



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012114690/10, 14.09.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.09.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.09.2009 EP 09170312.4

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2013 Бюл. № 30

(45) Опубликовано: 20.01.2016 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Enzyme Nomenclature найдено в интернет [<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/0303.html#10>], 1992. KR 0100755508 B1 04.09.2007. KR 1020080078460 A 27.08.2008. CROUCH, N.P. ET AL.: "A Mechanistic Rationalisation for the Substrate Specificity of Recombinant Mammalian 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (4-HPPD)", Tetrahedron, vol. 53, no. 20, (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 16.04.2012

(86) Заявка РСТ:
EP 2010/063460 (14.09.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/032934 (24.03.2011)

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

МАРЛЬЕР Филипп (BE)

(73) Патентообладатель(и):

Сайентист оф Форчи С.А. (LU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ 3-ГИДРОКСИ-3-МЕТИЛМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ ИЗ АЦЕТОНА И АЦЕТИЛ-СОА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области химического синтеза и микробиологии. Предложен способ получения 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты из ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу. Также предложены соответствующие рекомбинантный

организм, его применение, композиция, применение фермента с активностью HMG CoA синтазы и применение ацетона для получения 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты. 7 н. и 6 з. п. ф-лы, 9 ил., 4 табл., 7 пр.

(56) (продолжение):

19 May 1997 (1997-05-19), pages 6993-7010, XP004105682. Lee I. Y. ET AL.: "Conversion of beta-methylbutyric acid to beta-hydroxy-beta-methylbutyric acid by *Galactomyces reessii*" APPLIED AND ENVIROMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 63, no. 11, November 1997 (1997-11), pages4191-4195. RU2245365 C2, 27.01.2005.

R U 2 5 7 3 3 8 9 C 2

R U 2 5 7 3 3 8 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012114690/10, 14.09.2010**

(24) Effective date for property rights:
14.09.2010

Priority:

(30) Convention priority:
15.09.2009 EP 09170312.4

(43) Application published: **27.10.2013** Bull. № 30

(45) Date of publication: **20.01.2016** Bull. № 2

(85) Commencement of national phase: **16.04.2012**

(86) PCT application:
EP 2010/063460 (14.09.2010)

(87) PCT publication:
WO 2011/032934 (24.03.2011)

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
seksija 1, ehtazh 3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):
MARLER Filipp (BE)

(73) Proprietor(s):
Sajentist of Forchi S.A. (LU)

(54) **METHOD OF PRODUCING 3-HYDROXY-3-METHYL-BUTYRIC ACID FROM ACETONE AND ACETYL-COA**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to chemical synthesis and microbiology. The invention discloses a recombinant organism, use thereof, a composition, use of an enzyme with HMG CoA synthase activity and use of acetone to produce 3-hydroxy-3-methyl-butyric

acid.

EFFECT: method of producing 3-hydroxy-3-methyl-butyric acid from acetone and a compound which provides an activated acetyl group.

13 cl, 9 dwg, 4 tbl, 7 ex

C 2
6 8 9
3 3 8 9
2 5 7 3 3 8 9
R U

R U
2 5 7 3 3 8 9
C 2

Изобретение относится к способу получения 3-гидрокси-3-метилмаслянной кислоты (также упоминаемая как бета-гидроксиизовалерат или ГИВ) из ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, включающему ферментное превращение ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, в 3-гидрокси-3-метилмаслянную кислоту. Превращение использует фермент, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть, C=O) ацетона и метильной группой соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу. Предпочтительно, фермент, используемый в процессе, является ферментом с активностью HMG CoA синтазы (ЕС 2.3.3.10) и/или PksG протеин и/или фермент с активностью лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза (ЕС 4.1.3.4). Представленное изобретение также относится к организмам способным продуцировать 3-гидрокси-3-метилмаслянную кислоту из ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, и использованию вышеупомянутых ферментов и организмов для продуцирования 3-гидрокси-3-метилмаслянной кислоты. В заключение, представленное изобретение относится к использованию ацетона для получения 3-гидрокси-3-метилмаслянной кислоты.

3-Гидрокси-3-метилмаслянная кислота (также упоминаемая как бета-гидроксиизовалерат или ГИВ; смотри Фигуру 1) является метаболитом незаменимой аминокислоты лейцина и синтезируется в организме человека. Она может быть найдена в малых количествах в грейпфруте, люцерне и соме. Известно, что она также встречается при некоторых метаболических расстройствах катаболизма лейцина, то есть гиповалериановая ацидемия. Показано, что 3-гидрокси-3-метилмаслянная кислота может оказывать действие на увеличение мышечной массы и силы (Nissen et al., J. Appl. Physiol. 81 (1996), 2095-2104). Wilson et al. (Nutrition & Metabolism 5 (2008)) предлагает, как механизм действия, следующее:

- повышение сарколеммальной целостности путем превращения HMG CoA реуктазой
- увеличение синтеза белка посредством mTOR пути
- снижение разрушения белка вследствие ингибирования убиквитинного пути.

Предполагается, что 3-гидрокси-3-метилмаслянная кислота содействует сопротивлению мышц расщеплению белка, способствует восстановлению мышц и поддерживает повышение выносливости. Описано, что она помогает пациентам с хроническим обструктивным заболеванием легких в отделениях интенсивной терапии в больницах, с истощением мышц, связанным с ВИЧ и раком, и пострадавшим от травмы с тяжелыми повреждениями. Таким образом, она представляет коммерческий интерес из-за ее применения как мышечного усилителя для бодибилдинга и как лекарственного средства для избегания истощения мышц.

Патент Соединенных Штатов 7026507 описывает процесс изготовления твердых композиций натрия 3-гидрокси-3-метилбутирата, в котором на первой стадии процесса, 4,4-диметилноксетан-2-он подвергают взаимодействию с водным раствором натрия гидроксида для образования раствора натрия 3-гидрокси-3-метилбутирата, и потом, если необходимо, после концентрации раствор используют на следующей стадии процесса синтетического диоксида кремния, на которой полученный в результате продукт, если необходимо, сушат.

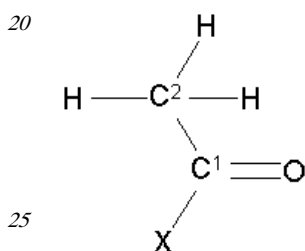
Желательно обеспечить процесса получения 3-гидрокси-3-метилбутирата, который не зависел бы от неорганических стадий производства и который мог бы быть осуществлен в живых организмах, в связи с этим, был бы экологически безопасным и недорогим. В этом контексте, Lee и др. (Appl. Environ. Microbiol. 63 (1997), 4191-4195)

описывают способ получения 3-гидрокси-3-метилбутирата путем превращения 3-метилмасляной кислоты в 3-гидрокси-3-метилмасляную кислоту, используя микроорганизм *Galactomyces reessii*. Однако, хотя этот процесс позволил получение 3-гидрокси-3-метилбутирата, существует необходимость обеспечить альтернативные эффективные и экономически эффективные пути получения 3-гидрокси-3-метилбутирата, в особенности, посредством биологических процессов.

Представленное изобретение соответствует данному требованию для альтернативного процесса получения 3-гидрокси-3-метилбутирата и предусматривает способ, который основывается на биологических источниках и позволяет получать 3-гидрокси-3-метилбутират *in vitro* или *in vivo* в микроорганизме или других видах.

В частности, представленное изобретение относится к способу получения 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты (также упоминаемой как бета-гидроксиизовалерат или ГИВ) из ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, включающему ферментное превращение ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, в 3-гидрокси-3-метилмасляную кислоту.

Ацетон представляют следующей формулой: $\text{CH}_3\text{-(C=O)-CH}_3$. В предпочтительном варианте осуществления соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, изображают следующей формулой (I):



в которой X выбран из группы, состоящей из: S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(OH)-C(CH₃)₂-CH₂-O-PO₂H-C₁₀H₁₃N₅O₇P (кофермент А), S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(OH)-C(CH₃)₂-CH₂-O-PO₂H-полипептид (ацильный носитель протеина), S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(OH)-C(CH₃)₂-CH₂-OH (пантетеин), S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₃ (N-ацетилцистамин), S-CH₃ (метантиол), S-CH₂-CH(NH₂)-CO₂H (цистеин), S-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-CO₂H (гомоцистеин), S-CH₂-CH(NH-C₅H₈N₀₃)-CO-NH-CH₂-CO₂H (глутатион), S-CH₂-CH₂-SO₃H (кофермент М) и OH (уксусная кислота).

Превращение использует фермент, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, в соответствии с формулой (I). В соответствии с данной схемой реакции оксо-группа ацетона реагирует, как электрофил, а метильная группа соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу в соответствии с формулой (I) реагирует, как нуклеофил. Общая реакция превращения ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу в соответствии с формулой (I), показана на фигуре 5.

Реакция может происходить в одну стадию, то есть 3-гидрокси-3-метилбутират может быть напрямую получен реакцией, катализированной описанным выше ферментом. Альтернативно, реакция может включать две стадии, в особенности в случае, когда используют ацетил СоА как соединение, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, в смысле, что сначала получают аддукт 3-гидрокси-3-метилбутирата и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, например,

3-гидрокси-3-метилбутират-СоА, который впоследствии гидролизуют, например, до 3-гидрокси-3-метилбутирата и СоА. Таким образом, в первом альтернативном случае, фермент катализирует полную реакцию как показано на фигуре 5. Во втором

5 альтернативном случае, фермент катализирует образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, но X остается в молекуле. Затем, X удаляют в последствии из молекулы гидролизом. Представленное изобретение впервые демонстрирует, что
10 существует возможность получить 3-гидрокси-3-метилбутират, используя фермент, который может переносить активированную ацетильную группу к ацетону. В уровне техники описывается получение 3-гидрокси-3-метилбутирата из изовалериановой кислоты путем биопревращения, используя грибок *Galactomyces reessii*. Однако принимая во внимание, что изовалериановую кислоту получают из лейцина путем
15 декарбоксилирования, и что лейцин сам получается при метаболизме из полной конденсации двух молекул пирувата и одной молекулы ацетила СоА, этот процесс получения является энергетически невыгодным. Процесс представленного изобретения лишен этого недостатка. В общем, в контексте представленного изобретения мог бы быть использован какой-либо фермент, который связывает соединение, обеспечивающее активированную ацетильную группу, как определено выше, как один субстрат, а также
20 субстрат, который содержит как компонент группу ацетона. В одном предпочтительном варианте осуществления ферментом является фермент, который связывает ацетил СоА как субстрат. Примерами таких ферментов являются HMG СоА синтаза, HMG СоА лиаза или другие лиазы расщепления/конденсации C-C связи. Однако, как будет также объяснено ниже, ферменты, которые обычно используют в реакции, которую они
25 катализируют в природе, ацетил-донор отличный от ацетила СоА, могут использовать ацетил СоА или ему аналогичный, например, PksG протеин.

