

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2012111430/10, 04.08.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
26.08.2009 EP 09075393.0

(43) Дата публикации заявки: 20.10.2013 Бюл. № 29

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 26.03.2012(86) Заявка РСТ:
EP 2010/004925 (04.08.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/023298 (03.03.2011)Адрес для переписки:
105082, Москва, Спартаковский пер., 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(71) Заявитель(и):

ОРГАНОБЕЛЕНС ГМБХ (DE)

(72) Автор(ы):

**ЛАНГ Кристине (DE),
РАБ Андреас (DE)**(54) **ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОРГАНИЗМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПИДОВ**

(57) Формула изобретения

1. Выделенный генно-модифицированный организм не млекопитающих, в котором активность ацил-СоА:стерол ацилтрансферазы/стерол О-ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.26) и/или диацилглицерол ацилтрансферазы/диацилглицерол О-ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.20) и/или лецитин холестеринацил трансферазы/фосфолипид: диацилглицерол ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.158) и/или ацил-СоА:длинноцепочечной-спиртовой О-ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.75) уменьшена или устранена по сравнению с соответствующим организмом дикого типа, и где активность НМГ-СоА-редуктазы (ЕС 1.1.1.34), повышена по сравнению с соответствующим организмом дикого типа.

2. Организм по п.1,

в котором как минимум первый липид, преимущественно триацилглицерин и/или стеарилациловый эфир и/или восковый эфир, накапливающийся в липидных частицах соответствующего организма дикого типа, более не синтезируется, и

в котором второй липид, отличающийся от первого липида, накапливается в липидных частицах генно-модифицированного организма,

где второй липид преимущественно является нейтральным липидом, более преимущественно, выбранным из группы, состоящей из пренольных липидов, в частности, является изопреноидом, даже более преимущественно является тритерпеном, и наиболее преимущественно, выбранным из сквалена, производного сквалена, где производное сквалена содержит одну или более, в частности 1-10 или 1-4,

дополнительных метильных или этильных групп, связанных с атомами углерода каркаса вместо атома(атомов) водорода, связанных с атомами углерода каркаса в сквалене, и ацилового эфира стерольного липида, преимущественно, стерола или стероида.

3. Организм по п.1 или 2, в котором одна или две, или все активности, выбранные из группы, состоящей из SAM:C-24 стеролметилтрансферазы (ЕС 2.1.1.41), C-22 стеролдесатуразы (ЕС 1.14.14.-) и C-5 стеролдесатуразы (ЕС 1.14.21.6), уменьшены или устранены по сравнению с соответствующим организмом дикого типа.

4. Организм по п.1 или 2, в котором одна или две, или все активности, выбранные из группы, состоящей из скваленмонооксигеназы (ЕС 1.14.99.7), стерол-14-деметилазы (ЕС 1.14.13.70) и 7-дегидрохолестеринредуктазы (ЕС 1.3.1.21), повышены по сравнению с соответствующим организмом дикого типа.

5. Организм по п.1 или 2, в котором вместо или дополнительно к модифицированной активности в соответствии с п.1, активность и/или количества HAP4p и/или SAK1p увеличены и/или в котором активность и/или количества REG1p и/или FLD1p уменьшены или устранены.

6. Организм по п.1 или 2,

где стерол является холестерином, производным холестерина, 7-дегидро-холестерином, ланостерином, производным ланостерина, зимостерином, производным зимостерина, латостерином, производным латостерина, кукурбитаценом, производным кукурбита, эпистеролом, производным эпистерола, теастероном, производным теастерона, кастастероном, производным кастастерона, тифастеролом, производным тифастерола, катастероном, производным катастерона, циклоейкаленолом, производным циклоейкаленола, ситостеролом, производным ситостерола, изофукостеролом, производным изофукостерола, фукостеролом, производным фукостерола, горгостеролом, производным горгостерола, эргостерол, производным эргостерола, стигмастеролом или производным стигмастерола, или

где стероид является андростероном, производным андростерона, тестостероном, производным тестостерона, андростендиолом, производным андростендиола, андростендионом, производным андростендиона, калустероном, производным калустерона, метандриолом, производным метандриола, боластероном, производным боластерона, эпиандростероном, производным эпиандростерона, местанолоном, производным местанолон, станолоном, производным станолон, стенолоном, производным стенолона, эпитестостероном, производным эпитестостерона, кортизолом, производным кортизола, альдостероном, производным альдостерона, прегненолоном, производным прегненолона, кортизоном, производным кортизона, кортикостероном, производным кортикостерона, норетиндроном, производным норетиндрона, урокортизолом или производным урокортизола.

