 і 204091 у базі ATCC), як селекційований маркер використовували касету експресії KANMX (промотор-ген-термінатор), яка робить *S. cerevisiae* стійкими до канаміцину, для перетворення штамів з канаміцин-чутливих у канаміцин-стійкі (див., наприклад: Baudin, A., et al. (1993) Nucleic Acids Research (21) 3329-3330). Штами трансформували як за допомогою тільки однієї касети експресії, так і за допомогою KANMX, лігваної з рестрикційним фрагментом плазмиди, про наявність якої в *R. glutinis* повідомлялося в літературі (див., наприклад: Oloke, J.K., and Glick, B. R. (2006) African Journal of Biotechnology 5(4):327-332), що містить точку початку реплікації ДНК. ДНК впроваджують в *C. curvatus* і *R. glutinis* шляхом електропорації, LiOAc, біолістики, сферопластингу (spheroplasting), та/або агробактерій (McClelland, CM., Chang, Y.C., and Kwon-Chung, KJ. (2005) Fungal Genetics and Biology 42:904-913).

Приклад 2. Селекційовані маркери.

Для одержання урацил-ауксотрофних мутантів в *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis*, клітини вирощували в мінімальному середовищі, що містить антиметаболіт 5-фтороротову кислоту (5-FOA) для селекції стійких мутантів з ушкодженими генами *ura3* або *ura5*. 33 стабільних 5-FOAR колоній *Cryptococcus curvatus* і 20 стабільних 5-FOAR колоній *Rhodotorula glutinis* були поміщені в банк. Клонували гени URA3 дикого типу з обох культур *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* і секвенували мутантні гени *ura3* в ізолятах 5-FOAR.

Інші ауксотрофні мутанти клонували шляхом функціональної комплементції в *Saccharomyces cerevisiae* (Див.: Ho, Y.R., and Chang, M.C. (1988) Chinese Journal of Microbiology and Immunology 21(1): 1-8). Створювали бібліотеки геномних та/або кДНК з *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* для лігування з урацил-селективним вектором експресії на основі *Saccharomyces* для трансформації штаму YPH500 (MAT $\alpha$  ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1- $\Delta$ 63 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1) з метою селекції лізин-, аденін-, триптофан-, гістидин- і лейцин-прототрофів. З цих прототрофів були секвеновані відповідні гени LYS2, ADE2, TRP1, HIS3 і LEU2 з вставки геномної або кДНК.

Приклад 3. Маніпуляція з генами в дріжджах за допомогою технології RTDS.

Алелі генів leu2, lys5 і ura3 зі штаму *Yarrowia lipolytica* ATCC 90811 (leu2-35 lys5-12 ura3-18 XPR2B) клонували в ході ПЛР і порівнювали їхні послідовності з алелями дикого типу для виявлення відмінностей.

Для ura3 відмінності були знайдені в положеннях 1365 (мутація A $\rightarrow$ G, що приводить до мовчазної зміни AAA  $\rightarrow$  AAG кодування для лізину), 1503 (додаткові послідовності AAGAA в ATCC 90811, що приводять до зміни рамки читування, але рамка повертається на місце в положенні 1511, що приводить до 7 додаткових амінокислот, після яких послідовність продовжується як YL URA3 у банку послідовностей Genbank), 1511 (додатковий T в ATCC 90811) і 1978 (мутація C  $\rightarrow$ T, що приводить до стоп-мутації, яка укорочує білок на 24 амінокислоти на C-кінці). Олігонуклеотид GRON був розроблений відновленням прототропії шляхом перетворення STOP(TGA) $\rightarrow$ R (CGA) з одержанням 264R, заснованому на амінокислотній нумерації YIUra3-YLU40564. Використані GRONs: YIUra31264/C/40/5'Cy3/3'idC, що має послідовність VCGAGGTCTGTACGGCCAGAACCGAGATCCTATTGAGGAGGH, і YIUra31264/NC/40/5'Cy3/3'idC, що має послідовність VCCTCCTC AATAGGATCTCGGTTCTGGCCGTACAGACCTCGH, де V=CY3; H=3'DMT dC CPG. 10, 30 і 50 мкг кожного з GRONs трансформували в штам *Yarrowia Lipolytica* ATCC 90811 за допомогою способу, заснованого на ацетаті літію, і висівали на чашки в ura-2 % глюкозі. Сумарно було отримано 82 ura+ колонії, де GRON був розроблений із застосуванням кодувочної нитки, і 6 колоній, де GRON розроблений із застосуванням некодувочної нитки, що демонструє асиметрію за нитками, характерну при трансформації за допомогою репаруючих пролом (gap-repair) олігонуклеотидів. Секвенування 18 трансформантів, трансформованих кодувочим ланцюгом, показала наявність призначеної зміни в 17 клонах.