В другом предпочтительном варианте осуществления ферментом является фермент, который связывает как субстрат соединение, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, в соответствии с формулой (I), в которой X является протеином
30 ацил-носителем, таким как ацетил-S-АспК протеин, кодированный pksX кластером генов для продуцирования бациллина в *Bacillus subtilis*. Примером такого фермента является PksG протеин. PksG протеин является одним из протеинов, кодированных pksX кластером генов из *Bacillus subtilis*. PksG протеин способен катализировать перенос карбоксиметильной группы -CH₂-CO₂H от ацетил-S-АспК к сложному p-кетотиоэфиру
35 поликетидного промежуточного вещества, соединенного с одним из тиолированных доменов PksL протеина, в реакции, которая аналогична той, что катализируется HMG СоА синтазой. Однако, в контексте представленного изобретения показано, что PksG протеин также может использовать ацетил СоА вместо ацетил-S-АспК протеина как
40 донора активированной ацетильной группы.

В одном предпочтительном варианте осуществления соединение, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, является ацетилом СоА. Ацетил СоА (также известный как ацетил кофермента А) по химической структуре является сложным тиоэфиром кофермента А (тиол) и уксусной кислоты.

45 В другом предпочтительном варианте осуществления соединение, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, имеет формулу (I), в которой X является протеином ацил-носителем, таким как ацетил-S-АспК протеин, кодированный pksX кластером генов для продуцирования бациллина в *Bacillus subtilis*.

Предпочтительно, фермент, использованный в процессе, является ферментом с

активностью HMG CoA синтазы (EC 2.3.3.10) и/или PksG протеином, и/или ферментом с активностью лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза (EC 4.1.3.4).

В одном предпочтительном варианте осуществления способ в соответствии с представленным изобретением включает ферментное превращение ацетона и ацетил CoA в 3-гидрокси-3-метилбутират с ферментом, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода C² ацетил CoA в соответствии с формулой (I).

В предпочтительном варианте осуществления фермент, использованный в процессе в соответствии с изобретением, является ферментом, который имеет активность HMG CoA синтазы (EC 2.3.3.10), или ферментом, который имеет активность PksG протеина, или ферментом, который имеет активность лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза (EC 4.1.3.4).

В частности, в контексте представленного изобретения показано, что HMG CoA синтаза может связывать ацетон вместо обычного ацетоацетил-CoA субстрата, в связи с этим, позволяет превращение ацетил-CoA (или соединения в соответствии с формулой (I)) и ацетона в 3-гидрокси-3-метилбутират. Более того, в контексте представленного изобретения показано, что PksG протеин может использовать ацетил CoA как субстрат вместо Ac-S-AcpK протеина, и может катализировать реакцию, которая обычно катализируется HMG CoA синтазой. Таким образом, предполагается, что также PksG протеин, который катализирует реакцию аналогичную реакции HMG CoA синтазы, будет способен катализировать превращение ацетона и соединения формулы (I) в 3-гидрокси-3-метилбутират. Более того, предполагается, что лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такие как HMG CoA лиаза, могут катализировать превращение ацетил-CoA и ацетона в 3-гидрокси-3-метилбутирил-CoA, который, в свою очередь, может быть гидролизован до 3-гидрокси-3-метилбутирата и CoA.

В контексте представленной заявки термин "HMG CoA синтаза" или "протеин/фермент, имеющий активность HMG CoA синтазы" относится к какому-либо ферменту, который классифицируется в EC нумерации EC 2.3.3.10 (ранее, HMG-CoA синтаза классифицировалась как EC 4.1.3.5, но была переведена в EC 2.3.3.10), в частности, он относится к какому-либо ферменту, который способен катализировать реакцию, в которой ацетил-CoA конденсируется с ацетоацетил-CoA, чтобы образовать 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA (HMG-CoA) (смотри фигуру 2) и термин также относится к какому-либо ферменту, который получен из такой HMG CoA синтазы и, которая способна катализировать превращение ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, как определено выше, предпочтительно ацетил CoA, в 3-гидрокси-3-метилбутират.

Ферментная активность конденсирующей ацетил-CoA с ацетоацетил-CoA для образования 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA (HMG-CoA) может быть измерена способом, хорошо известным с уровня техники. Одно возможное и предпочтительно используемое исследование описано, например, в Clinkenbeard et al. (J. Biol. Chem. 250 (1975), 3108-3116). В этом исследовании активность синтазы HMG-CoA измеряют путем мониторинга понижения абсорбции при 303 нм, которое сопровождается исчезновением ацетил-CoA-зависимой енолятной формы ацетоацетил-CoA. Предпочтительно активность HMG CoA синтазы исследовали как описано в примрнр 3.

HMG CoA синтаза является частью мевалонатного пути. Два пути определены для синтеза изопентилпирофосфата (ИПФ), то есть мевалонатный путь и глицеральдегид 3-фосфат-пируватный путь. HMG CoA синтаза катализирует биологическую конденсацию

Кляйзена (Claisen) ацетил-СоА с ацетоацетил-СоА и является представителем суперсемейства ацил-конденсирующих ферментов, которое включает бета-кетотиолазы, синтазы жирных кислот (синтаза протеина бета-кетоацильного носителя) и синтазы поликетиды. HMG СоА синтаза описана для различных организмов. К тому же, доступны

5 аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие HMG СоА синтазы, из многочисленных источников. Обычно, последовательности совместно используют только небольшую степень из полной идентичности последовательностей. Например, ферменты из *Staphylococcus* или *Streptococcus* демонстрируют только около 20% идентичности к тем, что у человека и

10 птичьей HMG СоА синтазе. В некоторых источниках описано, что бактериальные HMG СоА синтазы и их животные аналоги демонстрируют только около 10% всеобщей идентичности последовательностей (Sutherlin et al., J. Bacteriol. 184 (2002), 4065-4070). Однако, аминокислотные остатки, участвующие в реакциях ацетилирования и конденсации, сохраняются среди бактериальных и эукариотических HMG СоА синтаз

15 (Campobasso et al., J. Biol. Chem. 279 (2004), 44883-44888). Определяли трехмерную структуру ферментов HMG СоА синтазы, и ключевые аминокислоты для ферментной реакции, в принципе, являются хорошо описанными (Campobasso et al., loc. cit.; Chun et al., J. Biol. Chem. 275 (2000), 17946-17953; Nagegowda et al., Biochem. J. 383 (2004), 517-527; Hegardt, Biochem. J. 338 (1999), 569-582). У эукариотов существует две формы HMG СоА

20 синтазы, то есть цитозольная и митохондральная форма. Цитозольная форма играет ключевую роль в продуцировании холестерина и других изопреноидов, и митохондральная форма вовлечена в продуцирование кетоновых тел.

В принципе, какой-либо фермент HMG СоА синтазы может быть использован в контексте представленного изобретения, в частности из прокариотических или

25 эукариотических организмов.

Описаны прокариотические HMG СоА синтазы, например, из *Staphylococcus aureus* (Campobasso et al., loc. cit.; Uniprot номер доступа Q9FD87), *Staphylococcus epidermidis* (Uniprot номер доступа Q9FD76), *Staphylococcus haemolyticus* (Uniprot номер доступа Q9FD82), *Enterococcus faecalis* (Sutherlin et al., loc. cit.; Uniprot номер доступа Q9FD7),

30 *Enterococcus faecium* (Uniprot номер доступа Q9FD66), *Streptococcus pneumoniae* (Uniprot номер доступа Q9FD56), *Streptococcus pyogenes* (Uniprot номер доступа Q9FD61) и *Methanobacterium thermoautotrophicum* (номер доступа AE000857), *Borrelia burgdorferi* (NCBI номер доступа BV0683).

Более того, в следующей таблице А перечислено некоторые известные HMG СоА синтазы от прокариотов:

35

Таблица А	
Swissprot/TrEmbl номер доступа	Организм
Q9YAS0	<i>Aeropyrum pernix</i>
A7Z4Y2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
40 P40830 2874037340	<i>Bacillus subtilis</i>
B8G795	<i>Chloroflexus aggregans</i>
A5EUV4	<i>Dichelobacter nodosus</i>
A5FM54	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
Q18GC4	<i>Haloquadratum walsbyi</i>
B9LS15	<i>Halorubrum lacusprofundi</i>
45 A9B8F0	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>
A2BMY8	<i>Hyperthermus butylicus</i>
Q5FLB7	<i>Lactobacillus Kucnomaophilus</i>
Q03QR0	<i>Lactobacillus brevis</i>
Q1GAH5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>

	B2GBL1	Lactobacillus fermentum
	B1MZ51	Leuconostoc citreum
	Q03WZ0	Leuconostoc mesenteroides
	A4YH99	Metallosphaera sedula
5	A5UNI8	Methanobrevibacter smithii
	Q58941	Methanocaldococcus jannaschii
	Q12UR3	Methanococcoides burtonii
	A6USZ1	Methanococcus aeolicus

