



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111813** (13) **C2**
(51) МПК
C12R 1/73 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

| | |
|--|---|
| <p>(21) Номер заявки: a 2012 07689</p> <p>(22) Дата подання заявки: 22.11.2010</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 24.06.2016</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/263,775</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 23.11.2009</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.09.2012, Бюл.№ 18</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 24.06.2016, Бюл.№ 12</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2010/057668, 22.11.2010</p> | <p>(72) Винахідник(и): Волкер Кейт А. (US), Нут Марк Е. (US), Фонг Ноель М. (US), Бітем Пітер Р. (US)</p> <p>(73) Власник(и): НУКЕЛІС, ІНК, 6455 Nancy Ridge Drive, Suite 100, San Diego, CA 92121, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Кістерський Арсеній Леонідович, реєстр. №177</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Dow AgroSciences LLC (formerly Mycogen Corporation): "Using Yeast Fermentation to Produce Cost-Effective and Biodegradable Lubricants", 27 May 2004. WO 2008130372 A2, 30.10.2008. WO 2009143490 A1, 26.11.2009. Ladygina N et al., A review on microbial synthesis of hydrocarbons // Process biochemistry. – 2006. – Vol. 41, – № 5, – P. 1001-1014. Beopoulos A. et al., Control of lipid accumulation in the yeast <i>Yarrowia lipolytica</i> // Applied and environmental microbiology. – 2008. – Vol. 74, – № 24, – P. 7779-7789. Beopoulos A. al., <i>Yarrowia lipolytica</i> as a model for bio-oil production. Progress in lipid research. – 2009. – Vol. 48, – № 6, – p. 375-387. Bonanno J.B. et al., Structural genomics of enzymes involved in sterol/isoprenoid biosynthesis // Proceedings of the national academy of sciences. 2001. – Vol. 98, – № 23, – P. 12896-12901. Sabirova J.S. et al., The 'LipoYeasts' project: using the oleaginous yeast <i>Yarrowia lipolytica</i> in combination with specific bacterial genes for the bioconversion of lipids, fats and oils into high-value products // Microbial biotechnology jan. – 2011. – Vol. 4, – № 1 – P. 47-54. Karst F et al., Ergosterol biosynthesis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutants deficient in the early steps of the pathway // Molecular and general genetics. – 1977. – Vol. 154, – № 3, – P. 269-277. Pasrija R. et al., Squalene epoxidase encoded by <i>ERG1</i> affects morphogenesis and drug susceptibilities of <i>Candida albicans</i> // The journal of antimicrobial chemotherapy. – 2005. – Vol. 55, – № 6, – P. 905-913. WO 2010023551 A2, 04.03.2010.</p> |
|--|---|

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ СКВАЛЕНУ З ЗАСТОСУВАННЯМ ДРІЖДЖІВ

(57) Реферат:

UA 111813 C2

Винахід належить до способу одержання сквалену, зазначений спосіб включає культивування генетично модифікованих або не модифікованих генетично дріжджів *Yarrowia lipolytica* Yeastem po l g із протигрибковим агентом.

СПОРІДНЕНІ ПАТЕНТНІ ЗАЯВКИ

[0001] Дана заявка претендує на пріоритет на підставі попередньої заявки на патент США № 61/263775 під назвою "Способи та композиції для отримання сквалену із застосуванням дріжджів", поданої 23 листопада 2009 р. і включеної в дану заявку за допомогою посилання в усій повноті і для будь-яких цілей.

ОБЛАСТЬ ТЕХНІКИ

[0002] У винаході запропоновані способи і композиції для отримання ізопреноїдів, таких як сквален, із застосуванням дріжджів.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

[0003] Наступний опис передумов створення винаходу наведений виключно для сприяння розумінню даного винаходу і не має за мету описати або включити в даний винахід відомий рівень техніки.

[0004] Ізопреноїди, такі як сквален, являють собою ліпіди комерційного значення. Вони мають відмінні змащуючі властивості, стійкі до окислення, мають низькі температури застигання, низькі температури замерзання, високі температури спалаху і легко біорозкладаються. Сквален в даний час виробляється шляхом екстракції з оливкової олії або олії печінки холодноводної акули і має високу собівартість продукції. Через високу собівартість є економічно доцільним застосування сквалену і сквалану (повністю гідрогенізованого похідного сквалену) при виробництві продукції з невеликим ринком збуту, наприклад, мастила для годинників, фармацевтичних товарів/нутрицевтиків, косметики, парфумерії, і як проміжних хімічних продуктів при виробництві товарів з високою вартістю.

[0005] У той же час існує значний ринковий потенціал для біорозкладних мастильних матеріалів, присадок до мастил та гідравлічних рідин. Здатність до біологічного розкладання цих продуктів є особливо важливою при використанні в екологічно значущих областях, наприклад, у сільському господарстві або там, де значна кількість мастильних або гідравлічних рідин може потрапляти у навколишнє середовище. Об'єм потенційного ринку збуту біорозкладних мастильних матеріалів, присадок до мастил та гідравлічних рідин досить значний і ймовірно складає близько п'яти мільйонів тонн на рік.

[0006] Біорозкладні мастильні матеріали, присадки до мастил і гідравлічні рідини, одержані з рослинних і тваринних жирів та масел, існують, але мають недоліки. Як правило, вони тверднуть при відносно високих температурах (тобто тверднуть у холодну погоду) і мають температури спалаху занадто низькі для використання при високих температурах (тобто вони розкладаються або займаються в умовах, нормальних для горячого двигуна).

[0007] Таким чином, існує необхідність в економічно ефективному способі отримання сквалену, який дозволив би здійснювати серійне виробництво і широке застосування сквалену та сквалану в біорозкладних мастильних матеріалах, присадках до мастил та гідравлічних рідин.

[0008] Chang і співавтори (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 78, 963-72) повідомляють про відкриття дріжджів дикого типу, *Pseudozyma* sp. JCC207, які продукують "велику кількість сквалену і декількох поліненасичених жирних кислот", і описують виділення *Pseudozyma* sp. JCC207 з морської води, зібраної біля Guam, USA; автори не впевнені, чи являє *Pseudozyma* sp. JCC207 собою новий вид чи варіант *P. regulosa* або *P. aphidis*. У зазначеній статті "ефективність отримання сквалену [з *Pseudozyma* sp. JCC207] досліджували в різних умовах".

[0009] Компанія Dow AgroSciences (LLC) в джерелі Using Yeast Fermentation to Produce Cost-Effective and Biodegradable Lubricants, ("Застосування дріжджової ферментації для отримання економічно ефективних біорозкладних мастил") <http://statusreports.atp.nist.gov/reports/95-01-0148PDF.pdf>, повідомляє, що "[зазначена] компанія планувала застосовувати генну інженерію з метою зміни метаболічних властивостей жирових (ліпідних) дріжджів для збільшення здатності зазначених дріжджів продукувати ізопрени шляхом біосинтезу". Зокрема, мішенями були чотири ферменти: АССаза, гідроксиметилглутарил-КоА-редуктаза (ГМГР), скваленсинтетаза і скваленепоксидаза.

[0010] У патенті США № 5460949 описаний "спосіб збільшення акумуляції сквалену і специфічних стеролів у дріжджах". Зокрема показано, що "акумуляція [с] квалену і стеролу підвищується у результаті підвищення рівня експресії гена, що кодує поліпептид з ГМГ-КоА-редуктазною активністю".

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[0011] У даному винаході запропоновані композиції і способи для отримання сквалену з дріжджів.

[0012] Згідно з певними аспектами і варіантами реалізації отримання підвищених кількостей ізопреноїдів (наприклад, сквалену) за допомогою генетично перетворених або не перетворених

генетично дріжджів може бути результатом мутацій, модифікацій та/або зміни активності одного або більше ферменту шляху біосинтезу ізопреноїдів. Наприклад, ацетил-КоА-карбоксилаза (або "АССаза"), ГМГ-КоА-редуктаза, скваленоксидаза, скваленсинтаза, АТФ-цитратсинтаза, мевалонаткіназа (наприклад, мевалонаткіназа *Y. lipolytica* (Génolevures YALI0B16038g)), гліцеринкіназа (наприклад, гліцеринкіназа *Y. lipolytica* (Génolevures YALI0F00484g)) та/або 5-амінолевулінатсинтаза (наприклад, кодована геном HEM1 *Saccharomyces cerevisiae*) можуть бути модифіковані, містити мутації або проявляти змінену активність.

[0013] Згідно з деякими переважними варіантами реалізації генетично перетворені дріжджі, що експресують модифікований фермент, отримують введенням мутації у зазначений фермент за допомогою олігополімеру нуклеїнових основ для генної репарації згідно з наведеним тут описом. Згідно з деякими варіантами реалізації запропоновані способи включають вбудовування олігонуклеотиду для генної репарації, який містить специфічну мутацію гена-мішені, який представляє інтерес, у дріжджову клітину за допомогою будь-якого із загальновідомих у даній області техніки способів (наприклад, електропорації, LiOAc, біолістики, сферопластів та/або *Agrobacterium* (див., наприклад, McClelland, CM, Chang, Yc, and Kwon-Chung, KJ. (2005) *Fungal Genetics and Biology* 42:904-913)) та ідентифікації клітин, що містять мутантний фермент.

[0014] Згідно з одним із аспектів даного винаходу у винаході запропоновані ізопреноїди, виділені з перетворених генетично або не перетворених генетично дріжджів, описаних у даному документі. Згідно з відповідним аспектом у винаході запропонований сквален, виділений із генетично перетворених дріжджів згідно з наведеним тут описом.

[0015] Згідно з іншим аспектом у винаході запропонований спосіб отримання ізопреноїдів, переважно сквалену. Згідно з певними варіантами реалізації зазначений спосіб включає отримання перетворених генетично або не перетворених генетично дріжджів згідно з описом у цьому документі і виділення сквалену із зазначених дріжджів. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначений спосіб включає вплив на дріжджі (перетворені або не перетворені генетично) протигрибковим агентом (наприклад, аліламіновим протигрибковим агентом, таким як тербінафін) і виділення сквалену із зазначених дріжджів. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначений спосіб включає вплив на генетично перетворені дріжджі, такі як описані в цьому документі, протигрибковим агентом (наприклад, аліламіновим протигрибковим агентом, таким як тербінафін) і виділення сквалену із зазначених дріжджів. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначений спосіб включає вплив на не перетворені генетично дріжджі, такі як описані у цьому документі, протигрибковим агентом (наприклад, аліламіновим протигрибковим агентом, таким як тербінафін) і виділення сквалену із зазначених дріжджів.

[0016] Згідно з певними варіантами реалізації описаних у даному документі способів і композицій, що включають протигрибковий агент (наприклад, аліламіновий протигрибковий агент, такий як тербінафін), зазначений протигрибковий агент (наприклад, тербінафін або інший протигрибковий агент) може бути доданий або може бути присутнім у концентрації приблизно 1 мкг/мл чи вище або приблизно 5 мкг/мл; або приблизно 10 мкг/мл; або приблизно 11 мкг/мл; або приблизно 12 мкг/мл; або приблизно 12,5 мкг/мл; або приблизно 13 мкг/мл; або приблизно 15 мкг/мл; або приблизно 16 мкг/мл; або приблизно 20 мкг/мл; або приблизно 25 мкг/мл; або приблизно 30 мкг/мл; або приблизно 40 мкг/мл; або приблизно 50 мкг/мл чи вище. Згідно з певними варіантами реалізації способів і композицій, описаних в даному документі, які включають протигрибковий агент (наприклад, аліламіновий протигрибковий агент, такий як тербінафін), зазначений протигрибковий агент (наприклад, тербінафін або інший протигрибковий агент) може бути доданий або може бути присутнім у концентрації приблизно від 0,5 до 100 мкг/мл; або від 0,5 до 50 мкг/мл; або 1-50 мкг/мл; або 5-50 мкг/мл; або 8-50 мкг/мл; або 10-50 мкг/мл; або 12-50 мкг/мл; або 15-50 мкг/мл; або 15-50 мкг/мл; або 25-50 мкг/мл; або 1-25 мкг/мл; або 5-25 мкг/мл; або 10-25 мкг/мл; або 10-20 мкг/мл; або 10-15 мкг/мл.