Для LEU2 відмінності були виявлені в положеннях 1710 (відсутність додаткового C, що веде до зсуву рамки читування і термінації незрілого білку); 1896 (додатковий T); 2036 (мутація T  $\rightarrow$  A, розташована після стоп-кодону); 2177 (додатково відсутній T, мутація розташована після стоп-кодону).

Для LEU2 відмінності були виявлені в положеннях 1092 (G $\rightarrow$ A TCG $\rightarrow$ TCA, консервативна заміна (серин)); 1278 (G $\rightarrow$ A CAG $\rightarrow$ CAA, консервативна заміна (глутамін)); 1279 (G $\rightarrow$ A GGT $\rightarrow$ ATT, заміна V $\rightarrow$ M).

Відповідно, мутації можна застосовувати з різною метою, наприклад, для перетворення прототрофних дріжджів в ауксотрофні і навпаки.

Аналогічну стратегію для демонстрації ефективності технології RTDS в *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* здійснювали, як описано для *Yarrowia lipolytica*, де мутації ura3 скоректовані для відновлення прототрофії.

Приклад 4. Клонування цільових генів.

Послідовності ACCase, HMGR, скваленсинтази і скваленепоксидази, наявні в базі NCBI, з *Saccharomyces* та інших дріжджів, були використані як джерело праймерів ПЛР, і відповідні гени, були клоновані з *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* разом з їх відповідними регуляторними ділянками (промотори, термінатори).

Для ідентифікації мутацій посиленого або ослабленого промотору, які підвищують або знижують транскрипцію, відповідно, промотори для цих чотирьох генів були клоновані за допомогою порівняно стійкої до помилок ДНК-полімерази для одержання точкових мутацій у промоторах, і ці фрагменти були клоновані в плазмиди, сплавлені з зеленим флуоресцуючим білком (GFP) або генами-репортерами бета-галооксидази, для тестування in vitro в *S. cerevisiae* або *E. coli*. Мутації посиленого промотору були повторно введені в геномні послідовності HMGR і скваленсинтази за допомогою RTDS, а мутації ослабленого промотору були зроблені в геномних послідовностях ACCase і скваленепоксидази. Промотори від життєво важливих генів (наприклад, GAPDH, актин) в *R. glutinis* і *C. curvatus* були клоновані для застосування в експресії гетерологічних генів. Праймери для ПЛР-клонування були розроблені на основі гомології з цими генами в *S. cerevisiae*.

Приклад 5. Маніпуляції з цільовими генами з метою підвищення продукування сквалену

ACCCase. Визначали число копій гену ACCCase в *R. glutinis* і *C. curvatus* та інших дріжджах. Використовували RTDS для зниження експресії ACCCase шляхом впровадження стоп-кодонів відразу після сайту початку трансляції в будь-якій з додаткових копій. Була показана кореляція між рівнем мРНК ACCCase та питомою активністю ферменту ACCCase в *Saccharomyces cerevisiae*.