7. Организм по п.1 или 2,

где организм является прокариотным организмом, преимущественно бактерией, более преимущественно, выбранной из группы, состоящей из *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium*, *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus spec.* или *Streptomyces spec.*,

или где организм является эукариотным организмом, преимущественно грибом, растением, водорослями, или клеткой насекомого, более преимущественно, выбранным из группы, состоящей из *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Lipomyces starkeyi*, *Candida curvata*, *Rhodospiridium tortuloides*, *Mortierella isabellina*, *Mucor javanicus*, *Saccharomyces*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces spec.*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Fusidium*, *Gibberella*, *Mortierella*, *Trichoderma*, *Aspergillus spec.*, *Penicillium spec.* Или *Dictyostelium spec.*, в частности, из *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces delbruckii*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces*

к применению, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces microellipsoides*, *Saccharomyces montanus*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oleaceus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomycodes ludwigii*, дрожжей рода *Kluyveromyces*, например, *K. lactis*, *K. marxianus* var. *marxianus*, *K. thermotolerans*, рода *Candida*, например, *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida lipolytica* и *Candida versatilis*, рода *Pichia*, например, *Pichia stipidis*, *Pichia pastoris* и *Pichia sorbitophila*, рода *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Saccharomycesopsis*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Wickerhamia*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces*, *Ogataea*, *Kuraishia*, *Komagataella*, *Metschnikowia*, *Williopsis*, *Nakazawaea*, *Cryptococcus*, *Torulaspora*, *Bullera*, *Rhodotorula*, *Williopsis* и *Sporobolomyces*, или группы, состоящей из арахиса, капусты, канолы, подсолнечника, сафлора, мака, горчицы, конопли, касторового масла, оливы, амаранта, семян мексиканской чии, кунжута, календулы, гранаты, сунцур, коровяка, артишока, шиповника, фундука, миндаля, макадамии, авокадо, лавра, тыквы, льна, сои, фисташек, бурачника, кокосового ореха, грецкого ореха, кукурузы, пшеницы, ржи, овса, тритикале, риса, ячменя, хлопка, маниоки, перца, бархатцев, пасленовых, картофеля, пальмового дерева, табака, баклажана, вики, гороха, альфальфа, кофе, какао, чая, ивы, трав, *Physcomitrella* или *Ceratodon*, или группы, состоящей из *Cryptista*, *Chloromonadophyceae*, *Xanthophyceae*, *Cryptophyceae*, *Chrysophyta*, *Bacillariophyta*, *Phaeophyta*, *Rhodophyta*, *Chlorophyta*, *Haptophyta*, *Cryptista*, *Euglenozoa*, *Dinophyta*, *Chlorarachniophyta*, или группы, состоящей из *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Mamestra brassicae*, *Drosophila*.

8. Применение организма по любому из пп.1-7 для получения липида, преимущественно второго липида, включающее культивирование организма и выделение липида из организма.

9. Применение второго липида, полученного в соответствии с п.8, при получении композиции адъюванта для вакцины, в качестве биоразлагаемого смазывающего вещества, в качестве адъюванта в косметике, и/или фармацевтических средств, содержащих косметически или фармацевтически активное вещество, отличное от второго липида, где второй липид смешивают с косметически или фармацевтически активным веществом и получают как галеновый препарат для введения, преимущественно местного или перорального введения.

10. Конструкт нуклеиновой кислоты, в частности плазмид или интегративная кассета экспрессии, включающие нуклеиновую кислоту или несколько нуклеиновых кислот, одинаковые или разные, кодирующие белок, имеющий одну или несколько следующих активностей: ацил-КоА:стеролацилтрансферазы/стерол-О-ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.26) и/или диацилглицеролацилтрансферазы/диацилглицерол-О-ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.20) и/или лецитинхолестеринацилтрансферазы/фосфолипид: диацилглицерол ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.158) и/или скваленмонооксигеназы (ЕС 1.14.99.7) и/или стерол-14-деметилазы (ЕС 1.14.13.70) и/или 7-дегидрохолестерин редуктазы (ЕС 1.3.1.21) и/или НАР4р и/или SAK1р, где нуклеиновая кислота контролируется как минимум одним преимущественно конститутивно-активным промотором.

11. Конструкт нуклеиновой кислоты по п.10, дополнительно содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, имеющий HMG-КоА-редуктазную (ЕС 1.1.1.34) активность, где указанный белок контролируется как минимум одним преимущественно конститутивно-активным промотором.

12. Применение конструкта нуклеиновой кислоты по п.10 или 11 для получения организма в соответствии с одним из пп.1-7, в котором трансформируют организм предшественника, где организм предшественника является организмом дикого типа или организмом предшественника, где одну или две, или все активности выбранные из

группы, состоящей из SAM:С-24 стеролметилтрансферазы (ЕС 2.1.1.41), С-22 стеролдесатуразы и/или С-5 стеролдесатуразы (ЕС 1.14.21.6) и/или ацил-СоА: стеролацилтрансферазы/стерол О-ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.26) и/или диацилглицеролацилтрансферазы/диацилглицерол-О-ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.20) и/или лецитинхолестеринацилтрансфераза/фосфолипид: диацилглицерол ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.158) и/или ацил-СоА:длинноцепочечной-спиртовой О-ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.75) и/или REG1p и/или FLD1p, уменьшены или устранены по сравнению с соответствующим организмом дикого типа.

R U 2 0 1 2 1 1 1 1 4 3 0 A

R U 2 0 1 2 1 1 1 1 4 3 0 A