[0017] Згідно з одним аспектом у винаході запропоновані генетично перетворені дріжджі, які продукують ізопреноїди. Згідно з певними варіантами реалізації зазначені генетично перетворені дріжджі продукують сквален.

[0018] Згідно з іншим аспектом, у винаході запропоновані генетично перетворені дріжджі, де зазначені дріжджі генетично перетворені таким чином, щоб продукувати підвищені рівні сквалену в порівнянні з відповідними нативними дріжджами. Згідно з певними варіантами реалізації вищенаведених аспектів даного винаходу, зазначені генетично перетворені дріжджі експресують один або більше модифікований фермент з однією або більше, ніж однією, мутацією. Згідно з певними варіантами реалізації вищенаведених аспектів рівень експресії вказаного одного або більше ферменту у зазначених генетично перетворених дріжджах підвищений або знижений в порівнянні з відповідними нативними дріжджами. Згідно з

відповідними варіантами реалізації зазначені генетично перетворені дріжджі експресують один або більше модифікований фермент з однією або більше, ніж однією, мутацією, і рівень експресії вказаного одного або більше ферменту у зазначених генетично перетворених дріжджах підвищений або знижений в порівнянні з відповідними нативними дріжджами. Згідно з певними переважними варіантами реалізації, запропонованими у даному винаході, генетично перетворені дріжджі генетично перетворені введенням мутації у фермент із застосуванням олігополімеру нуклеїнових основ для генної репарації. Згідно з деякими варіантами реалізації генетично перетворені дріжджі згідно з описом у цьому винаході генетично перетворені вбудовуванням однієї або більше мутацій у сайт початку трансляції або в область гена, що оточує його і що кодує фермент, який підвищує або знижує експресію зазначеного ферменту, наприклад, згідно з описами в заявках на патент США № 10/411969 і № 11/625586. Згідно з певними варіантами реалізації зазначений фермент, модифікований в генетично перетворених дріжджах згідно з даним винаходом, включає один або більше фермент, вибраний із групи, що складається з ацетил-КоА-карбоксилази (або "АССази"), ГМГ-КоА-редуктази, скваленоксидази, скваленсинтази, АТФ-цитрат-ліази, АТФ-цитратсинтази, мевалонаткінази (наприклад, мевалонаткінази *Y. lipolytica* (Génolevures YALI0B16038g)), гліцеринкінази (наприклад, гліцеринкінази *Y. lipolytica* (Génolevures YALI0F00484g)) і 5-амінолевулінатсинтази.

[0019] Нуклеїнова основа містить основу, яка являє собою пурин, піримідин або їхнє похідне, або аналог. Нуклеозиди являють собою нуклеїнові основи, що містять фрагмент пентозофуранозилу, наприклад, необов'язково заміщений рибозид або 2'-дезоксирибозид. Нуклеозиди можуть бути з'єднані одним або кількома зв'язуючими фрагментами, які можуть містити або не містити фосфору. Нуклеозиди, з'єднані незаміщеними фосфодиефірними зв'язками, називають нуклеотидами. "Нуклеїнові основи" в контексті даного документа включають пептидні нуклеїнові основи, субодиниці пептидних нуклеїнових кислот, морфолінові нуклеїнові основи, а також нуклеозиди та нуклеотиди.

[0020] Олігополімер нуклеїнових основ являє собою полімер нуклеїнових основ, який здатний гібридизуватися шляхом спарювання основ за Уотсоном-Кріком з комплементарною послідовністю ДНК. Ланцюг олігополімеру нуклеїнових основ містить одиночні 5' і 3'-кінці, які являють собою кінцеві нуклеїнові основи полімеру. Конкретний ланцюг олігополімеру нуклеїнових основ може містити нуклеїнові основи всіх типів. З'єднання олігополімеру нуклеїнових основ являє собою з'єднання, яке містить один або більше ланцюг олігополімеру нуклеїнових основ, які комплементарні і гібридизовані шляхом спарювання за Уотсоном-Кріком. Нуклеїнові основи відносяться до дезоксирибо-типу або рибо-типу. Нуклеїнові основи рибо-типу являють собою нуклеїнові основи, що містять пентозофуранозил, де вуглець в положенні 2' являє собою метилен, заміщений гідроксиллом, алкокси або галогеном. Нуклеїнові основи дезоксирибо-типу являють собою нуклеїнові основи, відмінні від нуклеїнових основ рибо-типу, і включають усі нуклеїнові основи, що не містять фрагментів пентозофуранозилу.

[0021] Нитка олігополімеру нуклеїнових основ загалом включає обидва ланцюги олігополімеру нуклеїнових основ і сегменти або ділянки ланцюгів олігополімеру нуклеїнових основ. Нитка олігополімеру нуклеїнових основ має 3'-кінець і 5'-кінець. У тих випадках, коли протяжність нитки олігополімеру нуклеїнових основ збігається з протяжністю ланцюга, зазначені 3'- і 5'-кінці зазначеної нитки також є і 3', і 5' кінцями зазначеного ланцюга.

[0022] Використовуваний у даній заявці термін "олігополімер нуклеїнових основ для генної репарації" означає олігонуклеотиди, в тому числі змішані дуплексні олігонуклеотиди; молекули, що не містять нуклеотидів; одониткові олігодезоксинуклеотиди та інші молекули для генної репарації згідно з наведеним нижче детальним описом.

[0023] Згідно з деякими варіантами реалізації, перетворені генетично дріжджі або не перетворені генетично дріжджі згідно з даним винаходом отримують з жирових дріжджів. Згідно з певними переважними варіантами реалізації, перетворені генетично дріжджі або не перетворені генетично дріжджі згідно з даним винаходом отримують із дріжджів, вибраних із групи, яка складається з *Cryptococcus curvatus*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinu*, і *Rhodosporidium toruloides*. Згідно з деякими переважними варіантами реалізації, зазначені перетворені генетично дріжджі або не перетворені генетично дріжджі отримують із дріжджів, вибраних з групи, яка складається з *Cryptococcus curvatus*, *Yarrowia lipolytica* і *Rhodotorula glutinus*. Згідно з відповідними варіантами реалізації, зазначені перетворені генетично дріжджі або не перетворені генетично дріжджі отримують із дріжджів, вибраних із групи, яка складається з *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinus*. Згідно з певними переважними варіантами реалізації, зазначені перетворені генетично дріжджі або не перетворені генетично дріжджі отримують не з *Yarrowia lipolytica*. Згідно з певними варіантами реалізації, зазначені перетворені генетично дріжджі або не перетворені генетично дріжджі являють собою штам *Yarrowia*

lipolytica, вибраний із групи, яка складається з ATCC 20688, ATCC 90811, ATCC 90904, ATCC 90812, ATCC MY A-2613 і Yeastern polg.

[0024] Згідно з певними переважними варіантами реалізації, фермент, що модифікується в генетично перетворених дріжджах згідно з даним винаходом, являє собою ацетил-КоА-карбоксилазу (або "АССазу"). Згідно з деякими переважними варіантами реалізації ацетил-КоА-карбоксилазу в генетично перетворених дріжджах модифікують так, що її активність і/або експресія зменшуються відносно відповідних нативних дріжджів, або так, що вказана активність і/або експресія усунені. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначена ацетил-КоА-карбоксилаза може бути модифікована так, що її субстратна селективність змінена. Згідно з деякими переважними варіантами реалізації зазначені генетично перетворені дріжджі модифікують так, що активність і/або експресія ацетил-КоА-карбоксилази знижена відносно відповідних нативних дріжджів, але зазначена активність не усунена. Згідно з деякими переважними варіантами реалізації зазначені генетично перетворені дріжджі модифікують так, що активність і/або експресія ацетил-КоА-карбоксилази в зазначених генетично перетворених дріжджах становить приблизно 90-95 %; або приблизно 80-90 %; або приблизно 70-80 %; або приблизно 60-70 %; або приблизно 50-60 %; або приблизно 40-50 %; або приблизно 30-40 %; або приблизно 20-30 %; або приблизно 10-20 %; або приблизно 5-10 %; або приблизно 2-5 % від активності і/або експресії у відповідних нативних дріжджах.

[0025] Згідно з певними переважними варіантами реалізації фермент, що модифікується в генетично перетворених дріжджах згідно з даним винаходом, являє собою ГМГ-КоА-редуктазу. Згідно з деякими переважними варіантами реалізації ГМГ-КоА-редуктаза в генетично перетворених дріжджах модифікується так, що її активність і/або експресія підвищуються відносно відповідних нативних дріжджів. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначена ГМГ-КоА-редуктаза може бути модифікована так, що її субстратна селективність змінена. Згідно з певними переважними варіантами реалізації зазначені генетично перетворені дріжджі модифікують так, що активність і/або експресія ГМГ-КоА-редуктази в зазначених генетично перетворених дріжджах підвищуються щонайменше 1,2-кратно; або 1,5-кратно; або 2-кратно; або 3-кратно; або 4-кратно; або 5-кратно; або 10-кратно; або 15-кратно; або 20-кратно; або 50-кратно; або 100-кратно; або 1000-кратно; або 10000-кратно; або 100000-кратно; або 1000000-кратно в порівнянні з активністю і/або експресією у відповідних нативних дріжджах.

[0026] Згідно з певними переважними варіантами реалізації запропонований у даному винаході фермент, що модифікується в генетично перетворених дріжджах, являє собою скваленоксидазу. Згідно з деякими переважними варіантами реалізації, скваленоксидаза в генетично перетворених дріжджах модифікується таким чином, що її активність і/або експресія зменшуються відносно відповідних нативних дріжджів; або таким чином, що зазначені активність і/або експресія усунені. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначена скваленоксидаза може бути модифікована таким чином, що її субстратна селективність змінена. Згідно з деякими переважними варіантами реалізації зазначені генетично перетворені дріжджі модифікуються таким чином, що активність і/або експресія скваленоксидази знижені в порівнянні з відповідними нативними дріжджами, але зазначена активність не усунена. Згідно з певними варіантами реалізації, зазначена скваленоксидаза модифікується включенням однієї або більше мутації (й) або гомолога (ів) однієї або більше мутації (й), пов'язаної (их) з підвищеною чутливістю до тербінафіну. Згідно з певними варіантами реалізації, зазначені дріжджі не являються *Saccharomyces cerevisiae*, а зазначена скваленоксидаза модифікована таким чином, що містить гомологи однієї або більше наступних мутацій, асоційованих із підвищеною чутливістю до тербінафіну в гені *ERG1 Saccharomyces cerevisiae*: G30S, L37P і R269G (див., наприклад, Turnowsky, 2005, 2007 і 2008). Згідно з певними варіантами реалізації, зазначені дріжджі являють собою *Y. lipolytica*, а зазначена скваленоксидаза модифікована таким чином, що містить гомологи однієї або більше наступних мутацій, асоційованих із підвищеною чутливістю до тербінафіну в гені *ERG1 Saccharomyces cerevisiae*: G30S, L37P і R269G (див., наприклад, Turnowsky, 2005, 2007 і 2008). Згідно з деякими варіантами реалізації, зазначений ген дріжджової скваленоксидази модифікується згідно з описом у даному документі за допомогою синтезу і заміни гена дикого типу або введенням мутацій за допомогою RTDS. Згідно з деякими переважними варіантами реалізації, зазначені генетично перетворені

дріжджі модифікуються таким чином, що активність і/або експресія скваленоксидази в зазначених генетично перетворених дріжджах знижується 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 і/або експресії у відповідних нативних дріжджах. Згідно з відповідними варіантами реалізації, зазначені генетично перетворені дріжджі модифікуються таким чином, що активність і/або експресія скваленоксидази в зазначених генетично перетворених дріжджах становить приблизно 90-95 %; або приблизно 80-90 %; або приблизно 70-80 %; або приблизно 60-70 %; або приблизно 50-60 %; або приблизно 40-50 %; або приблизно 30-40 %; або приблизно 20-30 %; або приблизно 10-20 %; або приблизно 5-10 %; або приблизно 2-5 % від активності і/або експресії у відповідних нативних дріжджах.