5 Скваденепоксидаза. Аналогічно, збільшення нагромадження сквалену в *S. cerevisiae* досягали шляхом переривання однієї з копій скваленепоксидази в диплоїді. (Kamimura, N., Hidaka, M., Masaki, H., and Uozumi, T. (1994) Appl Microb Biotech 42: 353-357.) Визначали число копій скваленепоксидази в *R. glutinis* і *C. curvatus* та інших дріжджах і застосовували RIDS для розробки або вставки стоп-кодону безпосередньо після сайту початку трансляції в додаткових

10 копіях, за межами першої копії.  
HMGR. Обидва ферменти HMGR з *Saccharomyces cerevisiae* і HMGR ссавців містять амінокислотні послідовності у своїй лінкерній ділянці, які присутні у багатьох короткоживучих білків, що зазнають швидкого внутрішньоклітинного обміну в еукаріот (див.: Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986) Science 234 364 368, and Chun, K. T., and Simom, R. D. (1991) J. Biol. Chem. 267(6) 4236-4246). Такі ж послідовності, якщо вони присутні, виявлялися в генах HMGR в *R. glutinis* і *C. curvatus*, і їх елімінували за допомогою RTDS для зниження швидкості обміну білку HMGR. Такі однакові послідовності були виявлені в гені скваленсинтази *S. cerevisiae*, і також визначали, чи присутні такі послідовності в генах скваленсинтази в *R. glutinis* і *C. curvatus*. Ці послідовності, якщо вони були присутні в скваленсинтазі *R. glutinis* і *C. curvatus*, елімінували за

20 допомогою RTDS для зниження швидкості обміну білка.  
HMGR в *S. cerevisiae* включає два висококонсервативних домени, з яких N-кінцеві 552 амінокислоти відповідальні за зв'язування з мембраною. Надекспресія вкороченого білку HMG1, що містить тільки C-кінцеву каталітичну частину, приводила до 40-кратного збільшенню активності HMG-CoA в *S. cerevisiae* при збільшенні нагромадження сквалену до 5,5 % від сухого залишку (Polakowski, T., Stahl, U., and Lang, C. (1998) Appl. Microbiol. Biotech. 49:66-71). Визначали, чи мають білки HMGR в *R. glutinis* і *C. curvatus* HMGR ту саму структуру, і у випадку якщо це було так, застосовували RTDS для здійснення експресії тільки розчинного каталітичного домену.

Структура білку і послідовність ДНК HMGR висококонсервативна серед еукаріот, від грибів до ссавців, з мембрано-зв'язаним N-кінцевим доменом і каталітичним C-кінцевим доменом. Граничну ділянку між двома доменами можна віднести до ділянки, що відповідає амінокислотам 500-600 у гені HMG1 *Yarrowia lipolytica* (Genelouvres *Yarrowia lipolytica* YALI0E04807g), у якому ділянка гідрофобності переходить з гідрофобної в гідрофільну. Залишки 548 і 544 були вибрані на основі оцінки ділянки гідрофобності HMG1 *Yarrowia lipolytica* і її гомології з N-кінцевим фрагментом укорочених білків *Saccharomyces cerevisiae* (Donald, K.A.G., et al, 1997. Appl. Environ. Micro. 63(9): 3341-3344) і *Candida utilis* (Shimada, H. et al, 1998. Appl. Environ. Micro. 64(7):2676-2680). Відповідно, в одному прикладі експресуються амінокислоти 548-1000 C-кінцевого домену HMGII *Yarrowia lipolytica*; в іншому прикладі експресуються амінокислоти 544-1000 C-кінцевого домену HMGII *Yarrowia lipolytica*. У подібних прикладах експресуються

40 амінокислоти 543-1000 C-кінцевого домену HMGII *Yarrowia lipolytica*; або експресуються амінокислоти 545-1000 C-кінцевих доменів HMGII *Yarrowia lipolytica*; або експресуються амінокислоти 546-1000 C-кінцевих доменів HMGII *Yarrowia lipolytica*; або експресуються амінокислоти 547-1000 C-кінцевих доменів HMGII *Yarrowia lipolytica*; або експресуються амінокислоти 549-1000 C-кінцевих доменів HMGII *Yarrowia lipolytica*.  
У сірійських хом'ячків активність каталітичного домену HMGR знижується за рахунок фосфорилування за участі АМФ-залежної кінази (Omikumar, R.V., Darnay, B. G., and Rodwell, V.W. (1994) J. Biol. Chem. 269:6810-6814), і подібний тип регуляції описаний в *S. cerevisiae*. Визначали, чи є аналогічний тип регуляції білку HMGR в *R. glutinis*, *C. curvatus* та інших дріжджах, і якщо це так, застосовували RTDS для елімінації сайту фосфорилування.