	Swissprot/TrEmbl номер доступа	Организм
10	A4FWW6	Methanococcus maripaludis
	A6UPL1	Methanosarcina mazei
	A2STY2	Methanocorpusculum labreanum
	Q8TVL0	Methanopyrus_ andleri
	Q8PYJ0	Methanosarcina mazei
	Q2NHU7	Methanosphaera stadtmanae
15	Q2FPH4	Methanospirillum hungatei
	B2HGT6	Mycobacterium marinum
	Q3IMZ7	Natronomonas pharaonis
	Q8EP69	Oceanobacillus iheyensis
	Q04F95	Oenococcus oeni
	Q03FU5	Pediococcus pentosaceus
20	Q6L233	Picrophilus torridus
	A6G7N7	Plesiocystis pacifica
	A4WJ12	Pyrobaculum arsenaticum
	A7NHZ7	Roseiflexus castenholzii
	Q8CN06	Staphylococcus epidermidis
	Q4L958	Staphylococcus haemolyticus
	Q4A0D6	Staphylococcus saprophyticus
25	B4U364	Streptococcus equi
	Q8DUI5	Streptococcus mutans
	Q4J933	Sulfolobus Kucnomaocaldarius
	Q971K8	Sulfolobus tokodaii
	Q9HI87	Thermoplasma Kucnomaophilum
30	Q31EW2	Thiomicrospira crunogena
	Q51798	Pyrococcus furiosus
	A5VJB7	Lactobacillus reuteri
	Q7CF79	Streptococcus pyogenes
	Q9UWU0	Sulfolobus solfataricus

Описаны эукариотические HMG CoA синтазы, например, из грибов, таких как Schizosaccharomyces pombe (номера доступа U32187 и P54874), Saccharomyces cerevisiae (номер доступа P54839), растений, таких как резуховидная талья (Arabidopsis thaliana) (номера доступа X83882 и P54873), сосна обыкновенная (Pinus sylvestris) (номер доступа X96386) и животных, таких как Caenorhabditis elegans (номер доступа P54871), домовая мышь (Mus musculus) (митохондральная; номер доступа P54869 и Hegardt, Biochem. J. 338 (1999), 569-582), серая крыса (Rattus norvegicus) (митохондральная: номер доступа P22791 и Hegardt, Biochem. J. 338 (1999); цитозольная: номер доступа P17425), 569-582), китайский хомячок (Chinese hamster) (Cricetulus griseus: номер доступа P13704), домашняя свинья (Sus scrofa) (митохондральная; номер доступа U90884 и Hegardt, Biochem. J. 338 (1999), 569-582), человек разумный (Homo sapiens) (митохондральная: номер доступа P54868 и Hegardt, Biochem. J. 338 (1999), 569-582; цитозольная: номер доступа Q01581), рыжий таракан (Blattella germanica) (цитозольная форма 1; номер доступа P54961), рыжий таракан (Blattella germanica) (цитозольная форма 2; номер доступа P54870) и банкивская джунглевая курица (Gallus gallus) (цитозольная; номер доступа P23228).

Примеры HMG CoA синтаз из различных организмов даны в SEQ ID NO: 1 до 14. SEQ ID NO: 1 показывает последовательность цитоплазматической HMG CoA синтазы *Caenorhabditis elegans* (P54871, банк генов F25B4.6), SEQ ID NO: 2 показывает последовательность цитоплазматической HMG CoA синтазы of *Schizosaccharomyces pombe* (делящиеся дрожжи; P54874), SEQ ID NO: 3 показывает последовательность цитоплазматической HMG CoA синтазы *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи; P54839, банк генов САА65437.1), SEQ ID NO: 4 показывает последовательность цитоплазматической HMG CoA синтазы резуховидной тали (*Arabidopsis thaliana*) (кресс «мышинное-ухо»; P54873), SEQ ID NO: 5 показывает последовательность цитоплазматической HMG CoA синтазы *Dictyostelium discoideum* (слизевой гриб; P54872, банк генов L2114), SEQ ID NO: 6 показывает последовательность цитоплазматической HMG CoA синтазы *Blattella germanica* (рыжий таракан; P54961, банк генов X73679), SEQ ID NO: 7 показывает последовательность цитоплазматической HMG CoA синтазы *Gallus gallus* (курица; P23228, банк генов СНКНMGCOAS), SEQ ID NO: 8 показывает последовательность цитоплазматической HMG CoA синтазы *Homo sapiens* (человек; Q01581, банк генов X66435), SEQ ID NO: 9 показывает последовательность митохондральной HMG CoA синтазы *Homo sapiens* (человек; P54868, банк генов X83618), SEQ ID NO: 10 показывает последовательность митохондральной HMG CoA синтазы *Dictyostelium discoideum* (слизевой гриб; Q86HL5, банк генов ХМ_638984), SEQ ID NO: 11 показывает последовательность HMG CoA синтазы *Staphylococcus epidermidis* (Q9FD76), SEQ ID NO: 12 показывает последовательность HMG CoA синтазы *Lactobacillus fermentum* (B2GBL1), SEQ ID NO: 13 показывает последовательность HMG CoA синтазы *Hyperthermus butylicus* (A2BMY8), SEQ ID NO: 14 показывает последовательность HMG CoA синтазы *Chloroflexus aggregans* (B8G795), SEQ ID NO: 24 показывает последовательность HMG CoA синтазы *Lactobacillus delbrueckii* (Q1GAN5) и SEQ ID NO: 25 показывает последовательность HMG CoA синтазы *Staphylococcus haemolyticus* Q4L958 (I98>V различие по сравнению с протеином дикого типа).

В предпочтительном варианте осуществления представленного изобретения HMG CoA синтаза является ферментом, содержащем аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: от 1 до 14 или последовательность, которая является, по меньшей мере, на п % идентичной к какой-либо из SEQ ID NO: от 1 до 14 и, которая имеет активность HMG CoA синтазы с п, которое является целым числом между 10 и 100, предпочтительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99.

Предпочтительно, степень идентичности определяют сравнением соответствующей последовательности с аминокислотной последовательностью какой-либо одной из вышеупомянутых SEQ ID NO. Когда последовательности, которые сравнивают, не имеют одинаковую длину, степень идентичности, предпочтительно, или относится к процентному содержанию аминокислотных остатков в более короткой последовательности, которая является идентичной аминокислотным остаткам в более длинной последовательности, или к процентному содержанию аминокислотных остатков в более длинной последовательности, которая является идентичной аминокислотным остаткам в более короткой последовательности. Степень идентичности последовательности может быть определена в соответствии со способами, хорошо известными с уровня техники, используя, предпочтительно, приемлемые компьютерные алгоритмы, такой как CLUSTAL. Когда, используя способ анализу Clustal для определения одной конкретной последовательности из двух является, например, на 80% идентичной контрольной последовательности, параметры, установленные по

умолчанию могут быть использованы или исходные параметры являются предпочтительно следующими: матрица: blosum 30; открытый штраф за пропуск в последовательности: 10,0; штраф за продолжение делеции: 0,05; дивергентное запаздывание: 40; пространственная изоляция разрыва: 8 для сравнений аминокислотных последовательностей. Для сравнений нуклеотидных последовательностей штраф за продолжение делеции предпочтительно составляет до 5,0.

Предпочтительно, степень идентичности рассчитывают сверх полной длины последовательности.

HMG CoA синтаза, использованная в процессе в соответствии с изобретением, может быть встекающей в природе HMG CoA синтазой или она может быть HMG CoA синтазой, которую получают из встречающейся в природе HMG CoA синтазы, например, введением мутаций или других альтераций которые, например, изменяют или улучшают ферментную активность, стабильность, и т.д.

Термин "HMG CoA синтаза" или "протеин/фермент, имеющий активность HMG CoA синтазы" в контексте представленной заявки также охватывает ферменты, которые получают из HMG CoA синтазы, которая способна к продуцированию 3-гидрокси-3-метилбутирата путем ферментного превращения ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, как определено выше, предпочтительно ацетил-CoA, но, который только имеет низкую аффинность к ацетоацетил-CoA, как субстрату, или делает уже не приемлемым ацетоацетил-CoA, как субстрат. Такая модификация предпочтительного субстрата HMG CoA синтазы позволяет улучшить превращение ацетона в 3-гидрокси-3-метилбутират и понизить продуцирование побочного продукта, например, HMG-CoA. Способы модифицирования и/или улучшения ожидаемых ферментных активностей протеинов хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники и включает, например, неспецифический мутагенез или сайт-направленный мутагенез, и является результатом отбора ферментов, имеющих ожидаемые свойства или подходы так-называемого "направленного развития".

Например, для геной инженерии в прокариотических клетках, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая HMG CoA синтазу, может быть введена в плазмиды, которые разрешают мутагенез или модификацию последовательности рекомбинацией последовательностей ДНК. Стандартные способы (смотри Sambrook and Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) позволяют основные обмены, для осуществления или природных, или синтетических последовательностей, которые будут добавлены. ДНК фрагменты могут быть связаны друг с другом путем использования адаптеров и линкеров к фрагментам. Более того, могут быть использованы инженерно-технические мероприятия, которые обеспечивают приемлемые сайты рестрикции или удаление остатка ДНК или сайтов рестрикции. В тех случаях, в которых внедрения, удаления или замещения являются возможными, могут быть использованы *in vitro* мутагенез, "первичная репарация", рестрикция или сшивание. В основном, анализ последовательности, анализ рестрикции и другие способы биохимии и молекулярной биологии выполняются как способы анализа. Полученные в результате варианты HMG CoA синтазы далее исследуют на их ферментную активность и, в частности, на их способность предпочитать как субстрат ацетон, больше чем ацетоацетил-CoA. Исследование для измерения способности HMG CoA синтазы для использования ацетона как субстрата описано в примере 5. Образование 3-гидрокси-3-метилбутирата может быть обнаружено путем сравнения со стандартным соединением, например, после разделения тонкослойной хроматографией, ЖХ/МС и колориметрическим анализом после его дериватизации или масс-спектрометрией.

В частности, реакция происходит в реакционной смеси, содержащей 40 мМ Трис-НСI pH 8, от 5 до 50 мМ ацетил-СоА, от 100 до 500 мМ ацетона, 1 MgCl₂ (за исключением митохондрия HMG-СоА синтазы), 0,5 мМ DTT и фермент, варьирующий в диапазоне от 0,2 до 8 мг/мл. Контрольные реакции проводили в отсутствии фермента и одного из субстратов.