[0027] Згідно з певними переважними варіантами реалізації, фермент, що модифікується в генетично перетворених дріжджах згідно з даним винаходом, являє собою скваленсинтазу. Згідно з деякими переважними варіантами реалізації, скваленсинтаза в генетично перетворених дріжджах модифікована так, що її активність і/або експресія підвищуються в порівнянні з відповідними нативними дріжджами. Згідно з деякими варіантами реалізації, зазначена скваленсинтаза може бути модифікована таким чином, що змінюється її субстратна селективність. Згідно з певними переважними варіантами реалізації, зазначені генетично перетворені дріжджі модифіковані таким чином, що активність і/або експресія скваленсинтази в зазначених генетично перетворених дріжджах підвищена(і) щонайменше 1,2-кратно; або 1,5-кратно; або 2-кратно; або 3-кратно; або 4-кратно; або 5-кратно; або 10-кратно; або 15-кратно; або 20-кратно; або 50-кратно; або 100-кратно; або 1000-кратно; або 10000-кратно; або 100 000-кратно; або 1000000-кратно в порівнянні з активністю і/або експресією у відповідних нативних дріжджах.

[0028] Згідно з певними переважними варіантами реалізації, фермент, що модифікується в генетично перетворених дріжджах згідно з даним винаходом, являє собою АТФ-цитрат-ліазу. Згідно з деякими варіантами реалізації, гени будь-якої або обох субодиниць АТФ-цитрат-ліази (наприклад, АТФ-цитрат-ліази *Yarrowia lipolytica*; *Génolevures YALI0D24431g* і *YALI0E34793g*) модифіковані згідно з наведеним тут описом. Згідно з певними варіантами реалізації, активність АТФ-цитрат-ліази в модифікованих дріжджах підвищена в результаті вставки та/або гетерологічної експресії гена тваринної АТФ-ліази, яка включає холофермент з однієї субодиниці. Згідно з деякими переважними варіантами реалізації, АТФ-цитрат-ліаза в генетично перетворених дріжджах модифікована таким чином, що її активність і/або експресія підвищується(ють)ся в порівнянні з відповідними нативними дріжджами. Згідно з певними переважними варіантами реалізації, зазначені генетично перетворені дріжджі модифіковані таким чином, що активність і/або експресія АТФ-цитрат-ліази в зазначених генетично перетворених дріжджах підвищується(ють)ся щонайменше 1,2-кратно; або 1,5-кратно; або 2-кратно; або 3-кратно; або 4-кратно; або 5-кратно; або 10-кратно; або 10-кратно; або 20-кратно; або 50-кратно; або 100-кратно; або 1000-кратно; або 10000-кратно; або 100000-кратно; або 1000000-кратно в порівнянні з активністю та/або експресією у відповідних нативних дріжджах.

[0029] Згідно з певними варіантами реалізації композицій і способів, запропонованих у даному винаході, фермент, що модифікується в генетично перетворених дріжджах або не перетворених генетично дріжджах, являє собою АТФ-цітратсинтазу. Переважно, її активність і/або експресія підвищується(ють)ся в порівнянні з відповідними нативними дріжджами.

[0030] Згідно з певними переважними варіантами реалізації, фермент, що модифікується в генетично перетворених дріжджах згідно з даним винаходом, являє собою мевалонаткіназу (наприклад, мевалонаткіназу *Y. lipolytica* (*Génolevures YALI0B16038g*)). Згідно з деякими переважними варіантами реалізації, мевалонаткіназа (наприклад, мевалонаткіназа *Y. lipolytica* (*Génolevures YALI0B16038g*)) в генетично перетворених дріжджах модифікується таким чином, що її активність і/або експресія підвищені в порівнянні з відповідними нативними дріжджами. Згідно з певними переважними варіантами реалізації, зазначені генетично перетворені дріжджі модифікуються таким чином, що зазначені активність і/або експресія мевалонаткінази (наприклад, мевалонаткінази *Y. lipolytica* (*Génolevures YALI0B16038g*)) в зазначених генетично перетворених дріжджах підвищені щонайменше 1,2-кратно; або 1,5-кратно; або 2-кратно; або 3-кратно; або 4-кратно; або 5-кратно; або 10-кратно; або 15-кратно; або 20-кратно; або 50-кратно; або 100-кратно; або 1000-кратно; або 10000-кратно; або 100000-кратно; або 1000000-кратно в порівнянні з активністю і/або експресією у відповідних нативних дріжджах.

[0031] Згідно з певними переважними варіантами реалізації фермент, що модифікується в генетично перетворених дріжджах згідно з даним винаходом являє собою гліцеринкіназу (наприклад, гліцеринкіназу *Y. lipolytica* (*Génolevures YALIOF00484g*)). Згідно з деякими

переважними варіантами реалізації гліцеринкінази (наприклад, гліцеринкіназа *Y. lipolytica* (Génolevures YALI0F00484g)) в генетично перетворених дріжджах модифікована таким чином, що її активність і/або експресія підвищуються в порівнянні з відповідними нативними дріжджами. Згідно з певними переважними варіантами реалізації зазначені генетично перетворені дріжджі модифіковані таким чином, що зазначені активність і/або експресія мевалонаткінази гліцеринкінази (наприклад, гліцеринкінази *Y. lipolytica* (Génolevures YALI0F00484g)) в зазначених генетично перетворених дріжджах підвищує(ють)ся щонайменше 1,2-кратно; або 1,5-кратно; або 2-кратно; або 3-кратно; або 4-кратно; або 5-кратно; або 10-кратно; або 15-кратно; або 20-кратно; або 50-кратно; або 100-кратно; або 1000-кратно; або 10000-кратно; або 100000-кратно; або 1000000-кратно в порівнянні з активністю і/або експресією у відповідних нативних дріжджів.

[0032] Згідно з певними варіантами реалізації композицій і способів, запропонованих у даному винаході, зазначений фермент, який модифікується в генетично перетворених дріжджах або не перетворених генетично дріжджах, являє собою 5-амінолевулінатсинтазу (наприклад, таку, що кодується геном *Saccharomyces cerevisiae* HEM1). Переважно, її активність і/або експресія підвищена(і) в порівнянні з відповідними нативними дріжджами.

[0033] Згідно з певними переважними варіантами реалізації описаних вище аспектів, зазначені генетично перетворені дріжджі являють собою генетично перетворені дріжджі; згідно з іншими переважними варіантами реалізації зазначені генетично перетворені дріжджі являють собою трансгенні дріжджі. Інші варіанти реалізації представлені дріжджами, які містять і трансгенні, і генетичні перебудови.

[0034] Згідно з певними аспектами і варіантами реалізації, у винаході запропоновані композиції, що включають дріжджі (наприклад, генетично перетворені дріжджі, наприклад, описані в даному документі, або не перетворені генетично дріжджі), такі, де щонайменше 10 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 20 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 25 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 28 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 30 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 32 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 35 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 37 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 38 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 40 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 42 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 45 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 47 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 50 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 52 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 55 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 57 % від загального вмісту ліпідів представлені скваленом; або щонайменше 60 % або більше від загального вмісту ліпідів представлені скваленом.

[0035] Згідно з подальшими варіантами реалізації різних описаних в даному документі аспектів, в даному винаході запропоновані ізопреноїди, такі як сквален, виділені з будь-яких вище- або нижчеописаних генетично перетворених, трансгенних генетично перетворених або не перетворених генетично дріжджів.

[0036] Вираз "генетично перетворені дріжджі" або "генетично модифіковані дріжджі" в контексті цього документа належить до дріжджів, що містять одну або більше генетичну модифікацію, наприклад, трансгени і/або модифіковані ферменти, які містять одну або більше спрямовану мутацію. Такі спрямовані мутації можуть призводити до того, що активність модифікованого ферменту буде відрізнятись від активності нативного ферменту. Такі відмінності можуть включати відмінності в субстратній специфічності або рівнях активності. У контексті цього документа термін "трансгенні дріжджі" означає один із типів "генетично перетворених дріжджів".

[0037] Термін "нативні дріжджі" в контексті цього документа належить до дріжджів, не перетворених генетично (тобто не трансгенних і не модифікованих генетично). Нативні дріжджі включають дріжджі дикого типу, а також дріжджі, що пройшли селекцію на певні властивості.

[0038] Вираз "трансгенні дріжджі" відноситься до дріжджів, що містять ген з інших дріжджів або з недріжджових видів. Такий ген може бути позначений як "трансген".

[0039] У контексті даного документа термін "ген-мішень" відноситься до гену, що кодує фермент, який модифікується.

[0040] Вираз "жирові дріжджі" відноситься до дріжджів, які містять щонайменше приблизно 20 % ліпідів у сухій клітинній масі (СКМ), яка екстрагується з організму. Здатність до акумуляції

ліпідів у кількості щонайменше приблизно 20 % від СКМ не є властивістю якогось певного роду; рівні ліпідів, що перевищують приблизно 20 % СКМ, виявлені у *Lipomyces lipofer*, *L. starkeyi*, *L. tetrasporus*, *Candida lipolytica*, *C. diddensiae*, *C. paralipolytica*, *C. curvata*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula graminus*, *Trichosporon pullulans*,
 5 *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinus*, *Rhodotorula gracilis* і *Yarrowia lipolytica*. Див, наприклад, патент США 4032405 Tatsumi, et al. і Rattray, *Microbial Lipids*, Vol. 1 (1998).

[0041] Термін "приблизно" в контексті даного документа означає в кількісному вираженні плюс або мінус 10 %. Наприклад, "приблизно 3 %" охоплює діапазон 2,7-3,3 %, а "приблизно 10 %" охоплює діапазон 9-11 %.

10 [0042] Якщо не вказано інше, будь-які зазначені в цьому документі процентні частки являють собою масові процентні частки.

[0043] Інші особливості та переваги винаходу будуть очевидними з наведеного нижче опису переважних варіантів реалізації та з формули винаходу.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

15 [0044] Типи дріжджів

[0045] Композиції та способи згідно з описами в даному документі можуть бути основані на будь-якому з численних видів або штамів дріжджів. Згідно з певними варіантами реалізації зазначені дріжджі являють собою жирові дріжджі. Наприклад, зазначені дріжджі можуть являти собою *Cryptococcus curvatus* (наприклад, ATCC 20508), *Yarrowia lipolytica* (наприклад, ATCC 20688 або ATCC 90811), *Rhodotorula glutinus* (наприклад, ATCC 10788 або ATCC 204091) і *Rhodosporidium toruloides*. Автори винаходу виявили, що, в порівнянні з деякими іншими дріжджами (наприклад, *Yarrowia lipolytica*), *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* здатні формувати культури з дуже високою щільністю клітин на найрізноманітніших субстратах і виробляти значний загальний об'єм ліпідів у різних умовах культивування. Відповідно, згідно з певними варіантами реалізації, застосування *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* може
 20 бути особливо ефективним в композиціях і способах згідно з описаними в даному документі. Існує безліч добре розроблених і специфічних для *Yarrowia lipolytica* генетичних інструментів (наприклад, протоколи трансформації, селективні маркери); відповідно, згідно з деякими варіантами реалізації, застосування *Yarrowia lipolytica* може бути особливо ефективним у композиціях і способах згідно з описаними в даному документі. Згідно з певними варіантами реалізації композицій і способів, описаних у цьому документі, зазначені дріжджі (перетворені генетично або не перетворені генетично) можуть являти собою штам *Yarrowia lipolytica*, такий як ATCC 20688, ATCC 90811, ATCC 90904, ATCC 90812, ATCC MYA-2613 або *Yeastern polg*.

25 [0046] Олігополімери нуклеїнових основ для генної репарації

30 [0047] Даний винахід може бути здійснений із застосуванням "олігополімерів нуклеїнових основ для генної репарації", які мають конформації і хімічні властивості згідно з наведеним нижче докладним описом. Зазначені "олігополімери нуклеїнових основ для генної репарації", запропоновані у даному винаході, включають змішані дуплексні олігонуклеотиди; молекули, що не містять нуклеотиди; одониткові олігодезоксинуклеотиди і інші молекули для генної
 40 репарації, описані в згаданих нижче патентах і патентних публікаціях. Зазначені "олігополімери нуклеїнових основ для генної репарації", запропоновані у даному винаході, також описувалися в опублікованих наукових і патентних джерелах під іншими назвами, включаючи "рекомбіногенні олігонуклеотиди", "РНК/ДНК химерні олігонуклеотиди", "химерні олігонуклеотиди", "змішані дуплексні олігонуклеотиди (MDON) "; "РНК-ДНК-олігонуклеотиди (RDO)"; "олігонуклеотиди з направленою дією на ген(и)"; "генопласти", "одониткові модифіковані олігонуклеотиди", "одониткові олігодезоксинуклеотидні мутаційні вектори", "дуплексні мутаційні вектори"; і "гетеродуплексні мутаційні вектори".