50 Скваденсинтаза. Скваденсинтаза у ссавців регулюється на транскрипційному рівні в такий же спосіб, як і HMG-CoA-синтаза і фарнезилдифосфатсинтаза, за допомогою SREBPs (білки, що зв'язуються з регуляторним елементом стеролу, sterol regulatory element binding proteins) (Szkopinska, A., Swiezewska, E., and Karst, F (2000) Biochem. Biophys. Res. Comm. 267:473-477). SREBPs існують у трьох формах, з яких одна зв'язується із промотором скваленсинтази. Визначали, чи присутні такі транскрипційні фактори та/або сайти зв'язування в промоторі скваленсинтази в *R. glutinis*, *C. curvatus* та інших дріжджах, і якщо вони були присутні, застосовували RTDS для здійснення змін у таких транскрипційних факторах та/або сайтах зв'язування, що підвищують транскрипцію скваленсинтази.

Приклад 6. Умови вирощування *Cryptococcus curvatus*.

60 Оцінювали ріст *Cryptococcus curvatus* для визначення найкращих джерел вуглецю, щоб

максимізувати їх клітинну масу в культурі. В насичених середовищах, заснованих на дріжджовому екстракті (10 г/л дріжджового екстракту, 20 г/л пептону), *C. curvatus* добре росли в 2-20 % (маса/об.) глюкозі, досягаючи максимального рівня 55 г/л сухої ваги клітин (CDW) при 16 % (маса/об.) глюкозі і вище через 4 дні. Аналогічно, *C. curvatus* росли в такому ж середовищі з 3-12 % (маса/об.) гліцерином, досягаючи CDW 40 г/л в 12 % (маса/об.) гліцерині через 5 днів. *C. curvatus* вирощували також у біодизельному гліцерині (Imperial Western Products, Коачелла, Каліфорнія) аж до 3,5 % (маса/об.), з досягненням 23 г/л CDW.

Приклад 7. Маніпуляція зовнішніми умовами цільових генів для підвищеної продукції сквалену.

Тестували маніпуляції зовнішніми умовами з метою підвищення сумарного виходу сквалену. Такі маніпуляції включають (а) інгібування експресії та/або активності ACCase за допомогою олеїнової кислоти, маслинової або іншої рослинної олії(й), інозиту, холіну, сорафену, флуазифопу і клетодиму та інших інгібуючих ACCase гербіцидів; (b) інгібування експресії та/або активності скваленоксидази за допомогою тербінафіну, толнафтату і ергостеролу або інших інгібуючих скваленоксидазу фунгіцидів; (c) маніпуляція зі співвідношенням C/N в заснованих на гліцерині середовищах (у початкових середовищах або за допомогою добавок); (d) варіювання джерела азоту в середовищах (органічні, у порівнянні з неорганічними, у порівнянні із простими/складними); (e) варіювання режиму додавання вуглецю (наприклад, дозований у порівнянні з підживлювальним); (f) перевірку ефекту виснаження нутрієнтів, відмінних від джерела вуглецю; (g) варіювання джерела вуглецю, включаючи суміші цукрів, цукрових спиртів, спиртів, поліспиртів і органічних кислот; (h) відбір за ростом в присутності HMG-інгібіторних сполук, таких як ловастатин та інших інгібіторів з ряду статинів; та (i) відбір за високим рівнем продукції жирів у культурі за допомогою ліофільних барвників та/або аналізу екстрагованих ліпідів, із застосуванням, наприклад, методів гравіметрії або газової хроматографії.