Прохождение синтеза сопровождается анализом аликутов, взятых после увеличения периода инкубации при 30 или 37°C. Как правило, аликуту 50 мкл отбирают после 48 часов инкубации, нагревают в течение 1 минуты при 100°C, чтобы удалить протеины, центрифугируют и супернатант переносят в чистую виалу для определения ГИВ посредством масс-спектрометрии. Раствор 3-гидрокси-3-метилбутирата получают в 40 мМ Трис-НСI pH 8, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ DTT, нагревают, как описано выше, и используют как стандартный образец.

Образцы анализируют на PE SCIEX API 2000 тройном квадрупольном масс-спектрометре в режиме отрицательных ионов с раствором H₂O/ацетонитрил=60/40, содержащей 0,1% триэтиламина в качестве подвижной фазы, скорость потока составляла 40 мкл/мин. 10 мкл каждого супернатанта смешивают с равным количеством подвижной фазы и напрямую впрыскивают в массспектрометр. Контролируют присутствие [3-гидрокси-3-метилбутират-Н]⁻ иона. Синтез 3-гидрокси-3-метилбутирата также могут проводить в присутствии меченого радиоизотопом [2-¹⁴C] ацетона. Образование продукта анализируют после разделения реакционной смеси путем ТСХ или ВЭЖХ.

В предпочтительном варианте осуществления HMG СоА синтаза, использованная в представленном изобретении, является ферментом, которая имеет К_м значение для ацетона 300 мМ или ниже, предпочтительно 250 мМ или ниже, даже более предпочтительно 200 мМ или ниже и особенно предпочтительно 150 мМ или ниже. Предпочтительно К_м значение определяют при условиях, описанных в примере 7. В другом предпочтительном варианте осуществления HMG СоА синтаза, использованная в представленном изобретении, имеет k_{cat} значение для описанной реакции, по меньшей мере, 0,1×10⁻⁴ сек⁻¹, предпочтительно, по меньшей мере, 0,2×10⁻⁴ сек⁻¹, даже более предпочтительно, по меньшей мере, 0,5×10⁻⁴ сек⁻¹ и особенно предпочтительно, по меньшей мере, 1×10⁻⁴ сек⁻¹, по меньшей мере, 2×10⁻⁴ сек⁻¹, по меньшей мере, 3×10⁻⁴ сек⁻¹ или, по меньшей мере, 5×10⁻⁴ сек⁻¹. Предпочтительно, k_{cat} значение определяют при условиях, описанных в примере 7.

С уровня техники известно, что His264 птичьей HMG СоА синтазы играет роль во взаимодействии фермента с ацетоацетил-СоА и, что Ala264 разновидность испытывает недостаток взаимодействия с кислородом остатка сложного тиоэфира ацетоацетил-СоА (Misraa et al., Biochem. 35 (1996), 9610-9616). Таким образом, в целях разработки вариантов предположим, что HMG СоА синтаза, которая демонстрирует более низкую восприимчивость ацетоацетил-СоА как субстрата, но которая принимает ацетон как субстрат, систематически мутирует в HMG СоА синтазу гистидинового остатка, который соответствует His264 птичьей HMG СоА синтазы, описанной в Misraa et al. (цит.месте), для того чтобы уменьшить или заблокировать восприятие ацетоацетил-СоА как субстрата. В дополнение, варианты HMG СоА синтазы могут предусматривать те, которые демонстрируют повышенную активность. Steussy et al. (Biochemistry 45 (2006), 14407-14414), например, описали мутанта Enterococcus faecalis HMG СоА синтазы, в котором Ala110 изменился до Gly110 и, который демонстрирует повышение 140-изгибов всей скорости реакции.

Способы определения вариантов с улучшенными ферментными свойствами, поскольку это касается получения 3-гидрокси-3-метилбутирата, также могут осуществлять в присутствии кофактора, который позволяет стерическую и/или электронную комплементацию в каталитическом сайте ферменте/ферментов вследствие того, что субстратный ацетон короче, чем природный субстратный ацетоацетил-СоА HMG CoA синтазы. Одним примером такого кофактора был бы кофермент А или структурно близкородственная молекула, такая как S-нитрозо-СоА.

Модифицированная версия HMG CoA синтазы, воспринимающая ацетон как субстрат, но, имеющая низкую аффинность к ацетоацетил-СоА как субстрату или не длинее, воспринимающей ацетоацетил-СоА как субстрат, может быть получен из встречающейся в природе HMG CoA синтазы или из уже модифицированной, оптимизированной или синтетически синтезированной HMG CoA синтазы.

Другим примером протеина, который может быть использован в способе в соответствии с изобретением, является PksG протеин. В контексте представленной заявки термин "PksG протеин" или "протеин/фермент, имеющий активность PksG протеина" относится к какому-либо ферменту, который способен катализировать реакцию, которая в природе катализируется посредством PksG протеина, то есть перенос $-CH_2COO^-$ от ацетил-S-АсрК (Ac-S-АсрК) до сложного p-кетотиозэфирного поликетидного промежуточного соединения, присоединенного к одному из тиолированных доменов PksL протеина. Это - реакция, которая является аналогичной к той, что катализируется HMG CoA синтазой с тем отличием, что ацетил-сложный тиозэфир фосфопантетеильного остатка присоединяется к протеину-носителю вместо того, чтобы к части кофермента А. Хотя PksG протеин в реакции, которую он катализирует в природе, переносит ацетильную группу от ацетил-S-АсрК к акцептору, в контексте представленного изобретения показано, что PksG протеин, кроме того, может осуществлять реакцию, которая обычно катализируется HMG CoA синтазой, то есть синтез HMG CoA, начинающийся с ацетоацетила СоА и ацетила СоА (смотри пример 3, в котором в таблице 1 показано, что фермент из *Mycobacterium marinum* (B2HGT6) может действовать на ацетоацетил СоА и ацетил СоА).

Ферментная активность PksG протеина может быть измерена способами, известными с уровня техники. Одно возможное и предпочтительно использованное исследование описано, например, в Calderone et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006), 8977-8982). В этом исследовании ацетоацетил (Acac)-S-PksL-T2 используют как модельный субстрат и инкубируют вместе с Ac-S-АсрК и PksG протеином. Образование HMG-S-PksL-T2 демонстрирует, что PksG протеин способен переносить карбоксиметильную группу $-CH_2-CO_2H$ от Ac-S-АсрК к (Acac)-S-PksL-T2. Образование HMG-S-PksL-T2 может быть определено или путем электроспрей ионизации (ESI)-FTMS или путем автордиографии. В предпочтительном варианте осуществления соответствующие исследования выполняют, как описано на странице 8982 Calderone et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006), 8977-8982). PksG протеин является частью pksX пути в *Bacillus subtilis*, который кодирует ферменты, несущие ответственность за биосинтез бациллина (Butcher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (2007), 1506-1509). Кодированными протеинами являются АсрК, PksC, PksL, PksF, PksG, PksH и PksI. В соответствии с Calderone et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006), 8977-8982) эти ферменты действуют, чтобы ввести ацетатное производное p-метильной ветки на ацетоацетил-8-носитель протеина.

В предпочтительном варианте осуществления представленного изобретения PksG протеин является ферментос, содержащим аминокислотную последовательность, как

показано в SEQ ID NO: 15 или 16, или последовательность, которая является, по меньшей мере, на п % идентичной к SEQ ID NO: 15 или 16 и, имеющая активность PksG протеина с п, которое является целым числом между 10 и 100, предпочтительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99. SEQ ID NO: 15 показывает аминокислотную последовательность PksG протеина *Bacillus subtilis* (P40830) и SEQ ID NO: 16 показывает аминокислотную последовательность PksG протеина *Mycobacterium marinum* (B2HGT6).

Поскольку это касается определения степени идентичности последовательности, то используется такое же, как изложено выше применительно к HMG CoA синтазе.

PksG протеин, использованный в процессе в соответствии с изобретением, может быть встречающимся в природе PksG протеином или он может быть PksG протеином, который получают из встречающегося в природе PksG протеина, например, путем введения мутаций или других альтераций, которые, например, изменяют или улучшают ферментную активность, стабильность и т.д.

Термин "PksG протеин" или "протеин/фермент, имеющий активность PksG протеина" в контексте представленной заявки, кроме того, предусматривает ферменты, которые получены из PksG протеина, который способен продуцировать 3-гидрокси-3-метилбутират путем ферментного превращения ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, как определено выше,

предпочтительно ацетил-CoA, но который имеет только низкую аффинность к их природному субстрату или делает больше не восприимчивым к их природному субстрату. Такая модификация предпочтительного субстрата PksG протеина позволяет улучшить превращение ацетона в 3-гидрокси-3-метилбутират и понизить выход нежелательных побочных продуктов. Способы модификации и/или улучшения желаемых ферментных активностей протеинов хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники и описаны выше. Полученные в результате варианты PksG протеина далее исследовали на их ферментную активность и в особенности на их способность отдавать предпочтение ацетону как субстрату. Исследование измерения способности PksG протеина использовать ацетон как субстрат описано в примере 5 для HMG-CoA синтазы. Образование 3-гидрокси-3-метилбутирата может быть обнаружено, как описано выше. Такие способы идентификации вариантов с улучшенными ферментными свойствами с точки зрения получения 3-гидрокси-3-метилбутирата могут также быть осуществлены в присутствии кофактора, который позволяет стерическую и/или электронную комплементацию в каталитическом сайте фермента/ферментов в связи с тем фактом, что субстрат ацетона короче чем природный субстрат PksG протеина.

Модифицированная версия PksG протеина, воспринимающая ацетон как субстрат, но имеющая низкую аффинность к или не длинее, природно воспринимающего субстрата, может быть получена из встречающегося в природе PksG протеина или из уже модифицированного, оптимизированного или синтетически синтезированного PksG протеина.