45 [0048] Олігополімери нуклеїнових основ, які мають конформації і хімічні властивості, описані Кміес в патенті США 5565350 (Кміес I) і патенті США 5731181 (Кміес II), включених у цей документ за допомогою посилання, підходять для застосування як "олігополімери нуклеїнових основ для генної репарації", запропоновані в даному винаході. Зазначені олігополімери нуклеїнових основ для генної репарації за Кміес I і/або Кміес II містять дві комплементарні нитки, одна з яких містить щонайменше один сегмент нуклеотидів РНК-типу ("РНК-сегмент"), спарений із нуклеотидами ДНК-типу іншої нитки.

50 [0049] У Кміес II зазначено, що замість нуклеотидів можуть застосовуватися ненуклеотидні з'єднання, які містять пуринові і піримідинові основи. Додаткові молекули для генної репарації, які можуть бути використані в даному винаході, описані в патентах США 5756325; 5871984; 5760012; 5888983; 5795972; 5780296; 5945339; 6004804 та 6010907; в міжнародному патенті PCT/US00/23457; і в міжнародних патентних публікаціях WO 98/49350; WO 99/07865; WO 60 99/58723; WO 99/58702 та WO 99/40789, кожен із яких включений до даної заявки в усій повноті.

[0050] Згідно одному з варіантів реалізації зазначений олігополімер нуклеїнових основ для генної репарації являє собою змішаний дуплексний олігонуклеотид, при цьому нуклеотиди РНК-типу зазначеного змішаного дуплексного олігонуклеотиду стійкі до РНКазі в результаті проведеного заміщення функціональною групою, яка містить 2'-гідроксилу фтор-, хлор- чи бром, або введенням замісника з 2'-О. Відповідні замісники включають замісники, запропоновані в Кміес II. Альтернативні замісники включають замісники, запропоновані в патенті США 5334711 (Sproat), та замісники, запропоновані в патентних публікаціях EP 629 387 і EP 679 657 (в сукупності, заявках Martin (Martin Applications)), які включені в даний документ за допомогою посилання. В контексті даного документа 2'-фтор, хлор- чи бром-похідне рибонуклеотиду або рибонуклеотид з заміщеними замісниками згідно з описами в Martin Applications або Sproat 2'-ОН називається "2'-заміщеним рибонуклеотидом". У контексті даного документа термін "нуклеотид РНК-типу" означає 2'-гідроксил- чи 2'-заміщений нуклеотид, який з'єднаний з іншими нуклеотидами змішаного дуплексного олігонуклеотиду незаміщеним фосфодієфіром або за допомогою будь-якого зі штучних зв'язків, запропонованих у Кміес I або Кміес II. У контексті даного документа термін "нуклеотид дезоксирибо-типу" відноситься до нуклеотиду, що містить 2'-Н, який може бути зв'язаний з іншими нуклеотидами олігополімеру нуклеїнових основ для генної репарації незаміщеним фосфодієфірним зв'язком або будь-яким зі штучних зв'язків, запропонованих у Кміес I або Кміес II.

[0051] Згідно окремому варіанту реалізації даного винаходу, зазначений олігополімер нуклеїнових основ для генної репарації являє собою змішаний дуплексний олігонуклеотид, який з'єднаний виключно незаміщеними фосфодієфірними зв'язками. Згідно з альтернативними варіантами реалізації зв'язування забезпечується заміщеними фосфодієфірами, похідними фосфодієфірів і не основаними на фосфорі зв'язками згідно з запропонованими в Кміес II. Згідно зі ще одним варіантом реалізації кожен нуклеотид РНК-типу в змішаному дуплексному олігонуклеотиді являє собою 2'-заміщений нуклеотид. Конкретні переважні варіанти реалізації 2'-заміщених рибонуклеотидів представлені 2'-фтор, 2'-метокси, 2'-пропілокси, 2'-алілокси, 2'-гідроксилетилокси, 2'-метоксиетилокси, 2'-фторпропілокси і 2'-трифторпропілокси-заміщеними рибонуклеотидами. Більш переважні варіанти реалізації 2'-заміщених рибонуклеотидів представлені 2'-фтор, 2'-метокси, 2'-метоксиетилокси і 2'-алілокси-заміщеними нуклеотидами. Згідно з іншим варіантом реалізації зазначений змішаний дуплексний олігонуклеотид з'єднаний незаміщеними фосфодієфірними зв'язками.

[0052] Незважаючи на те, що змішані дуплексні олігонуклеотиди, що містять тільки один тип 2'-заміщеного нуклеотиду РНК-типу, зручніше синтезувати, способи, запропоновані у даному винаході, можуть здійснюватися із застосуванням змішаних дуплексних олігонуклеотидів, що містять два або більше типи нуклеотидів РНК-типу. На функціонування РНК-сегмента не обов'язково впливає переривання в результаті вставки дезоксинуклеотиду між двома тринуклеотидами РНК-типу відповідно, термін "РНК-сегмент" включає і "розщеплений РНК-сегмент". Нерозщеплений РНК-сегмент називається послідовним РНК-сегментом. Згідно з альтернативним варіантом реалізації РНК-сегмент може містити стійкі до РНКазі і 2'-ОН-незаміщені нуклеотиди, що чергуються. Зазначені змішані дуплексні олігонуклеотиди переважно складаються менше, ніж зі 100 нуклеотидів, і більш переважно менше, ніж з 85 нуклеотидів, але більше, ніж з 50 нуклеотидів. Зазначені перша і друга нитки спарені за Уотсоном-Кріком. Згідно з одним варіантом реалізації нитки зазначеного змішаного дуплексного олігонуклеотиду ковалентно пов'язані лінкером, таким як одонитковий гекса-, пента- або тетрануклеотид, таким чином, що зазначені перша і друга нитки являють собою сегменти одиночного олігонуклеотидного ланцюга, що має одиночний 3'- і одиночний 5'-кінці. 3'- і 5'-кінці можуть бути захищені додаванням "шпилькового ковпачка", в цьому випадку 3'- і 5'-кінцеві нуклеотиди спарені за Уотсоном-Кріком із сусідніми нуклеотидами. Другий шпильковий ковпачок може додатково бути розміщений на стику між зазначеними першою і другою нитками на відстані від 3'- і 5'-кінців таким чином, щоб стабілізувати спарювання за Уотсоном-Кріком між зазначеними першою і другою нитками.

[0053] Зазначені перша і друга нитки містять дві ділянки, гомологічні двом фрагментам зазначеного гена-мішені, тобто мають ту ж послідовність, що і вказаний ген-мішень. Гомологічна ділянка містить нуклеотиди РНК-сегмента і може містити один або більше нуклеотид ДНК-типу з'єднувального ДНК-сегмента, а також може містити нуклеотиди ДНК-типу, що не входять до складу проміжного ДНК-сегмента. Дві ділянки, що мають гомологію, розділені ділянкою (і межують із нею), яка має відмінну від послідовності зазначеного гена-мішені послідовність і називається "гетерологічною областю". Зазначена гетерологічна область може містити один, два або три неспівпадаючих нуклеотиди. Зазначені неспівпадаючі нуклеотиди можуть бути розташовані безперервно або ж можуть бути розділені одним або двома нуклеотидами,

гомологічними гену-мішені. Як варіант, зазначена гетерологічна область може також містити вставку з одного, двох, трьох або з п'яти чи менше нуклеотидів. Як варіант, послідовність зазначеного змішаного дуплексного олігонуклеотиду може відрізнятися від послідовності зазначеного гена-мішені тільки делецією одного, двох, трьох або п'яти чи менше нуклеотидів у змішаному дуплексному олігонуклеотиді. У цьому випадку вважається, що довжина і розташування гетерологічної області відповідає довжині делеції, незважаючи на те, що нуклеотиди зазначеного змішаного дуплексного олігонуклеотиду відсутні в гетерологічній області. Відстань між фрагментами зазначеного гена-мішені, які комплементарні двом гомологічним ділянкам, ідентична довжині гетерологічної області в тому випадку, коли має місце заміщення або заміщення. Якщо зазначена гетерологічна область містить вставку, зазначені гомологічні ділянки в результаті розташовані в змішаному дуплексному олігонуклеотиді на більшій відстані, ніж комплементарні їм гомологічні фрагменти зазначеного гена, а у випадку, коли зазначена гетерологічна область кодує делецію, вірним є обернене.

[0054] Кожен із РНК-сегментів зазначених змішаних дуплексних олігонуклеотидів являє собою частину гомологічної ділянки, тобто ділянку, що має послідовність, ідентичну фрагменту вказаного гена-мішені, чиї сегменти сумісно переважно містять щонайменше 13 нуклеотидів РНК-типу, переважно - від 16 до 25 нуклеотидів РНК-типу, ще більш переважно - 18-22 нуклеотидів РНК-типу і найбільш переважно - 20 нуклеотидів. Згідно з одним варіантом реалізації РНК-сегменти, що мають гомологію ділянок, розділені проміжним ДНК-сегментом, і кожен із них межує з ним, тобто вони ним "з'єднані". Згідно одному з варіантів реалізації кожен нуклеотид зазначеної гетерологічної області являє собою нуклеотид проміжного ДНК-сегменту. Проміжний сегмент ДНК, який містить вказану гетерологічну область змішаного дуплексного олігонуклеотиду, називається "мутаторним сегментом".

[0055] Згідно іншому варіанту реалізації даного винаходу, зазначений олігополімер нуклеїнових основ для генної репарації являє собою односторонній олігодезоксинуклеотидний мутаційний вектор (SSOMV), описаний у заявці на міжнародний патент РСТ/US00/23457, патентах США 6271360, 6479292 та 7060500, включених у дану заяву в усій повноті за допомогою посилання. Зазначена послідовність SSOMV заснована на тих же принципах, що і мутаційні вектори, описані в патентах США 5756325; 5871984; 5760012; 5888983; 5795972; 5780296; 5945339; 6004804 та 6010907 і в міжнародних публікаціях WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702 та WO 99/40789. Зазначена послідовність SSOMV містить дві ділянки, які гомологічні цільовій послідовності, розділені ділянкою, яка містить необхідну генну модифікацію, названу мутаторною ділянкою. Послідовність зазначеної мутаторної ділянки може бути рівною за довжиною послідовності, яка розділяє гомологічні ділянки цільової послідовності, але відрізнятися від неї за складом. Така мутаторна ділянка може призводити до заміни. Як варіант, гомологічні ділянки SSOMV можуть бути послідовно розташовані одна за одною, в той час як ділянки гена-мішені, які мають ту ж послідовність, розділені одним, двома або більше нуклеотидами. Такий SSOMV призводить до видалення з гена-мішені нуклеотидів, відсутніх у зазначеному SSOMV. Нарешті, ділянки послідовності зазначеного гена-мішені, ідентичні гомологічним ділянкам, можуть межувати в гені-мішені, але бути розділені одним, двома або більше нуклеотидами в послідовності SSOMV. Такий SSOMV призводить до вставки в послідовність гена-мішені.

[0056] Нуклеотиди SSOMV являють собою дезоксирибонуклеотиди, зв'язані за допомогою немодифікованих фосфодиефірних зв'язків, за винятком того, що 3'-кінцевий і/або 5'-кінцевий міжнуклеотидний лінкер або, як варіант, два 3'-кінцеві і/або 5'-кінцеві міжнуклеотидні лінкери можуть являти собою фосфотіоат або фосфоамідат. У контексті даного документа міжнуклеотидний лінкер являє собою лінкер, що зв'язує нуклеотиди SSOMV і не включає зв'язки між 3'-кінцевим нуклеотидом або 5'-кінцевим нуклеотидом і блокуючим замісником, див. вище. Згідно з окремим варіантом реалізації довжина SSOMV становить від 21 до 55 дезоксинуклеотидів, загальна довжина ділянок, що мають гомологію, складає, відповідно, щонайменше 20 дезоксинуклеотидів, і довжини щонайменше двох ділянок, що мають гомологію, повинні становити щонайменше 8 дезоксинуклеотидів.