Наприклад, культивували *Yarrowia lipolytica* ATCC 90904 у середовищах з високим співвідношенням вуглець/азот (C/N=420, Li, Y-H., Liu, B., Zhao, Z-B., and Bai, F-W. 2006 "Optimized Culture Medium and Fermentation Conditions for Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides*" Chinese Journal of Biotechnology 22(4): 650-656) (тут і далі –"CYM001 Media"), з додаванням від 0 до 50 мкг/мл тербінафіну при 30°C, 300 об/хв протягом 120 год. Концентрації тербінафіну 12,5 мкг/мл або вище приводили до відсоткового вмісту сквалену аж до 18,5 % від загальних ліпідів.

В іншому прикладі *Yarrowia lipolytica* ATCC 90904 культивували в середовищах CYM001, що містить від 0 до 50 мкг/мл олеїнової кислоти при 30°C, 300 об/хв протягом 120 год. Було виявлено, що додавання 10 мкл/мл олеїнової кислоти поліпшувало нагромадження ліпідів до 63,3 % ліпідів/CDW (сухий залишок клітин).

У ще одному прикладі *Yarrowia lipolytica* ATCC 90904 культивували в середовищах CYM001, що містять від 0 до 200 мкМ клетодиму при 30°C, 300 об/хв, протягом 120 год. Додавання 200 мкМ клетодиму приводило до 60-разового збільшення виходу (мг) сквалену на колбу об'ємом 60 мл.

Було показано, що підвищене постачання киснем обумовлює диференціальну регуляцію HMG1 і HMG2 в *S. cerevisiae*, що приводить до швидкої деградації HMG2 і підвищеної експресії HMG1 в аеробних умовах (Casey, W.M., Keesler, G.A., Parks, L.W. (1992) J. Bact. 174:7283-7288). Визначали, чи впливає кисневий режим на ряд генів HMG-у задіяних жирових дріжджах, і якщо це так, маніпулювали їх експресією і активністю у ферментері шляхом зміни рівня кисню.

Беручи за основу "Середовища CYM001 " (Li, Y-H., Liu, B., Zhao, Z-B., and Bai, F-W. (2006) Chinese Journal of Biotechnology 22(4):650-656), міняли різні компоненти і їх концентрації (включаючи додавання нових компонентів) з метою поліпшення клітинного росту, відсоткового вмісту загальних ліпідів на одиницю маси клітин, а також відсоткового вмісту сквалену відносно загальних ліпідів. Оцінювані компоненти середовищ включали наступні: джерела вуглецю: гліцерин, глюкоза; джерела азоту: амонійні сполуки, нітрати, амінокислоти; мінеральні солі: калію, магнію, натрію, марганцю, цинку, кальцію, міді; дріжджові екстракти; попередники ліпідів; речовини, що впливають на синтез ліпідів: тербінафін, клетодим, олеїнова кислота, пальмітолеїнова кислота, ліолева кислота, ліоленова кислота, а також піновидальючий реагент. Інші оцінювані фактори включали: відсотковий вміст інокуляту, тривалість ферментації, температура, pH, зворотний тиск, розчинений кисень (DO), живильна композиція, стратегія внесення живильних речовин і стратегія струшування.

Приклад 8. Відбір штамів.

Для жирових дріжджів використовували традиційні способи відбору штамів для підвищення їх загальної продуктивності за скваленом. Проводили скринінг штамів, мутонів за допомогою УФ-опромінення, нітрозогуанідину або етанметилсульфонату та/або відбирали за їх підвищеним

накопиченням сквалену. На штами також впливали ітеративним тиском відбору, наприклад, проводили повторний пасаж на середовищах YEP (15 г/л дріжджовий екстракт, 5 г/л пептон), що містять 3 % гліцерин, або середовищах, що містять ловастатин та інші відомі інгібітори HMGR. Проводили також повторний пасаж штамів на середовищах CYM001, що містять різні кількості

5 гліцерину та/або глюкози, або середовищах, що містять ловастатин та/або інші відомі інгібітори HMGR та/або інгібітори скваленсинтази, з метою одержання спонтанних мутантів з підвищеною активністю HMGR та/або скваленсинтази. Такі мутації можуть відбутися в HMGR, скваленсинтазі або інших генах ("мутації вторинного сайту").

10 Якщо не зазначено інше, усі використовувані в описі технічні і наукові терміни мають загальноприйняте значення в розумінні середнього фахівця в галузі техніки, до якої належить даний винахід.