В контексте представленного изобретения термин "лиаза расщепления/конденсации С-С связи" или "протеин/фермент, имеющий активность лиазы расщепления/конденсации С-С связи" относится к ферменту, который способен к расщеплению или образованию путем конденсации С-С связи и который содержит так называемый ТИМ (триозофосфат изомераза) цилиндрический домен. Этот ТИМ цилиндрический домен находят в ряде пируват связанных ферментов и ацетил-CoA зависимых ферментах (Forouhar et al. *J. Biol. Chem.* 281 (2006), 7533-7545). ТИМ цилиндрический домен имеет классификационную линию дифференцировки 3.20.20.150 в СATH классификационной базе данных протеинов

(www.cathdb.info/cathnode/3.20.20.150). Термин "лиазы расщепления/конденсации С-С связи", в частности, включает ферменты, которые классифицируют как синтазу изопротилмалата (ЕС 2.3.3.13), как синтазу гомоцитрата (ЕС 2.3.3.14) или как альдолазу 4-гидрокси-2-кетовалерата (ЕС 4.1.3.39). Синтаза изопротилмалата катализирует следующую реакцию: ацетил-СоА+3-метил-2-оксобутаноат+Н₂О↔(2S)-2-изопротилмалат+СоА. Примерами таких ферментов являются соответствующий фермент из *Brucella abortus* (штамм 2308; Q2YRT1) и соответствующий фермент из *Nahella chejuensis* (штамм KCTC 2396; Q2SFA7).

Синтаза гомоцитрата (ЕС 2.3.3.14) является ферментом, который катализирует химическую реакцию ацетил-СоА+Н₂О+2-оксоглутарат↔(R)-2-

гидроксипутан-1,2,4-трикарбоксилат+СоА. Альдолаза 4-гидрокси-2-кетовалерата катализирует химическую реакцию 4-гидрокси-2↔оксопентаноат ацетальдегид+пируват.

В контексте представленного изобретения термин "HMG СоА лиаза" или "протеин/фермент, имеющий активность HMG СоА лиазы" относится к какому либо ферменту, который классифицирован в ЕС под номером ЕС 4.1.3.4, в частности, он относится к какому-либо ферменту, который способен катализировать расщепление HMG СоА до ацетила СоА и ацетоацетата (смотри фигуру 3) или противоположное направление этой реакции, то есть получение HMG СоА путем конденсации ацетил СоА и ацетоацетата, и термин, кроме того, относится к какому-либо ферменту, который получают из такой HMG СоА лиазы и который способен катализировать превращение ацетона и соединения, обеспечивающего активированную ацетильную группу, как определено выше, предпочтительно ацетил СоА, в 3-гидрокси-3-метилбутирил-СоА. В контексте представленного изобретения полученный 3-гидрокси-3-метилбутирил-СоА далее может быть гидролизован, чтобы получить 3-гидрокси-3-метилбутират. Это могло быть достигнуто мероприятиями, известными квалифицированному специалисту с уровня техники, например, путем использования ацил-СоА гидролазы (ЕС 3.1.2.20) или ацил-СоА трансферазы (ЕС 2.8.3.8).

Ферментная активность HMG СоА лиазы может быть измерена способами, хорошо известными с уровня техники. Описано одно возможное исследование, например, у Mellanby et al. (Methods of Enzymatic Analysis; Bergmeyer Ed. (1963), 454-458). В частности, ферментную активность измеряют путем спектрофотометрического исследования, используя NADH-зависимое восстановление ацетоацетата посредством 3-гидроксипутират дегидрогеназы. Предпочтительно активность HMG СоА лиазы исследуют, как описано в примере 4. В таком исследовании реакционная смесь (1 мл) содержит 40 мМ Трис-НСI рН 8, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ DTT, 0,4 мМ HMG-СоА, 0,2 мМ NADH, 5 единиц 3-гидроксипутират дегидрогеназы и инкубируют в течение 5 мин, перед тем как добавить 0,005 мг/мл HMG-СоА лиазы и затем мониторили протекание реакции посредством понижения абсорбции при 340 нм.

Реакция, которую катализирует HMG СоА лиаза, описана в некоторых примерах и требует присутствие двувалентного катиона, такого как Mg²⁺ или Mg²⁺. Таким образом, преимущественно, что исследование по определению активности HMG СоА лиазы включает такие двувалентные катионы и, что способ в соответствии с изобретением получения 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты, если он использует HMG СоА лиазу, осуществляют в присутствии таких катионов.

HMG СоА лиаза является частью кетогенеза печени. Она катализирует терминальную реакцию в кетогенезе печени, которая является ключевой стадией этого пути. Реакция также является важной стадией в лейциновом катаболизме.

НМГ СоА лиаза описана для различных организмов. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие НМГ СоА лиазы, являются доступными с многочисленных источников. Как правило, последовательности только совместно используют промежуточную степень идентичности всей последовательности. Например, ферменты из *Bacillus subtilis* или *Brucella melitensis* демонстрируют только около 45% идентичности к той НМГ СоА лиазае, что у человека (Forouhar et al., J. Biol. Chem. 281 (2006), 7533-7545). Определяют трехмерную структуру различных ферментов НМГ СоА лиазы, и ключевые аминокислоты для ферментной реакции являются, в принципе, хорошо охарактеризованными (Forouhar et al., цит.место; Fu et al., J. Biol. Chem. 281 (2006), 7526-7532). В эукариотах НМГ СоА лиаза расположена в митохондральной матрице.

В принципе, какой-либо фермент НМГ СоА лиазы может быть использован в контексте представленного изобретения, в частности, из прокариотических или эукариотических организмов.

Описаны прокариотические НМГ СоА лиазы, например, из *Brucella abortus* (UniProt номера доступа Q2YPL0 и B2S7S2), *Bacillus subtilis* (UniProt номер доступа 034873), *Bacillus licheniformis* (Fu et al., цит.месте), *Pseudomonas syringae* (UniProt номера доступа Q4ZTL2 и Q4ZRW6), *Pseudomonas mevalonii* (UniProt номер доступа P13703), *Shewanella piezotolerans* (UniProt номер доступа B8CRY9), *Cellvibrio japonicus* (UniProt номер доступа B3PCQ7), *Azotobacter vinelandii* (UniProt номера доступа C1DJK8 и C1DL53), *Herminiimonas arsenicoxydans* (UniProt номер доступа A4G1F2) и *Burkholderia cenocepacia* (UniProt номер доступа A2VUW7).

Кроме того, в следующей Таблице В перечислены некоторые известные НМГ СоА лиазы из прокариотов:

25

Таблица В	
Swissprot/TrEmbl номер доступа	Организм
Q6MHG9	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
A2TNG9	<i>Dokdonia donghaensis</i>
Q0C392	<i>Hyphomonas neptunium</i>
B2HGF8	<i>Mycobacterium marinum</i>
Q0K3L2	<i>Ralstonia eutropha</i>
A9IB40	<i>Bordetella petrii</i>
Q0B1Z9	<i>Burkholderia ambifaria</i>
A5FHS2	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
Q5X487	<i>Legionella pneumophila</i>
A1VJH1	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>
Q5WKL8	<i>Bacillus clausii</i>
A9IFQ7	<i>Bordetella petrii</i>
A6H0L4	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>
Q8F7U7	<i>Leptospira interrogans</i>
A1VLB1	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>
A9IR28	<i>Bordetella petrii</i>
B1HZX7	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
A1VT25	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>
Q9KDS7	<i>Bacillus halodurans</i>
A9HXH6	<i>Bordetella petrii</i>
Q39QG8	<i>Geobacter metallireducens</i>
Q2GBZ7	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>
Q0KC96	<i>Ralstonia eutropha</i>
Q7CSK6	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Q65IT6	<i>Bacillus licheniformis</i>
Q7NX69	<i>Chromobacterium violaceum</i>

45

	B9LMV8	Halorubrum lacusprofundi
	A6F2L0	Marinobacter algicola
	Q8ERF9	Oceanobacillus iheyensis
	Q88HG4	Pseudomonas putida
5	Q0KF83	Ralstonia eutropha
	Q0VL35	Alcanivorax borkumensis
	B2JST8	Burkholderia phymatum
	A9AXJ6	Herpetosiphon aurantiacus
	B1ML74	Mycobacterium abscessus
	Q88H25	Pseudomonas putida
10	Q11V59	Cytophaga hutchinsonii
	Q0BWU6	Hyphomonas neptunium
	A1 BBP4	Paracoccus denitrificans
	Q3IGB2	Pseudoalteromonas haloplanktis

	Swissprot/TrEmbl номер доступа	Организм
15	Q21QR6	Rhodoferrax ferrireducens
	Q21RT0	Rhodoferrax ferrireducens
	A4CMM6	Robiginitalea biformata
	A7NGX6	Roseiflexus castenholzii
	A7NPP8	Roseiflexus castenholzii
	A7NPR9	Roseiflexus castenholzii
	Q163P7	Roseobacter denitrificans
20	A4X0W1	Salinispora tropica
	A9KVP4	Shewanella baltica
	Q12LZ6	Shewanella denitrificans
	A8FT92	Shewanella sediminis
	Q82CR7	Streptomyces avermitilis
	Q72IH0	Thermus thermophilus
25	A9WGE2	Chloroflexus aurantiacus
	B7H4C6	Acinetobacter baumannii

Описаны эукариотические HMG CoA лиазы, например, из растений, таких как редис (*Raphanus sativus*) и кукуруза обыкновенная (номер доступа B6U7B9, банк генов ACG45252) и животных, таких как человек (*Homo sapiens*; UniProt номер доступа P35914), макак-крабоед (UniProt номер доступа Q8XZ6), суматранский орангутанг (*Pongo abelii*; UniProt номер доступа Q5R9E1), крыса (*Rattus norvegicus*; UniProt номер доступа P97519; Fu et al., цит.месте), домовая мышь (UniProt номер доступа P38060), утка (*Anas spec*), крупный рогатый скот (*Bos taurus*; UniProt номер доступа Q29448), коза (*Capra hircus*), голубь (*Columba livia*), курица (*Gallus gallus*; UniProt номер доступа P35915), овца (*Ovis aries*), свинья (*Sus scrofa*), Данио-рерио (брахиданио-рерио (*Brachydanio rerio*); A8WG57, банк генов BC154587) и из простейших *Tetrahymena pyriformis*. Примеры HMG CoA лиаз из различных организмов представлены в SEQ ID NO: от 17 до 23. SEQ ID NO: 17 показывает последовательность HMG CoA лиазы кукурузы обыкновенной (номер доступа B6U7B9, банк генов ACG45252), SEQ ID NO: 18 показывает последовательность HMG CoA лиазы Данио-рерио (*Brachydanio rerio*; A8WG57, банк генов BC154587), SEQ ID NO: 19 показывает последовательность HMG CoA лиазы коровы (UniProt номер доступа Q29448) и SEQ ID NO: 20 показывает последовательность HMG CoA лиазы *Homo sapiens* (митохондриальная, UniProt номер доступа P35914, банк генов HUMHYMEGLA), SEQ ID NO: 21 показывает последовательность HMG CoA лиазы *Pseudomonas putida* (Q88H25), SEQ ID NO: 22 показывает последовательность HMG CoA лиазы *Acinetobacter baumannii* (B7H4C6) и SEQ ID NO: 23 показывает последовательность HMG CoA лиазы *Thermus thermophilus* (Q72IH0). В предпочтительном варианте осуществления представленного изобретения HMG CoA лиаза является ферментом,

содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: с 17 по 23 или последовательности, которая является, по меньшей мере, на п % идентичной к какой-либо из SEQ ID NO: с 17 по 23 и имеющей активность HMG CoA лиазы с п, которая является целым числом между 10 и 100, предпочтительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99.