[0057] SSOMV може бути сконструйований як комплементарний для нитки зазначеного гена-мішені, яка кодує або не кодує. Якщо бажана мутація являє собою заміну однієї основи, переважно, щоб обидва мутаторних нуклеотиди являли собою піримідин. Для досягнення достатньої виразності бажаного функціонального результату переважно, щоб і мутаторний нуклеотид, і цільовий нуклеотид в комплементарній нитці являли собою піримідин. Зокрема, переважними є SSOMV, що кодують трансверсії, тобто С або Т мутаторний нуклеотид помилково спарений, відповідно, з С або Т нуклеотидом в комплементарній нитці.

[0058] На додаток до олігодезоксинуклеотиду SSOMV може містити 5'-блокуючий замісник, приєднаний до 5'-кінцевих вуглецевих атомів за допомогою лінкера. Хімія вказаного лінкера не суттєва, важлива тільки його довжина, яка переважно має становити щонайменше 6 атомів і дозволяти лінкеру бути гнучким. Можуть застосовуватися різні нетоксичні замісники, такі як біотин, холестерин або інші стероїди або неінтеркалюючий катіонний флуоресцентний барвник. Зокрема, переважними як реагенти для отримання SSOMV є реагенти, що продаються під торговими найменуваннями Cy3™ і Cy5™ від Glen Research, Sterling Va., які являють собою захищені фосфорамідити, при включенні в олігонуклеотиди дають 3,3,3',3'-тетраметил N,N'-ізопропіл заміщені індомонокарбоціанінові та індодикарбоціанінові барвники відповідно. Cy3 є найбільш переважним. Якщо зазначений індокарбоціанін є N-оксиалкіл-заміщеним, він може бути зручно пов'язаний із 5'-кінцем олігодезоксинуклеотиду через фосфодиефір із 5'-кінцевим фосфатом. Хімія лінкера барвника, який з'єднує барвник і олігодезоксинуклеотид, не суттєва і він вибирається, виходячи зі зручності синтезу. Якщо застосовується, згідно з вказівками, комерційно доступний Cy3 фосфорамідит, 5'-модифікація, яка отримується в результаті, складається з блокуючого замісника та лінкера, які разом складають N-гідроксіпропіл-, N'-3,3,3',3'-тетраметиліндомонокарбоціанін.

[0059] Згідно одному з переважних варіантів реалізації зазначений індокарбоціаніновий барвник є тетразаміщеним за 3 і 3' положеннями індольних кілець. Без обмеження теорією, при таких заміщеннях зазначений барвник не є інтеркалюючим барвником. Тип замісників у цих положеннях не є критично важливим. SSOMV може додатково містити 3'-блокуючий замісник. Хімія вказаного 3'-блокуючого замісника також не є критично важливою.

[0060] Гетерологічна експресія

[0061] Згідно з певними варіантами реалізації гетерологічна експресія застосовується для експресії чужорідних генів або додаткових копій ендогенних генів у дріжджах (наприклад, *Yarrowia lipolytica*). Гетерологічна експресія в дріжджах може здійснюватися із застосуванням способів, загальновідомих у даній області техніки. Експресія чужорідних генів або додаткових копій ендогенних генів у дріжджах із застосуванням гетерологічної експресії може включати застосування вектора, який включає (а) промоторні послідовності для ініціації транскрипції, (b) термінаторні послідовності для термінації транскрипції і (c) маркер, що селектується. Гетерологічна експресія та експресійні вектори можуть відповідати описаним, наприклад, у оглядовій статті Madzak, C, Gaillardin, C, Beckerich, JM., 2004 Heterologous Protein Expression and Secretion in the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica* ("Гетерологічна експресія і секреція білків в неконвенційних дріжджах *Yarrowia lipolytica*"): *Journal of Biotechnology* 109:63-81. Згідно з певними варіантами реалізації описаних тут композицій і способів, вказаний вектор являє собою pYLEXI (Yeastern). Необмежений список відповідних генів-маркерів, що селектується, включає *ura3*, *lys5*, *trp1*, *leu2*, *adel*, *hph* *E.coli*, що кодує стійкість до гігроміцину, і SUC2 з *Saccharomyces cerevisiae*. Необмежений список відповідних промоторів включає pLEU2, pXPR2, pPOX2, pPOT1, pICLI, pG3P, pMTP, pTEF і pRPS7. Згідно з певними варіантами реалізації зазначений промотор є промотором *hp4d*, який являє собою сильний конститутивний гібридний промотор (патент США 6083717 від 4 липня 2000 р.). Необмежений список відповідних термінаторних послідовностей включає XPR2t, LIP2t і PH05t.

[0062] Згідно з певними варіантами реалізації один або більше, ніж один, ген *Yarrowia lipolytica* LYS1 (Génolevures YALI0B15444g), TRP1 (Génolevures YALI0B07667g) і ADE1 (Génolevures YALI0E33033g) застосовують як маркери, що селектуються. Згідно з певними варіантами реалізації один або більше генів *Yarrowia lipolytica* URA3 (GenBank: U40564.1) або LEU2 (Génolevures YALI0C00407) застосовують як маркери, що селектуються.

[0063] Згідно з певними варіантами реалізації інтеграційний експресійний вектор включає одну або більш промоторну і/або термінаторну послідовність, обрану з групи, що складається з генів гліколітичного шляху *Yarrowia lipolytica*, генів утилізації алканів або гліцерину, XPR2, ACC1, HMG1, ERG1 і ERG 9.

[0064] Згідно з певними варіантами реалізації здійснюється надекспресія однієї або обох субодиниць АТФ-цитрат-ліази *Yarrowia lipolytica* (Génolevures YALI0D24431g і YALI0E34793g) у *Yarrowia lipolytica*.

[0065] Модифіковані ферменти

[0066] Модифікований або мутантний фермент згідно з цим описом може бути модифікований або мutowаний заміною пар нуклеотидів, вставками, заміщеннями і т. п.

[0067] Гени, що кодують ферменти, залучені до шляху біосинтезу жирних кислот і шляху біосинтезу ізопреноїду є переважними мішенями для мутацій. Згідно деяким варіантам реалізації ген-мішень кодує ацил-КоА-карбоксилазу. Згідно іншим варіантам реалізації ген-мішень кодує ГМГ-КоА-редуктазу. Згідно іншим варіантам реалізації ген-мішень кодує

сқваленепоксидазу. Згідно іншим варіантам реалізації ген-мішень кодує сқваленсинтазу. Згідно певним варіантам реалізації ген-мішень кодує АТФ-цитрат-ліазу. Мутації можуть бути спрямовані на зниження чи усунення активності ферменту, посилення активності ферменту або зміну активності ферменту (наприклад, зміну субстратної селективності).

5 [0068] У жирових дріжджах дикого типу ацетил-КоА глибоко залучений у біосинтез жирних кислот за допомогою ацетил-КоА-карбоксілази (АССази). Таким чином, для того, щоб збільшити кількість ацетил-КоА, доступного для синтезу сқвалену, бажано низити експресію фермента або специфічну активність АССази. Типовою генною послідовністю АССази є ген ACC1 *Saccharomyces cerevisiae*, що відповідає номеру доступу Z71631. Відповідно, згідно
10 певним варіантам реалізації, знижена внутрішньоклітинна активність АССази, ферменту вузлового етапу між біосинтезом мевалонату і біосинтезом тригліцеридів буде знижувати кількість ацетил-КоА, задіяного у синтезі жирів, тим самим збільшуючи його доступність для ізопренового шляху.

15 [0069] ГМГ-КоА-редуктазна активність лімітує швидкість біосинтезу ізопрену. Типові генні послідовності ГМГ-КоА-редуктази включають гени HMG1 і HMG1 *Saccharomyces cerevisiae*, наведені в номерах доступу NC_001145 і NC_001144 відповідно. Таким чином, згідно визначеним варіантам реалізації ГМГ-КоА-редуктазна активність буде збільшуватися в результаті модифікації гена ГМГР, що призводить до стимуляції транскрипції, стабілізації білкового продукту і/або зниження інгібування продукту за типом зворотного зв'язку.

20 [0070] За допомогою зниження АССазної активності і/або збільшення ГМГ-КоА-редуктазної активності в дріжджах можна створити базовий організм для синтезу ізопреноїдів, здатного синтезувати ряд споріднених ізопреноїдних продуктів за допомогою управління ферментами, що лежать нижче, зазначеного сигнального шляху.

25 [0071] Сқвален-епоксидаза каталізує перший етап, задіяний у біосинтезі стеролу. Типова генна послідовність сқваленепоксидази представлена геном ERG1 *Saccharomyces cerevisiae*, який відповідає номеру доступу NC_001139. Відповідно, згідно певним варіантам реалізації сқваленепоксидазна активність, чутливість до інгібіторів і/або експресія будуть ослаблені в дріжджах, наприклад, каталітично значущими залишками в амінокислотній послідовності ферменту.

30 [0072] Сқваленсинтаза каталізує синтез сқвалену конденсацією двох с15 попередників ізопрену (фарнезилдифосфат (ФДФ)). Типовою генною послідовністю сқваленсинтази є ген ERG9 *Saccharomyces cerevisiae*, який відповідає номеру доступу NC_001140. Відповідно, згідно певним варіантам реалізації сқваленсинтазна активність і/або експресія в дріжджах буде(уть) збільшена(і).

35 [0073] АТФ-цитрат-ліаза (ЕС 4.1.3.8) каталітично розщеплює цитрат з утворенням ацетил-КоА і оксалоацетату. Ацетил КоА може використовуватися АССазою для біосинтезу жирних кислот або ацетил-КоА-ацетилтрансферазою для синтезу ізопренів та їх похідних, таких як сқвален.

40 [0074] Мевалонаткіназа являє собою перший після ГМГ-КоА-редуктази фермент мевалонатного шляху і каталізує перетворення мевалонату в мевалонат-5-фосфат. Відповідно, згідно певним варіантам реалізації, рівні мевалонаткіназної активності і/або експресії будуть збільшуватися в дріжджах, наприклад, за допомогою зміни каталітично значущих залишків в амінокислотній послідовності ферменту або збільшення дози гена чи кількості транскриптів.

45 [0075] Гліцеринкіназа каталізує перенесення фосфату від АТФ до гліцерину з утворенням гліцеринфосфату. Відповідно, згідно певним варіантам реалізації, рівні гліцеринкіназної активності і/або експресії збільшують у дріжджах, наприклад, за допомогою заміни каталітично важливих залишків у амінокислотній послідовності ферменту або збільшення дози гена чи рівнів його транскрипції.

50 [0076] Результатом метаболічних змін згідно з певними варіантами реалізації є передача вуглецю від ацетил-КоА до сқвалену і ослаблення основних конкурентних шляхів для вказаного потоку вуглецю, що призводить до значного збільшення кількості продукованого сқвалену.

[0077] Доставка олігополімерів нуклеїнових основ для генної репарації в дріжджові клітини

55 [0078] Для трансформації дріжджової клітини за допомогою олігополімера нуклеїнових основ для генної репарації згідно з запропонованим у даному винаході способом може застосовуватися будь-який загальновідомий метод. Типові способи включають застосування електропорації, LiOAc, біолістики, сферопластів і/або *Agrobacterium* (див., наприклад, McClelland, СМ., Chang, YC, and Kwon-Chung, KJ (2005) *Fungal Genetics and Biology* 42:904-913).

60 [0079] Згідно певним варіантам реалізації олігополімер нуклеїнових основ для генної репарації вводять у дріжджову клітину із застосуванням електропорації. Згідно з деякими варіантами реалізації олігополімер нуклеїнових основ для генної репарації вводять у дріжджову

клітину, хімічно оброблену ПЕГ (мол. маса 3350 або 4000) і/або ацетатом літію із застосуванням електропорації. Згідно певним варіантам реалізації олігополімер нуклеїнових основ для генної репарації вводять у дріжджову клітину із застосуванням ПЕГ (мол. м. 3350 або 4000) і/або ацетату літію.