Винаходи, описані тут у прикладах, можна відповідним чином здійснювати на практиці у відсутності елемента або елементів, обмеження або обмежень, явно не розкритих у даному описі. Так, наприклад, терміни "що включають", "у тому числі", "що містять" і т.д. слід розуміти в широкому змісті і без обмеження. Крім того, терміни і вирази, використані в описі, були застосовані як описові, а не обмежуючі поняття, і використання цих термінів і виразів не має на увазі виключення будь-яких еквівалентів показаних і описаних ознак або їх частини, а, навпаки, визнається, що можливі численні модифікації в рамках заявленого обсягу винаходу.

20 Таким чином, слід розуміти, що, хоча винахід був конкретним чином розкритий в кращих варіантах здійснення і необов'язкових ознаках, фахівці в даній галузі техніки можуть вдаватися до модифікацій, покращень і варіацій винаходів, втілюваних відповідно до даного опису, і вважається, що такі модифікації, покращення і варіації знаходяться у рамках обсягу винаходу. Наведені в описі матеріали, методи і приклади являють собою кращі варіанти здійснення, є ілюстрацією і не мають на увазі під собою обмежень обсягу винаходу.

25 Винахід описаний широко і у загальних ознаках. Будь-які більш вузькі видові ознаки або субродові угруповання, що знаходяться у межах загального розкриття, також становлять частину винаходу. Сюди входить загальний опис винаходу з умовою або негативними ознаками, що виключають будь-який об'єкт із роду, незалежно від того, чи був виключений об'єкт окремо викладений у даному описі.

30 На додаток, у тих випадках, де ознаки або аспекти винаходу описані в термінах груп Маркуша, фахівці в даній галузі техніки підтвердять, що даний винахід при цьому описано також у термінах будь-якого окремого члена або підгрупи членів групи Маркуша.

35 Усі публікації, заявки на патент, патенти та інші джерела, згадані в описі, у прямій формі повністю включені в опис за допомогою посилання, тією самою мірою, як яби кожен з них був включений за допомогою посилання окремо. Конфлікти, у випадку їх виникнення, будуть регулюватися даним описом винаходу, включаючи визначення.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

40 1. Спосіб продукування сквалену генетично зміненими жирowymi дріжджами, який **відрізняється** тим, що включає:

підвищення активності або експресії скваленсинтази клітиною дріжджів за рахунок введення в клітину дріжджів (i) однієї або більше мутацій в гені скваленсинтази дріжджів з використанням ген-репаруючої олігонуклеосинтези або (ii) екзогенного гена скваленсинтази, таким чином

45 генетично змінюючи дріжджі; та  
вибір клітини дріжджів, що експресує скваленсинтазу, яка має одну або більше мутацій; або  
вибір клітини дріжджів, що експресує екзогенний ген скваленсинтази; та  
екстрагування сквалену з генетично змінених дріжджів,

50 причому зазначені генетично змінені дріжджі продукують підвищені кількості сквалену у порівнянні з дріжджами, що експресують скваленсинтазу, в яких відсутні одна або більше мутацій, або дріжджами, що не мають екзогенного гена скваленсинтази.

2. Спосіб за п. 1, у якому зазначені дріжджі вибирають з групи, що складається з *Lipomyces lipofer*, *L. starkeyi*, *L. tetrasporus*, *Candida lipolytica*, *C. diddensiae*, *C. Paralipolytica*, *C. curvata*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula graminus*,  
55 *Trichosporon pullulans*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinus*, *Rhodotorula gracilis* та *Yarrowia lipolytica*.

3. Спосіб за п. 1, у якому дріжджі не являють собою *Yarrowia lipolytica*.

60 4. Спосіб за п. 1, у якому зазначені генетично змінені дріжджі продукують принаймні в 2 рази більше сквалену у порівнянні з дріжджами, що експресують скваленсинтазу, в яких відсутні одна або більше мутацій, або дріжджами, що не мають екзогенного гена скваленсинтази.



---

Комп'ютерна верстка І. МIRONENKO

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601