Поскольку это касается определения степени идентичности последовательности, то используется такое же, как изложено выше применительно к HMG CoA синтазе.

HMG CoA лиаза, использованная в процессе в соответствии с изобретением, может быть встречающейся в природе HMG CoA лиазой, или она может быть HMG CoA лиазой, которая получена из встречающейся в природе HMG CoA лиазы, например, путем введения мутаций или других альтераций, которые, например, изменяют или улучшают ферментную активность, стабильность и T-D-

Термин "HMG CoA лиаза" или "протеин/фермент, имеющий активность HMG CoA лиазы" в контексте представленной заявки, кроме того, предусматривает ферменты, которые получают из HMG CoA лиазы, которые способны продуцировать 3-гидрокси-3-метилбутирил-CoA путем конденсации ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, как определено выше, предпочтительно ацетил-CoA, но который только имеет низкую аффинность к ацетоацетату, как субстрату, или не длинее, воспринимающей ацетоацетат, как субстрат. Такая модификация предпочтительного субстрата HMG CoA лиазы позволяет улучшить превращение ацетона в 3-гидрокси-3-метилбутирил-CoA и понизить продуцирование побочного продукта HMG-CoA. Способы модифицирования и/или улучшения желательных ферментных активностей протеинов хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники и описаны выше. Способность представленного фермента катализировать продуцирование 3-гидрокси-3-метилбутирил-CoA может быть определена в исследовании, как описано в примере 6.

Модифицированная версия HMG CoA лиазы, воспринимающая ацетон, как субстрат, но имеющая низкую аффинность к ацетоацетату, как субстрату, или не длинее воспринимающей ацетоацетат, как субстрат, может быть получена из встречающейся в природе HMG CoA лиазы или из уже модифицированной, оптимизированной или синтетически синтезированной HMG CoA лиазы.

В процессе в соответствии с изобретением, возможно, использовать только один фермент, как определено выше, например, только HMG CoA синтазу или только HMG CoA лиазу, или только PksG протеин. Однако, конечно, также возможно использовать более чем одну активность, то есть различные ферменты, в частности, какую-либо комбинацию HMG CoA синтазы и HMG CoA лиазы, и PksG протеина. Например, в случае способа *in vitro*, больше чем одна активность фермента может быть добавлена к реакционной смеси, или одновременно, или последовательно в каком либо возможном порядке. В способе *in vivo*, в котором используются организмы, в частности, микроорганизмы, является, например, возможным использовать организм, в частности, микроорганизм, экспрессирующий фермент, как определено выше. Однако, кроме того, предполагается использовать организм/микроорганизм, экспрессирующий какую-либо возможную комбинацию из вышеупомянутых ферментов. Более того, также является возможным использовать смесь из двух или более типов организмов/микроорганизмов с одним типом, экспрессирующим один фермент и другим, экспрессирующим другой фермент. Эти различные типы далее могут быть совместно культивированными.

Фермент, например, HMG CoA синтаза, и/или PksG протеин, и/или лиаза расщепления/конденсации C-C связи, такая как HMG CoA лиаза, использованная в процессе в

соответствии с представленным изобретением, может быть природным вариантом протеина или синтетическим протеином, а также протеином, который химически синтезирован или получен в биологической системе или рекомбинантными процессами. Фермент, например, HMG CoA синтаза и/или PksG протеин и/или лиаза расщепления/конденсации C-C связи, такая как HMG CoA лиаза, кроме того, могут быть химически модифицированными, например, с целью улучшения его/их стабильности, устойчивости, например, к температуре, для облегчения его/их очистки или его иммобилизации на подложку. Фермент/ферменты могут использовать в выделенной форме, очищенной форме, иммобилизированной форме, как сырой или частично очищенный экстракт, полученный из клеток, синтезирующих фермент/ферменты, как химически синтезированный(е) фермент(ы), как рекомбинантно полученный(е) фермент(ы), в форме микроорганизмов, продуцирующих их, т.д.

Процесс в соответствии с представленным изобретением может быть осуществлен *in vitro* или *in vivo*. Подразумевается, что реакцией *in vitro* является реакция, в которой клетки не используются, то есть бесклеточная реакция. Для проведения процесса *in vitro* субстраты для реакции и фермент/ферменты инкубируют при условиях (буфер, температура, кофакторы и т.д.), которые позволяют ферменту/ферментам быть активными и осуществить ферментное превращение. Реакция может продолжаться в течение времени достаточно для получения 3-гидрокси-3-метилбутирата.

Продуцирование 3-гидрокси-3-метилбутирата и/или 3-гидрокси-3-метилбутирил-CoA может быть обнаружено путем сравнения со стандартным соединением после разделения тонкослойной хроматографией, ЖХ/МС и колориметрическим анализом после его дериватизации.

Фермент/ферменты могут быть в какой-либо приемлемой форме, прозвояющей прохождение ферментной реакции. Он/они могут быть очищенными или частично очищенными, или в форме сырых клеточных экстрактов, или частично очищенных экстрактов. Кроме того, является возможным, что фермент/ферменты иммобилизуют на приемлемый носитель.

Так как субстрат ацетона, как правило, короче, чем природный субстрат, используемый ферментом, например, ацетоацетил-CoA/ацетоацетат, используемый HMG CoA синтазой и HMG CoA лиазой, соответственно, то может быть полезно добавлять в его реакционную смесь кофактор, который предусматривает стерическую и/или электронную комплементацию в каталитическом сайте фермента/ферментов. Одним примером такого кофактора, в случае HMG CoA синтазы, был бы кофермент А или структурно близко родственная молекула, такая как S-нитрозо-CoA.

Для проведения процесса *in vivo* используют приемлемый(е) организм/микроорганизм(ы), которые способны предоставлять субстраты, то есть ацетон и соединение, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, как определено выше, и фермент, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу. В предпочтительном варианте осуществления упомянутым ферментом является HMG CoA синтаза, и/или PksG протеин, и/или лиаза расщепления/конденсации C-C связи, такая как HMG CoA лиаза.

Таким образом, в случае этого варианта осуществления в соответствии с изобретением способ характеризуется тем, что превращение ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, осуществляют в присутствии организма, предпочтительно микроорганизма способного продуцировать ацетон и

экспрессировать фермент, который способен образовывать ковалентную связь между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, предпочтительно экспрессирующий фермент с активностью HMG CoA синтазы (EC 2.3.3.10), и/или экспрессирующий PksG протеин, и/или экспрессирующий фермент с активностью лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза (EC 4.1.3.4).

Термин "который способен продуцировать ацетон" в контексте представленного изобретения означает, что организм/микроорганизм имеет способность продуцировать ацетон в клетке благодаря присутствию ферментов, обеспечивающие ферментные активности, позволяющие продуцирование ацетона из метаболических предшественников.

Ацетон продуцируется определенными микроорганизмами, такими как *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium cellulolyticum*, *Bacillus polymyxa* и *Pseudomonas putida*. Синтез ацетона наилучше охарактеризован в *Clostridium acetobutylicum*. Он начинается с реакции (стадия 1 реакции), в которой две молекулы ацетил-CoA конденсируются в ацетоацетил-CoA. Эта реакция катализируется ацетил-CoA ацетилтрансферазой (EC 2.3.1.9). Ацетоацетил-CoA затем превращают в ацетоацетат реакцией с уксусной кислотой или масляной кислотой, приводящей в результате, кроме того, к продуцированию ацетил-CoA или бутирил-CoA (стадия 2 реакции). Эта реакция катализируется, например, ацетоацетилCoA трансферазой (EC 2.8.3.8). АцетоацетилCoA трансфераза известна из различных организмов, например, из *E. coli*, в котором она кодируется *atoAD* геном, или из *Clostridium acetobutylicum*, в котором она кодируется *ctfAB* геном. Однако, также другие ферменты могут катализировать эту реакцию, например, 3-оксокислота CoA трансферазы (EC 2.8.3.5) или сукцинат CoA лигазы (EC 6.2.1.5).

В конечном счете, ацетоацетат превращают в ацетон на стадии декарбоксилирования (стадия 3 реакции), которая катализируется ацетоацетат декарбоксилазой (EC 4.1.1.4).

Описанные выше стадии 1 и 2 реакции, и ферменты, катализирующие их, не охарактеризованы для синтеза ацетона и могут быть найдены в различных организмах. Напротив, стадия 3 реакции, которая катализируется ацетоацетат декарбоксилазой (EC 4.1.1.4), обнаружена только в тех организмах, которые способны продуцировать ацетон.