5 [0080] Спеціальні умови для застосування мікроносіїв згідно способам, запропонованим в даному винаході, описані в міжнародній публікації WO 99/07865, US09/129298. Наприклад, охолоджені до температури льоду мікроносії (60 мг/мл), змішаний дуплексний олігонуклеотид (60 мг/мл), 2,5 М CaCl₂ та 0,1 М спермідину змішують у зазначеному порядку; суміш обережно перемішують, наприклад, на вортексі, протягом 10 хвилин і залишають при кімнатній
10 температурі на 10 хвилин, після чого мікроносії розводять у 5 частинах етанолу, центрифугують і ресуспендують у 100 % етанолі. Типові концентрації компонентів в адгезивному розчині становлять 8-10 мкг/мкл для мікроносіїв, 14-17 мкг/мкл для змішаного дуплексного олігонуклеотиду, 1,1-1,4 М для CaCl₂ і 18-22 мМ для спермідину. Згідно одному з прикладів, концентрації зазначених компонентів складають: 8 мкг/мкл для мікроносіїв, 16,5 мкг/мкл для змішаного дуплексного олігонуклеотиду, 1,3 М для CaCl₂ і 21 мМ для спермідину.

[0081] Згідно деяким варіантам реалізації олігополімери нуклеїнових основ для генної репарації можуть бути доставлені у зазначену дріжджову клітину із застосуванням електропорації, відповідно до загальновідомих для фахівців у даній області техніки методик (див., наприклад Becker, DM, and Guarente, L. High Efficiency Transformation of Yeast by Electroporation ("Високоєфективна трансформація дріжджів за допомогою електропорації"). Methods in Enzymology, vol. 194, section [12] pp. 182-186. 1991. Elsevier Academic Press, London.

[0082] Відбір дріжджів із потрібним модифікованим ферментом

[0083] Дріжджі, що експресують зазначений модифікований фермент, можуть бути ідентифіковані за допомогою одного з декількох способів. Згідно одному зі способів використовується стратегія спільної конверсії із застосуванням олігополімерів нуклеїнових основ для генної репарації (GRON) для спрямованої взаємодії як при конверсії, що селектується (тобто з маркером), так і при конверсії, що не селектується (наприклад, потрібного гена-мішені) в ході одного і того ж експерименту. Таким чином, клітини, в які не були вбудовані GRON, або які не здатні здійснювати перебудови, обумовлені GRON, будуть усунені. Оскільки доставка GRON, націлених на незв'язані гени, імовірно не буде селективною, можна очікувати, що колонія, яка успішно пройшла відбір на перетворення, також буде з певною частотою перетворена за одним із інших генів-мішеней. Конверсійні події можуть бути проаналізовані шляхом аналізу одиночного нуклеотидного поліморфізму (SNP).

[0084] Таким чином, геномну ДНК виділяють із дріжджів і проводять скринінг індивідуальних зразків ДНК із застосуванням ПЛР-аналізу, наприклад, алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (AC-ПЛР), для кожної мішені. Для незалежного підтвердження зазначеної зміни послідовності у позитивних дріжджів відповідна ділянка зазначеного гена-мішені може бути ампліфікована ПЛР; отриманий амплікон або секвенується безпосередньо, або клонується, і множинні вставки секвенують.

40 [0085] Як варіант, вбудовування мутації в потрібний ген може бути визначене за допомогою однієї з молекулярно-біологічних технік, розроблених для визначення мутацій одиночних нуклеотидів у виділеній нуклеїновій кислоті (наприклад, технік ампліфікації, таких як ПЛР-ампліфікація і аналіз методом подовження праймеру для одиночних нуклеотидів). Більш об'ємні мутації можуть бути визначені із застосуванням ампліфікації та секвенування ділянки гена-мішені, в яку має бути введена мутація.

[0086] Як варіант, дріжджі або дріжджові клітини, що містять модифікований фермент, можуть бути ідентифіковані, наприклад, за допомогою аналізу композиції ізопреноїдів, яка продукується зазначеними дріжджами. Цей спосіб має на увазі культивування зазначених дріжджів, виділення олій та їхній аналіз із застосуванням відомих у даній області техніки способів (наприклад, газової хроматографії або ВЕРХ).

ПРИКЛАДИ

[0087] Приклад 1. Системи трансформації *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis*

[0088] Для створення системи трансформації на основі *Cryptococcus curvatus* (АТСС штам 20508) і *Rhodotorula glutinis* (АТСС штами 10788 і 204091), експресійну касету KANMX (промотор-ген-термінатор), яка дає стійкість до канаміцину у *S. cerevisiae*, застосовують як селективний маркер для перетворення штамів, чутливих до канаміцину, у стійкі до канаміцину (див. наприклад, Baudin, A., et al. (1993) Nucleic Acids Research (21) 3329-3330). Зазначені штами трансформують тільки зазначеною експресійною касетою, а також KANMX, легованою в рестрикційні фрагменти плазмиди, описаною для *R. glutinis* (див., наприклад, Oloke, JK, and Glick, BR (2006) African Journal of Biotechnology 5 (4):327-332), яка містить ДНК-точки початку

реплікації. ДНК вводять у *S. curvatus* і *R. glutinis* із застосуванням електропорації, LiOAc, біолистики, сферопластів і/або *Agrobacterium* (McClelland, CM., Chang, YC, and Kwon-Chung, KJ (2005) *Fungal Genetics and Biology* 42:904-913).

[0089] Приклад 2. Маркери, що селектуються

5 [0090] Для отримання урацил-аутотрофних мутантів *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* клітини вирощували на мінімальному середовищі, яке містить антиметаболіт 5-фтороротову кислоту для відбору стійких мутантів з ушкодженнями в генах *ura3* або *ura5*. Зберігали 33 стабільні 5-FOAR колонії *Cryptococcus curvatus* і 20 стабільних 5-FOAR колоній *Rhodotorula glutinis*. Гени *URA3* дикого типу з *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis*

10 клонують і секвентують мутантні гени *ura3* з 5-FOAR ізолятів.
[0091] Інші ауксотрофні маркери клонують шляхом функціональної комплементачії в *Saccharomyces cerevisiae* (див. Ho, YR, Chang, MC (1988) *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* 21 (1): 1-8). Геномні і/або кДНК-бібліотеки конструюють з *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* для лігування в урацил-селектувальний експресійний вектор *Saccharomyces*

15 для трансформації в штам YPH500 (MAT α *ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1- Δ 63 his3- Δ 200 leu2- Δ 1*) для відбору лізінних, аденінових, триптофанових, гістидинових і лейцинових прототрофів. На основі цих прототрофів з геномної або кДНК-вставки секвентують гени, що відповідають *LYS2*, *ADE2*, *TRP1*, *HIS3* і *LEU2*.

20 [0092] Приклад 2. Маніпулювання генами дріжджів із застосуванням технології спрямованого мутагенезу RTDS
[0093] Алелі генів *leu2*, *lys5* і *ura3* штаму ATCC 90811 *Yarrowia lipolytica* (*leu2-35 lys5-12 ura3-18 XPR2B*) були клоновані за допомогою ПЛР, а їхні послідовності порівнювалися з алелями дикого типу для ідентифікації відмінностей.

25 [0094] Для гена *ura3* відмінності були виявлені в положеннях 1365 (AG мутація, яка призводить до мовчання AAA-AAG, що кодує лізин), 1503 (додаткові AAGAA послідовності у ATCC 90811, які викликають зміщення рамки з поверненням на місце в положенні 1511, призводячи до появи 7 додаткових амінокислот, після яких зазначена послідовність продовжується як YL URA3 з GenBank), 1511 (додатковий T в ATCC 90811), та 1978 (C \rightarrow T мутація, яка призводить до стоп-мутації, що обрізає білок за 24 амінокислоти до карбоксильного кінця). Олігонуклеотид GRON для відновлення прототрофності був отриманий шляхом конверсії STOP (TGA) \rightarrow R (CGA) для отримання 264R на основі YIUra3-YLU40564 нумерації амінокислот. Застосовували GRON, які являють собою YIUra31264/C/40/5 'Cy3 / 3'idC, з послідовністю:

30 VCGAGGTCTGTACGGCCAGAACCAGATCCTATTGAGGAGGH, і
YIUra31264/NC/40/5'Cy3/3'idC, який має наступну послідовність:
35 VCCTCCTCAATAGGATCTCGGTTCTGGCCGTACAGACCTCGH, де V=Cy3; H=3'DMT dC CPG. 10, 30 і 50 мкг кожного GRON трансформували в штам *Yarrowia lipolytica* ATCC 90811 з застосуванням ацетату літію і висівали на *ura*-середовище з 2 % глюкози. Усього було отримано 82 *ura* + колоній з GRON, сконструйованих за допомогою кодуючої нитки, і 6 колоній із GRON, сконструйованих за допомогою некодуєчої нитки, що демонструє перевагу однієї з ниток, характерну для трансформації олігонуклеотидами, що репарують пробіли. Секвенування 18 із зазначених трансформантів, отриманих із застосуванням кодуючої нитки, показало наявність необхідних змін у 17 клонах.

45 [0095] Для *LEU2* відмінності були виявлені в положеннях 1710 (відсутність додаткового C, яка веде до зміщення рамки і передчасної термінації білка); 1896 (додатковий T); 2036 (T \rightarrow A мутація, розташована за стоп-кодоном); 2177 (відсутній додатковий T за стоп-кодоном).

[0096] Для *LEU2* відмінності були виявлені в положеннях 1092 (G \rightarrow A TCG \rightarrow TCA, консервативне заміщення (серин)); 1278 (G \rightarrow A CAG \rightarrow CAA, консервативне заміщення (глутамін)); 1279 (G \rightarrow A GGT \rightarrow ATT, заміна V \rightarrow I).

50 [0097] Відповідно, зазначені мутації можуть застосовуватися з різними цілями, наприклад, для перетворення прототрофних дріжджів в ауксотрофні і навпаки.

[0098] Схожа стратегія демонстрації ефективності технології RTDS застосовується для *Cryptococcus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* згідно з описом для *Yarrowia lipolytica*, де мутації *ura3* коректують для відновлення прототрофності.

55 [0099] Згідно певним варіантам реалізації зазначена ефективність RTDS для *Y. lipolytica* може бути продемонстрована вбудовуванням у його геном мутантної версії гена гігromіцину *E. coli*. Така версія зазначеного гена, яка містить точкову мутацію G34T, кодує мутацію E12STOP, що не порушує природну чутливість до гігromіцину *Y. lipolytica*. Трансформація за допомогою GRON, яка коригує цю мутацію, буде надавати стійкості вказаному штаму *Y. lipolytica*, наприклад, до концентрацій гігromіцину до 1000 мкг/мл. Також конструюють подвійні мутації гена стійкості до гігromіцину (HGH), які складаються з G34T A37T (E12ASTOP K13STOP), що

піддаються корекції одиночним GRON, і G34T T149G (E12STOP Y46 STOP), що піддаються корекції двома GRON.

[00100] Для перевірки активності GRON у *Yarrowia lipolytica* використовували природну чутливість *Yarrowia lipolytica* дикого типу до аміноглікозидних антибіотиків гігromіцину В. Гігromіцин В (hmB) являє собою аміноциклітольний антибіотик, який продукується *Streptomyces hygrosopicus*, що інгібує синтез білків як у прокаріотів, так і у еукаріотів за допомогою порушення рибосомальної транслокації та аміноацил-ТРНК розпізнавання. Стійкості можна домогтися введенням гена *hph* (також відомого як *aph* (4)) з *E. coli* (GENBANK V01499), який кодує аміноциклітолфосфотрансферазу, яка інактивує гігromіцин В ковалентним приєднанням фосфатної групи в положенні 4 циклітольного кільця. Штам Polg *Yarrowia lipolytica* (Mat α *ura3-302: URA3 leu2-270 xpr2-322 axp-2* з Yeastern) трансформували геном *hph E. coli*, який містить або одиночну (E12stop в G34T), або подвійну мутацію E12stopK13stop (G34T.A37T), клонуваним у вектор pULEX1-2u-*ura3-13*, забезпечуючи контроль над геном промотору *hpd4* і термінатору XPR2. Лінеаризований вектор вбудовували в геном після відбору на відновлення прототрофності, виконаного за допомогою LEU2 маркера. Отримані штами містили непрацюючі версії гена гігromіцинофосфотрансферази (і тому були чутливі до гігromіцину) і були перетворені за допомогою наступних GRON, які відновлюють G34T або G34T.A37T до дикого типу (стійкого до гігromіцину).

GRON для відновлення E12stop до дикого типу (T34G)

20 HPH2/C/42/5'Cy3/3'idC

5'Cy3-GAACTCACCGCGACGTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAG-3'idC

HPH2/NC/42/5'Cy3/3'idC

5'Cy3-HCTTTTCGATCAGAACTTCTCGACAGACGTCGCGGTGAGTTC-3'idC

GRON для відновлення E12stopK13stop до дикого типу (T34G T37A)

25 HPH3/C/43/5'Cy3/3'idC

5'Cy3-CTCACCGCGACGTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCG-3'idC

HPH3/NC/43/5'Cy3/3'idC

5'Cy3-CGAACTTTTCGATCAGAACTTCTCGACAGACGTCGCGGTGAG-3'idC

[00101] 30 мкг зазначеного GRON застосовували для перетворення *hph* штаму, який містить одиночну або подвійну мутацію, в повторних культурах (× 6), об'єднували і аліквоту поміщали на чашки з YEPD, які містять 100-1000 мкг/мл гігromіцину для оптимізації відношення сигнал/шум. Для обох штамів було отримано значну кількість імовірно перетворених колоній при будь-якій концентрації гігromіцину вище контролю "без ДНК", з вираженою перевагою нитки GRON, що не кодує, в обох випадках. У сукупності ці результати дозволяють припустити наявність GRON-конверсії вказаного гена-мішені гігromіцинофосфотрансферази у *Yarrowia lipolytica*, а також можливість конверсії двох мутацій (T34G T37A) із застосуванням одиночного GRON. Для підтвердження відновлення генотипу дикого типу проводять секвенування ДНК.

| Штам | ДНК | Колонії на 100 мкг/мл гігро-міцину | Колонії на 200 мкг/мл гігро-міцину | Колонії на 400 мкг/мл гігро-міцину | Колонії на 600 мкг/мл гігро-міцину | Колонії на 800 мкг/мл гігро-міцину | Колонії на 1000 мкг/мл гігро-міцину |
|-----------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| E12stop | Без ДНК | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| E12stop | 30 мкг нитка, що кодує | 0 | 1 | 6 | 1 | 1 | 0 |
| E12stop | 30 мкг нитка, що не кодує | 20 | 21 | 21 | 12 | 10 | 8 |
| E 12stopK13stop | Без ДНК | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| E 12stopK13stop | 30 мкг нитка, що кодує | 2 | 2 | 1 | 2 | 0 | 2 |
| E 12stopK13stop | 30 мкг нитка, що не кодує | 5 | 3 | 5 | 7 | 8 | 8 |

[00102] Приклад 3. Клонування генів-мішеней

[00103] Послідовності АССази, ГМГР, скваленсинтази і скваленепоксидази, доступні в базі даних NCBI для *Saccharomyces* та інших дріжджів, застосовують як джерело ПЛР-праймерів, відповідні гени клонують із *Cryptosoccus curvatus* і *Rhodotorula glutinis* разом із відповідними регуляторними областями (промоторами, термінаторами). Для ідентифікації "підвищуючих" і "понижуючих" мутацій промоторів, які підвищують або знижують рівні транскрипції відповідно, промотори зазначених чотирьох генів клонують ДНК полімеразою порівняно низької точності для отримання точкових мутацій в зазначених промоторах, і ці фрагменти клонують у плазміди, злиті з репортерними генами зеленого флуоресцентного білка (GFP) або бета-галактозидази для тестування *in vitro* у *S. cerevisiae* або *E. coli*. Промоторні "підвищуючі" мутації повторно вводять у геномні послідовності ГМГР і скваленсинтази за допомогою RTDS, тоді як "понижуючі" промоторні мутації отримують у геномних послідовностях АССази і скваленепоксидази. Промотори важливих генів (наприклад, ГАФДГ, актину) у *R. glutinis* і *C. curvatus* клонують для застосування при гетерологічній експресії генів. Праймери для ПЛР-клонування отримують із гомологів цих генів у *S. cerevisiae*.

[00104] Приклад 4. Маніпулювання генами-мішенями для збільшення синтезу сквалену

[00105] АССаза. Визначають кількість копій гена АССази для *R. glutinis*, *C. curvatus* та інших дріжджів. RTDS застосовують для зниження експресії АССази введенням стоп-кодонів безпосередньо за ділянкою старту трансляції в будь-яких додаткових копіях.

[00106] Скваленепоксидаза. Подібним чином, збільшення акумуляції сквалену у *S. cerevisiae* досягається за допомогою руйнування однієї копії скваленепоксидази у диплоїдних клітинах. Kamimura, N., Hidaka, M., Masaki, H., Uozumi, T. (1994) *Appl. Microb. Biotech.* 42: 353-357. Визначають кількість копій скваленепоксидази у *R. glutinis*, *C. curvatus* та інших дріжджів, і застосовують RTDS для створення або вставки стоп-кодону безпосередньо за ділянкою старту трансляції в додаткових копіях, окрім першої копії.

[00107] Згідно деяким варіантам реалізації активність скваленепоксидази знижують додаванням тербінафіну (інгібітора скваленепоксидази) в середовище. Згідно певним варіантам реалізації у зазначеній скваленепоксидазі здійснюють амінокислотні заміни для збільшення чутливості скваленепоксидази до тербінафіну (наприклад, заміни амінокислот, гомологічних G30S, L37P і R269G на карті ERG1 *Saccharomyces*). Згідно деяким варіантам реалізації заміни амінокислот отримують генним синтезом і заміщенням гена дикого типу мутантною версією шляхом гомологічної рекомбінації. Згідно деяким варіантам реалізації зміни в гені дикого типу отримують за допомогою RTDS.

[00108] ГМГР. Ферменти ГМГР, як у *Saccharomyces cerevisiae*, так і у ссавців, містять амінокислотні послідовності в лінкерних ділянках, які присутні в багатьох короткоживучих білках - учасниках швидкого внутрішньоклітинного обміну речовин у клітині (див. Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986) *Science* 234: 364-368; та Chun, KT, and Simoni, RD (1991) *J. Biol.*

Chem. 267 (6): 4236-4246). Подібні послідовності, в разі їхньої наявності, ідентифіковані в генах ГМГР у *Y. lipolytica*, *R. glutinis* і/або *C. curvatus*, і усуваються із застосуванням RTDS для зниження обміну білка ГМГР. Такі подібні послідовності знайдені в гені скваленсинтази *S. cerevisiae*, і вони також виявляються у випадку присутності в генах скваленсинтази *Y. lipolytica*, *R. glutinis* і/або *C. curvatus*. Зазначені послідовності, в разі наявності в скваленсинтазі *Y. lipolytica*, *R. glutinis* і/або *C. curvatus*, також усуваються із застосуванням RTDS для зниження білкового обміну.

[00109] ГМГР у *S. cerevisiae* містить два висококонсервативних домени, 552 N-кінцеві амінокислоти яких відповідають за зв'язок із мембраною. Надекспресія усиченого білка HMG1, який містить тільки C-кінцевий каталітичний фрагмент, веде до 40-кратного збільшення активності ГМГ-КоА у *S. cerevisiae* із збільшенням накопичення сквалену до 5,5 % сухої маси (Polakowski, T., Stahl, U., Lang, C. (1998) Appl. Microbiol. Biotech. 49:66-71). Визначають, чи мають ГМГР білки *Y. lipolytica*, *R. glutinis* і *C. curvatus* лінійну структуру; у цьому випадку можуть експресуватися фрагменти, що містять тільки розчинний каталітичний домен.

[00110] Білкова структура і послідовність ДНК ГМГР мають високу консервативність у еукаріотів, від грибів до ссавців, включаючи мембранозв'язаний N-кінцевий домен і каталітичний C-кінцевий домен. Кордон між двома доменами може бути визначений як область амінокислот 500-600 гена HMG1 *Yarrowia lipolytica* (Génolevures *Yarrowia lipolytica* YALI0E04807g), де карта гідрофобності переходить із гідрофобної в гідрофільну область. Залишки 548 і 544 обирають шляхом оцінки карти гідрофобності HMG1 *Yarrowia lipolytica* і її гомології N-кінця усичених білків *Saccharomyces cerevisiae* (Donald, KAG, 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, згідно з одним із прикладів, експресуються амінокислоти 548-1000 C-кінцевого домену HMG1 I *Yarrowia lipolytica*; в іншому прикладі експресуються амінокислоти 544-1000 C-кінцевого домену HMG1 I *Yarrowia lipolytica*. У споріднених прикладах експресуються амінокислоти 543-1000 C-кінцевого домену HMG1 I *Yarrowia lipolytica* або амінокислоти 545-1000 C-кінцевих доменів HMG1 I *Yarrowia lipolytica*; або амінокислоти 546-1000 C-кінцевих доменів HMG1 I *Yarrowia lipolytica*; або амінокислоти 547-1000 C-кінцевих доменів HMG1 I *Yarrowia lipolytica*; або амінокислоти 549-1000 C-кінцевих доменів HMG1 I *Yarrowia lipolytica*.

[00111] Експресія C-кінцевого каталітичного домену з 457 амінокислот ГМГР (залишки 543-1000) у штаму Polg *Y. lipolytica* дає 2 % сквалену від загального вмісту ліпідів, у порівнянні з 0 % в контрольному штамі, який містить тільки вектор, при експериментах у колбах, які струшують. Зазначений процес повторюють у збільшеному об'ємі із застосуванням ферментерів.

[0101] У сирійського хом'ячка активність каталітичного домену ГМГР знижує регулюється фосфорилуванням АМФ-залежної кінази (Om Kumar, RV, Damay, BG, і Rodwell, VW (1994) J. Biol. Chem. 269:6810-6814), схожий тип регуляції описаний і для *S. cerevisiae*. Визначають, чи регулюються білки ГМГР у *R. glutinis*, *C. curvatus* та інших дріжджів подібним чином, і в такому випадку застосовують RTDS для видалення сайту фосфорилування.

[0102] Скваленсинтаза. Скваленсинтаза у ссавців узгоджено регулюється на рівні транскрипції, поряд із ГМГ-КоА-синтазою і фарнезилдифосфатсинтазою, за допомогою факторів SREBP (білки, що зв'язують стеролрегулюючі елементи) (Szkopinska, A., Swiezewska, E., Karst, F (2000) Biochem. Biophys. Res. Comm. 267:473-477). SREBP існують у трьох формах, одна з яких зв'язує промотор скваленсинтази. Визначають, чи присутні такі транскрипційні фактори і/або сайти зв'язування на промоторі скваленсинтази у *R. glutinis*, *C. curvatus* та інших дріжджів, і в такому випадку застосовують RTDS для внесення змін у транскрипційні фактори і/або сайти зв'язування, які підсилюють транскрипцію скваленсинтази.

[0103] Надекспресія скваленсинтази *Y. lipolytica* в штамі *Y. lipolytica* Polg призводила до отримання 2 % сквалену від загального вмісту ліпідів в порівнянні з 0 % у контрольному штамі, який містить лише вказаний вектор, у колбах, які струшують. Зазначений процес повторюють у збільшеному об'ємі із застосуванням ферментерів.

[0104] Приклад 5. Умови культивування *Cryptococcus curvatus*

[0105] Зростання *Cryptococcus curvatus* оцінювали для визначення найкращих джерел вуглецю для максимізації клітинної маси в культурі. На багатому поживному середовищі з дріжджовим екстрактом (10 г/л дріжджового екстракту, 20 г/л пептону), *C. curvatus* добре ріс у присутності 2-20 % (маса/об'єм) глюкози, досягаючи максимального рівня у 55 г/л сухої клітинної маси (СКМ) при 16 % (маса/об'єм) глюкози і вище через 4 дні. Подібним чином *C. curvatus* ріс на тому ж середовищі з 3-12 % (маса/об'єм) гліцерину, досягаючи СКМ 40 г/л у 12 % (маса/об'єм) гліцерину через 5 днів. *C. curvatus* також культивували на біодизельному гліцерині (Imperial Western Products, Coachella, CA) у концентрації до 3,5 % (маса/об'єм), що призводило до одержання 23 г/л СКМ.