В одном предпочтительном варианте осуществления организм, использованный в способе в соответствии с изобретением, является организмом, предпочтительно микроорганизмом, который в природе имеет способность продуцировать ацетон. Таким образом, предпочтительно микроорганизм принадлежит к роду *Clostridium*, *Bacillus* или *Pseudomonas*, более предпочтительно к виду *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium cellulolyticum*, *Bacillus polymyxa* или *Pseudomonas putida*.

В следующем предпочтительном варианте осуществления организм, использованный в способе в соответствии с изобретением, является организмом, предпочтительно микроорганизмом, который в природе имеет способность продуцировать ацетон, и который является рекомбинантным в том смысле, что он, кроме того, является генетически модифицированным, таким образом, чтобы экспрессировать фермент, как описано выше. Термин "рекомбинантный" в одном варианте осуществления означает, что организм генетически модифицирован таким образом, чтобы содержать молекулу чужеродной нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, как определено выше. В предпочтительном варианте осуществления организм генетически модифицирован таким образом, чтобы содержать молекулу чужеродной нуклеиновой кислоты,

кодирующей фермент, как определено выше, например, HMG CoA синтаза, лиаза расщепления/конденсации С-С связи, такая как HMG CoA лиаза, или PksG протеин, или последовательность чужеродной нуклеиновой кислоты, кодирующая какую-либо возможную комбинацию таких протеинов. Термин "чужеродная" в этом контексте означает, что молекула нуклеиновой кислоты в природе не встречается в упомянутом организме/микроорганизме. Это означает, что она не встречается в такой же структуре или в том же местоположении в организме/микроорганизме. В одном предпочтительном варианте осуществления молекула чужеродной нуклеиновой кислоты является рекомбинантной молекулой, содержащей промотор и кодирующую последовательность, которая кодирует соответствующий фермент, например, HMG CoA синтазу и/или лиазу расщепления/конденсации С-С связи, такую как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеин, в котором промотор движущий экспрессией кодирующей последовательности является гетерологичным в отношении кодирующей последовательностью. Гетерологичный в этом контексте означает, что промотор не является по природе промотором, движущим экспрессию упомянутой кодирующей последовательности, но является по природе промотором, движущим экспрессию отличающейся кодирующей последовательности, то есть ее получают от другого гена, или является синтетическим промотором, или химерным промотором. Предпочтительно, промотором является промотор гетерологичный к организму/микроорганизму, то есть промотор, который не встречается в природе в соответствующем организме/микроорганизме. Еще более предпочтительно, промотором является индуцированный промотор. Промоторы для передачи экспрессии в разных типах организмов, в частности микроорганизмов, хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники.

В другом предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты является чужеродной к организму/микроорганизму, в котором кодированный(е) фермент (ы), например, HMG CoA синтаза и/или кодированная лиаза расщепления/конденсации С-С связи, такая как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеин, не является эндогенной к организму/микроорганизму, то есть не является экспрессированной в природе организмом/микроорганизмом, когда он не является генетически модифицированным. Другими словами, кодированная HMG CoA синтаза, и/или кодированная лиаза расщепления/конденсации С-С связи, такая как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеин является гетерологичным по отношению к организму/микроорганизму.

Термин "рекомбинантный" в другом варианте осуществления означает, что организм генетически модифицирован в регуляторной области, контролирующей экспрессию фермента, как определено выше, которая встречается в природе в организме, таким образом, что приводит к возрастанию экспрессии соответствующего фермента по сравнению с негенно модифицированным организмом. Значение термина высокой "повышенной экспрессии" описано также ниже.

Такая модификация регуляторной области может быть достигнута способами, известными квалифицированному специалисту с уровня техники. Одним примером является замена встречающегося в природе промотора на промотор, который обеспечивает повышенную экспрессию или модифицирует встречающийся в природе промотор таким образом, чтобы показать повышенную экспрессию. Таким образом, в этом варианте осуществления организм содержит в регуляторной области гена, кодирующего фермент, как определено выше, молекулу чужеродной нуклеиновой кислоты, которая в природе не встречается в организме и которая приводит к повышенной экспрессии фермента по сравнению с соответствующим негенетически модифицированным организмом.

Молекула чужеродной нуклеиновой кислоты может присутствовать в организме/микроорганизме в экстрахромосомальной форме, например, как плазмид, или стабильно интегрированная в хромосому. Стабильная интеграция является предпочтительной.

В следующем предпочтительном варианте осуществления организм/микроорганизм характеризуется как такой, в котором экспрессия/активность фермента, как определено выше, например, HMG CoA синтаза и/или лиаза расщепления/конденсации C-C связи, такая как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеин, повышена в организме/микроорганизме, генетически модифицированном молекулой чужеродной нуклеиновой кислоты, по сравнению с соответствующим негенетически модифицированным организмом/микроорганизмом. "Повышенная" экспрессия/активность означает, что экспрессия/активность фермента, в частности HMG CoA синтазы и/или лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиазы, и/или PksG протеина, в генетически модифицированном микроорганизме является, по меньшей мере, на 10%, предпочтительно, по меньшей мере, на 20%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 30% или 50%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 70% или 80% и особенно предпочтительно, по меньшей мере, на 90% или 100% выше, чем в соответствующем негенетически модифицированном организме/микроорганизме. В еще более предпочтительном варианте осуществления возрастание экспрессии/активности может быть, по меньшей мере, на 150%, по меньшей мере, на 200% или, по меньшей мере, на 500%. В особенно предпочтительном варианте осуществления экспрессия является, по меньшей мере, в 10 раз, более предпочтительно, по меньшей мере, в 100 раз и еще более предпочтительно, по меньшей мере, в 1000 раз выше, чем у соответствующего негенетически модифицированного организма/микроорганизма.

Термин "повышенная" экспрессия/активность также предусматривает ситуацию, в которой соответствующий негенетически модифицированный организм/микроорганизм не экспрессирует соответствующий фермент, например, HMG CoA синтазу и/или лиазу расщепления/конденсации C-C связи, такую как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеин, так, что соответствующая экспрессия/активность в негенетически модифицированном организме/микроорганизме равняется нулю.

Способы измерения уровня экспрессии предоставленного протеина в клетке хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники. В одном варианте осуществления измерение уровня экспрессии выполняют измерением количества соответствующего протеина. Соответствующие способы хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники и включают вестерн-блоттинг, ELISA и т.д. В другом варианте осуществления измерение уровня экспрессии выполняют измерением количества соответствующей РНК. Соответствующие способы хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники и включают, например, нозерн-блоттинг. Способы измерения ферментной активности вышеупомянутых ферментов, в частности, HMG CoA синтазы и/или лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиазы, и/или PksG протеина, соответственно, хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники и уже описаны выше.

В другом предпочтительном варианте осуществления, организм, использованный в способе в соответствии с изобретением, является генетически модифицированным организмом, предпочтительно микроорганизмом, полученным из организма/микроорганизма, который в природе не продуцирует ацетон, но который генетически модифицируют так, чтобы продуцировать ацетон, то есть путем введения гена(ов) необходимых для разрешения продуцирования ацетона в организме/микроорганизме. В принципе любой микроорганизм может быть генетически модифицированным таким

способом. Ферменты ответственные за синтез ацетона описаны выше. Гены, кодирующие соответствующие ферменты, хорошо известны с уровня техники и могут быть использованы для генетического модифицирования предоставленного микроорганизма, для того чтобы продуцировать ацетон. Как описано выше стадии 1 и 2 реакции синтеза ацетона происходят в природе в большинстве организмов. Однако, стадия 3 реакции является характерной и ключевой для синтеза ацетона. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления генетически модифицированный организм/микроорганизм, полученный из организма/микроорганизма, который в природе не продуцирует ацетон, является модифицированным, так, чтобы содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент, который катализирует превращение ацетоацетата в ацетон путем декарбоксилирования, например, ацетоацетат-декарбоксилаза (EC 4.1.1.4). Нуклеотидные последовательности из различных организмов, кодирующие этот фермент известны с уровня техники, например, *adc* ген из *Clostridium acetobutylicum* (Uniprot номера доступа P23670 и P23673), *Clostridium beijerinckii* (*Clostridium* MP; Q9RPK1), *Clostridium pasteurianum* (Uniprot номер доступа P81336), *Bradyrhizobium* sp.(штамм ВТАИ / ATCC ВАА-1182; Uniprot номер доступа A5EBU7), *Burkholderia mallei* (ATCC 10399 A9LBS0), *Burkholderia mallei* (Uniprot номер доступа A3MAE3), *Burkholderia mallei* FMH A5XJB2, *Burkholderia cenocepacia* (Uniprot номер доступа A0B471), *Burkholderia ambifaria* (Uniprot номер доступа Q0b5P1), *Burkholderia phytofirmans* (Uniprot номер доступа B2T319), *Burkholderia spec.* (Uniprot номер доступа Q38ZU0), *Clostridium botulinum* (Uniprot номер доступа B2TLN8), *Ralstonia pickettii* (Uniprot номер доступа B2UIG7), *Streptomyces nogalater* (Uniprot номер доступа Q9EYI7), *Streptomyces avermitilis* (Uniprot номер доступа Q82NF4), *Legionella pneumophila* (Uniprot номер доступа Q5ZXQ9), *Lactobacillus salivarius* (Uniprot номер доступа Q1WVG5), *Rhodococcus spec.* (Uniprot номер доступа Q0S7W4), *Lactobacillus plantarum* (Uniprot номер доступа Q890G0), *Rhizobium leguminosarum* (Uniprot номер доступа Q1M911), *Lactobacillus casei* (Uniprot номер доступа Q03B66), *Francisella tularensis* (Uniprot номер доступа Q0BLC9), *Saccharopolyspora erythraea* (Uniprot номер доступа A4FKR9), *Korarchaeum cryptofilum* (Uniprot номер доступа B1L3N6), *Bacillus amyloliquefaciens* (Uniprot номер доступа A7Z8K8), *Cochliobolus heterostrophus* (Uniprot номер доступа Q8NJK3), *Sulfolobus islandicus* (Uniprot номер доступа C3ML22) и *Francisella tularensis subsp.holarctica* (штамм OSU18).