[0106] Приклад 6. Середовищне маніпулювання генами-мішенями для збільшення синтезу сквалену

[0107] Середовищні маніпуляції перевіряють на здатність збільшувати вихід сквалену. Такі маніпуляції включають (a) інгібування експресії і/або активності АССази за допомогою олеїнової кислоти, оливкової або іншої(их) рослинної(их) олії(олій), інозитолу, холіну, сорафену, флуазіфопу і клетодиму або інших гербіцидів, що інгібують АССазу, (b) інгібування експресії і/або активності скваленепоксидази за допомогою тербінафіну, толнафтату і ергостеролу або інших фунгіцидів, що інгібують скваленепоксидазу, (c) маніпулювання співвідношенням С/Н у середовищах на основі гліцерину (у початковому середовищі або внесенням добавок), (d) варіювання джерела азоту в середовищі (органічний/неорганічний - просте/комплексне з'єднання), (e) варіювання режимів додавання вуглецю (наприклад, одноразове завантаження/додавання), (f) дослідження впливу нестачі поживних речовин, окрім джерела вуглецю, (g) варіювання джерела вуглецю, включаючи суміші цукрів, цукрові спирти, спирти, поліспирти і органічні кислоти, (h) відбір на зростання у присутності сполук, що інгібують ГМГР, таких як ловастатин або інші інгібітори статинового ряду, і (i) відбір на високі рівні синтезу олій у культурі із застосуванням ліпофільних контрастів або барвників і/або аналізу на ліпіди, що екстрагуються, із застосуванням, наприклад, методів гравіметрії та газової хроматографії.

[0108] Наприклад, *Yarrowia lipolytica* ATCC 90904 в присутності високих рівнів вуглецю / азоту в середовищі (C/N=420, Li, YH., Liu, B., Zhao, ZB., And Bai, FW. 2006 "Optimized Culture Medium and Fermentation Conditions for Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides*" ("Оптимізоване культуральне середовище та умови ферментації для синтезу ліпідів у *Rhodospiridium toruloides*") Chinese Journal of Biotechnology 22 (4): 650-656) (тут і далі "середовище СУМ001") з додаванням 0-50 мкг/мл тербінафіну при 30 °С, 300 об./хв. протягом 120 год. Концентрації тербінафіну 12,5 мкг/мл або вище призводили до отримання до 18,5 % сквалену від загального вмісту ліпідів.

[0109] Для отримання ліпідів і сквалену застосовують різні штами *Yarrowia lipolytica*, включаючи ATCC 20688, ATCC 90811, ATCC 90904, ATCC 90812, ATCC MYA-2613 і Yeastern polg. Наприклад, штам *Yarrowia lipolytica* polg (Yeastern) культивували в присутності високих рівнів вуглецю / азоту в середовищі (C/N=420, Li, YH., Liu, B., Zhao, ZB., Bai, FW. 2006 "Optimized Culture Medium and Fermentation Conditions for Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides*" ("Оптимізоване культуральне середовище та умови ферментації для синтезу ліпідів в *Rhodospiridium toruloides*"), Chinese Journal of Biotechnology 22 (4): 650-656) (тут і далі "середовище СУМ001") з додаванням 0-50 мкг/мл тербінафіну при 30 °С, 300 об./хв. протягом 120 год. Концентрації тербінафіну 12,5 мкг/мл або вище призводили до отримання до 38 % частки сквалену від загального вмісту ліпідів і частки ліпідів до 51 % від сухої клітинної маси.

[0110] Згідно з іншим прикладом штаму *Yarrowia lipolytica* ATCC 90904 культивували в середовищі СУМ001 з додаванням від 0 до 50 мкг/мл олеїнової кислоти при 30 °С, 300 об./хв. протягом 120 год. Виявлено, що додавання 10 мкг/мл олеїнової кислоти збільшує акумуляцію ліпідів відносно СКМ (сухої клітинної маси) 10-кратно в порівнянні з акумуляцією без додавання.

[0111] Згідно з іншим прикладом *Yarrowia lipolytica* ATCC 90904 культивували в середовищі СУМ001 з додаванням 0-200 мкМ клетодиму при 30 °С, 300 об./хв. протягом 120 год. Додавання 200 мкМ клетодиму призводило до 60-кратного збільшення виходу сквалену (мг) в колбі на 60 мл.

[0112] Збільшення кількості кисню, як було показано, призводить до диференціальної регуляції HMG1 і HMG2 у *S. cerevisiae*, що викликає швидке розкладання HMG2 і збільшення експресії HMG1 в аеробних умовах (Casey, WM, Keesler, GA, Parks, LW (1992) J. Bact. 174:7283-7288). З'ясовується, чи впливає кисень на якісь з генів ГМГР у використовуваних нами жирових дріжджах, і в цьому випадку їхню експресію й активністю керують у ферментері за допомогою змінення рівнів кисню.

[0113] З "середовищем СУМ001" як базовим (Li, YH., Liu, B., Zhao, ZB., Bai, FW. (2006) Chinese Journal of Biotechnology 22 (4):650-656) використовують різні компоненти і концентрації компонентів (у тому числі додають нові компоненти) для покращення росту клітин, збільшення частки загального вмісту ліпідів на одиницю клітинної маси і процентного вмісту сквалену в загальній масі ліпідів. Оцінювані компоненти середовища включають: джерела вуглецю: гліцерин, глюкозу; джерела азоту: сполуки амонію, нітрати, амінокислоти; мінеральні солі: калію, магнію, натрію, заліза, марганцю, цинку, кальцію, міді; дріжджовий екстракт; попередники ліпідів і ефектори синтезу ліпідів: тербінафін, клетодим, олеїнову кислоту, пальмітолеїнову кислоту, лінолеву кислоту, ліноленову кислоту; та противоспінюючі агенти. Інші прийняті до уваги фактори включають: процентний вміст інокуляту, витрачений на ферментацію час,

температуру, рН, зворотний тиск, розчинений кисень (DO), поживний склад, стратегію завантаження поживних речовин і стратегію перемішування.

[0114] Приклад 7. Відбір штамів

5 [0115] Для збільшення чистої продуктивності сквалену застосовують загальноприйняті способи відбору штамів жиркових дріжджів. Штами мутагенізують ультрафіолетом, нітрозогоуанідом або етилметансульфонатом, проводять скринінг або відбір за підвищеною акумуляцією сквалену. Штами також піддають багаторазовій селекції, наприклад, багаторазово проводять через середовище YEP (15 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л пептону), яке містить 3 % гліцерину, або середовище, яке містить ловастатин та інші відомі інгібітори ГМГР. Штами також 10 багаторазово проводять через середовище CYM001, яке містить варіюючі кількості гліцерину і/або глюкози, або середовище, яке містить ловастатин і/або інші відомі інгібітори ГМГР і/або інгібітори скваленсинтази для отримання спонтанних мутантів із збільшеною ГМГР і/або скваленсинтазою активністю. Такі мутації можуть розташовуватися в ГМГР, скваленсинтазі або інших генах ("мутації за вторинними сайтам").

15 [0116] Якщо не вказано інше, всі технічні та наукові терміни, які використовуються у даній заявці, мають значення, загальноприйняті та зрозумілі фахівцям у області техніки, до якої належить даний винахід.

[0117] Винаходи, описані в даному документі як приклади, можуть за необхідності застосовуватися при відсутності будь-якого(их) елемента(ів), обмеження або обмежень, не 20 описаних прямо в даному документі. Так, наприклад, терміни "що містить", "що включає", "має в складі" і т. п. повинні розумітися широко і без обмежень. Крім того, терміни і вирази, що використовуються в цьому документі, застосовуються з метою опису, а не обмеження, і застосування таких термінів і виразів не призначене для виключення будь-яких еквівалентів представлених і описаних ознак або їхніх частин, і необхідно розуміти, що є можливими різні 25 модифікації в рамках об'єму, описаного в даній заявці винаходу.

[0118] Таким чином, слід розуміти, що, незважаючи на те, що даний винахід було певним чином розкрито у вигляді переважних варіантів реалізації і додаткових характеристик, фахівці в даній області техніки можуть вдатися до модифікацій, покращень і варіацій втілень розкритого в даній заявці винаходу, і такі модифікації, покращення і варіації розглядаються як такі, що 30 входять до об'єму даного винаходу. Матеріали, способи і приклади, запропоновані в даній заявці, являють собою бажані варіанти реалізації, є прикладами і не призначені для обмеження об'єму даного винаходу.

[0119] Даний винахід було описано в даному документі загалом і в цілому. Будь-який із конкретних видів або підродових груп, що підпадають під загальне розкриття сутності винаходу, також є частиною даного винаходу. Сюди включено узагальнений опис даного винаходу з 35 обмовкою або негативним обмеженням, яка(е) стосується видалення будь-якого об'єкта винаходу зі вказаного роду об'єктів, незалежно від того, чи був виключений матеріал конкретно процитований у цьому документі.

[0120] Крім того, в тих випадках, коли властивості або аспекти даного винаходу описані в 40 термінах груп Маркуша, фахівцям у даній області техніки буде ясно, що даний винахід, таким чином, відноситься і до будь-якого конкретного представника або підгрупи зазначеної групи Маркуша.

[0121] Всі публікації, патентні заявки, патенти та інші посилання, згадані в даній заявці, 45 прямо включені сюди за допомогою посилання в усій повноті, в тій же мірі, коли б кожна з них була включена допомогою посилання в індивідуальному порядку. У разі суперечностей даний опис, включаючи визначення, буде мати переважну силу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

50 1. Спосіб одержання сквалену із застосуванням генетично змінених або тих, що не зазнали генетичних змін, дріжджів, причому зазначений спосіб включає культивування зазначених дріжджів із протигрибковим агентом, причому зазначені дріжджі є штамом *Yarrowia lipolytica* Yeastem polg, а зазначеним протигрибковим агентом є аліламіновий протигрибковий агент.

55 2. Спосіб за п. 1, у якому дріжджі є генетично модифікованими дріжджами, і при цьому спосіб включає підвищення або зниження активності або експресії одного або більше ферментів шляху біосинтезу ізопреноїдів, при цьому активність або експресія зазначеного ферменту підвищені або знижені в результаті однієї або більше спрямованої мутації, при цьому зазначені одна або більше спрямовані мутації знаходяться у певних положеннях у зазначеному ферменті, при 60 цьому зазначені генетично змінені дріжджі продукують підвищені кількості ізопреноїдів у порівнянні з нативними дріжджами.

3. Спосіб за п. 1, у якому протигрибковим агентом є аліламіновий протигрибковий агент у концентрації від 10 до 15 мкг/мл.
4. Спосіб за п. 2, у якому в зазначені один або більше модифікованих ферментів вводять мутації за допомогою олігополімерів нуклеїнових основ генної репарації.
5. Спосіб за п. 4, у якому олігополімер нуклеїнових основ генної репарації вибраний з групи, що складається зі змішаних дуплексних олігонуклеотидів, що не містять нуклеотиди молекул і одониткових олігодезоксинуклеотидів.
6. Спосіб за п. 5, у якому зазначений олігополімер нуклеїнових основ генної репарації є змішаним дуплексним олігонуклеотидом.
7. Спосіб за п. 6, у якому зазначений змішаний дуплексний олігонуклеотид складається менше ніж з 100 нуклеотидів, але більше ніж з 50 нуклеотидів.
8. Спосіб за п. 5, у якому зазначені перша та друга нитки змішаного дуплексного олігонуклеотиду містять дві ділянки, які гомологічні двом фрагментам зазначеного гена-мішені.
9. Спосіб за п. 2, у якому зазначені один або більше модифікованих ферментів включають фермент, вибраний з групи, що складається з ацетил-КоА-карбоксилази (АККази), ГМГ-КоА-редуктази, скваленоксидази, скваленсинтази, АТФ-цитратліази, АТФ-цитратсинтази, мевалонаткінази, гліцеринкінази та 5-амінолевулінатсинтази.
10. Спосіб за п. 9, у якому зазначена мевалонаткіназа має підвищені активність або експресію.

20

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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

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