Более предпочтительно организм, преимущественно микроорганизм, является генетически модифицированным для того, чтобы трансформировать молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 2 реакции синтеза ацетона, то есть превращение ацетоацетила CoA в ацетоацетат.

Еще более предпочтительно, организм, преимущественно микроорганизм, является генетически модифицированным для того, чтобы трансформировать молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 1 реакции синтеза ацетона, то есть конденсацию двух молекул ацетила CoA в ацетоацетил CoA. В особенно предпочтительном варианте осуществления организм/микроорганизм является генетически модифицированным для того, чтобы трансформировать молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 1 реакции синтеза ацетона и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 2 реакции синтеза ацетона или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 1 реакции

синтеза ацетона и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 3 реакции синтеза ацетона или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 2 реакции синтеза ацетона и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 3 реакции синтеза ацетона или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 1 реакции синтеза ацетона и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 2 реакции синтеза ацетона и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 3 реакции синтеза ацетона. Способы получения упомянутого выше генетически модифицированного организма, преимущественно микроорганизмы, хорошо известны с уровня техники. Таким образом, как правило, организм/микроорганизм трансформируют ДНК конструкцией, разрешающей экспрессию соответствующего гена в микроорганизме.

15 Таковую конструкцию обычно содержит кодирующая последовательность, о которой идет речь, связанная с регуляторными последовательностями, что позволяет транскрипцию и трансляцию в соответствующей клетке-хозяине, например, промотор и/ген-усилитель, и/или терминатор транскрипции, и/или рибосомосвязывающие сайты и т.д. Уровень техники еще описывает микроорганизмы, которые генетически

20 модифицированы для того, чтобы быть способными продуцировать ацетон. В частности, гены от, например, *Clostridium acetobutylicum*, вводили в *E. coli*, таким образом, позволяя синтез ацетона в *E. coli*, бактерии, которая в природе не продуцирует ацетон (Bermejo et al., Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998); 1079-1085; Hanai et al., Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007), 7814-7818). В частности Hanai и др. (цит.месте) показывает, что достаточным

25 является введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ацетоацетат декарбоксилазу (такую как та, что из *Clostridium acetobutylicum*) для того, чтобы достичь продуцирование ацетона в *E. coli*, свидетельствующее, что эндогенные ферменты в *E. coli*, которые катализируют вышеупомянутые стадии 1 и 2 реакции (то есть продукты экспрессии *E. coli* *atoB* и *atoAD* генов), являются достаточными для того, чтобы

30 обеспечить субстрат для продуцирования ацетона.

В особенно предпочтительном варианте осуществления организм, преимущественно микроорганизм, использованный в способе в соответствии с изобретением, является рекомбинантным организмом/микроорганизмом, полученным из организма/микроорганизма, который в природе не продуцирует ацетон, но который генетически

35 модифицирован, как описано выше, для того, чтобы продуцировать ацетон, и который экспрессирует фермент, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения, которое обеспечивает

40 активированную ацетильную группу, как описано выше. Термин "рекомбинантный" в этом контексте преимущественно означает, что организм является рекомбинантным в смысле, что дальше его генетически модифицировали для того, чтобы экспрессировать фермент, как определено выше. Термин "рекомбинантный" в одном варианте

45 осуществления означает, что организм генетически модифицирован для того, чтобы содержать молекулу чужеродной нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент, как определено выше, например, HMG CoA синтаза или лиаза расщепления/конденсации C-C связи, такая как HMG CoA лиаза, или PksG протеин, или молекула чужеродной нуклеиновой кислоты, кодирующая какую-либо возможную комбинацию определенных выше ферментов.

Что касается определения термина "молекула чужеродной нуклеиновой кислоты", то применяют то же самое, что уже изложено выше.

Термин "рекомбинантный" в другом варианте осуществления означает, что организм является генетически модифицированным в регуляторной области, контролирующей экспрессию фермента, как определено выше, который в природе встречается в организме, так, чтобы привести к возрастанию экспрессии соответствующего фермента по сравнению с соответствующим негенетически модифицированным организмом. Значение термина высокая "повышенная экспрессия" описано также ниже.

Такая модификация регуляторной области может быть достигнута способами известными квалифицированному специалисту с уровня техники. Одним примером является замена промотора, который встречается в природе, на промотор, который позволит повышенную экспрессию, или модифицирование встречающегося в природе промотора так, чтобы продемонстрировать повышенную экспрессию. Таким образом, в этом варианте осуществления организм содержит в регуляторной области гена, кодирующий фермент, как определено выше, молекулу чужеродной нуклеиновой кислоты, которая в природе не встречается в организме, и которая приводит к повышенной экспрессии фермента по сравнению с соответствующим негенетически модифицированным организмом.

Предпочтительно, такой организм/микроорганизм характеризуется тем, что экспрессия/активность упомянутого фермента, например, HMG CoA синтазы и/или лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеина, выше в рекомбинантном организме/микроорганизме по сравнению с соответствующим негенетически модифицированным организмом/микроорганизмом. "Повышенная" экспрессия/активность означает, что экспрессия/активность фермента, например, HMG CoA синтазы и/или лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеина, в генетически модифицированном организме/микроорганизме является, по меньшей мере, на 10%, предпочтительно, по меньшей мере, на 20%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 30% или 50%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 70% или 80% и особенно предпочтительно, по меньшей мере, на 90% или 100% выше, чем в соответствующем негенетически модифицированном организме/микроорганизме. В еще более предпочтительном варианте осуществления возрастание экспрессии/активности может быть, по меньшей мере, на 150%, по меньшей мере, на 200% или, по меньшей мере, на 500%. В особенно предпочтительном варианте осуществления экспрессия является, по меньшей мере, в 10 раз, более предпочтительно, по меньшей мере, в 100 раз и еще более предпочтительно, по меньшей мере, в 1000 раз выше, чем в соответствующем негенетически модифицированном организме/микроорганизме.

Термин "повышенная" экспрессия/активность также предусматривает ситуацию, в которой соответствующий негенетически модифицированный организм/микроорганизм не экспрессирует упомянутый фермент, например, HMG CoA синтазу и/или лиазу расщепления/конденсации C-C связи, такую как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеин, так, что соответствующая экспрессия/активность в негенетически модифицированном организме/микроорганизме равняется нулю.

Что касается способов измерения уровня экспрессии или активности, то применяют те же самые, которые уже изложены выше.

Термин "организм", как использовано в контексте представленного изобретения, относится, как правило, к какому-либо возможному типу организма, в частности, эукариотическим организмам, прокариотическим организмам и архибактериям. Термин

включает животные, растения, грибы, бактерии и архибактерии. Термин, кроме того, включает изолированные клетки или клетки-агрегаты таких организмов, подобные тканям или мозолям. В одном предпочтительном варианте осуществления организм является микроорганизмом. Термин "микроорганизм" в контексте представленного изобретения относится к прокариотическим клеткам, в частности, бактериям, а также грибам, таким как дрожжевидные грибы, и также водорослям и архибактериям. В одном предпочтительном варианте осуществления микроорганизм является бактерией. В принципе может быть использована какая-либо бактерия. Предпочтительной бактерией, которая используется в процессе в соответствии с изобретением, является бактерия рода *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* или *Escherichia*. В особенно предпочтительном варианте осуществления бактерия принадлежит к роду *Escherichia* и еще более предпочтительном к виду *Escherichia coli*.

В другом предпочтительном варианте осуществления микроорганизмом является гриб, более предпочтительно гриб рода *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus* или *Trichoderma* и еще более предпочтительно вида *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus niger* вида *Trichoderma reesei*.

В еще другом предпочтительном варианте осуществления микроорганизмом является фотосинтетически активный микроорганизм, такой как бактерии, которые способны выполнять фотосинтез, или микроводоросли.

В особенно предпочтительном варианте осуществления микроорганизмом является водоросль, более предпочтительно водоросли, принадлежащие к *diatomeae*.

Если микроорганизм используется в контексте способа представленного изобретения, то, кроме того, является возможным осуществить способ в соответствии с изобретением, до известной степени, в котором используют две разновидности микроорганизмов, то есть одна разновидность, которая продуцирует ацетон, и одна разновидность, которая использует ацетон, продуцированный первой разновидностью микроорганизмов, чтобы превратить его с помощью фермента как определено выше в данном документе.

Когда процесс в соответствии с изобретением осуществляют *in vivo* путем использования микроорганизмов, которые обеспечивают соответствующую ферментную активность/активности, микроорганизмы культивируют в приемлемых для культуры условиях, позволяющих осуществление ферментной(ых) реакции(й). Специфические для культуры условия зависят от особенности использованного микроорганизма, но хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники. Условия для культуры, как правило, выбирают таким способом, что они разрешают экспрессию генов, кодирующих ферменты для соответствующих реакций. Различные способы известны квалифицированному специалисту с уровня техники для того, чтобы улучшить и точно подобрать экспрессию определенных генов на определенных стадиях культуры, такие как введение экспрессии гена с помощью химического индуктора или путем сдвига температуры.

В другом предпочтительном варианте осуществления организм, использованный в способе в соответствии с изобретением, является организмом, который способен к фотосинтезу, таким как растение или микроводоросли. В принципе, может быть использовано какое-либо возможное растение, то есть однодольное растение или двудольное растение. Предпочтительным является использование растения, которое может быть выращено в сельскохозяйственно-значимых масштабах, и которое позволит продуцировать большие количества биомассы. Примерами являются травы, такие как плевел, зерновые культуры, такие как рожь, ячмень, овес, просо, кукуруза, другие крахмал запасующие растения, такие как картофель, или сахар запасующие растения,

такие как сахарный тростник или сахарная свекла. Возможным является также использование табака или овощных растений, таких как помидор, перец, огурец, баклажан и т.д. Другой возможностью является использование масла запасующих растений, таких как рапсовое семя, маслина и т.д. Кроме того, является возможным использование деревьев, в частности, быстро растущих деревьев, таких как эвкалипт, тополь или каучуковое дерево (*Hevea brasiliensis*).

Представленное изобретение также относится к организму, предпочтительно микроорганизму, который характеризуется следующими особенностями:

- (a) он способен продуцировать ацетон; и
- (b) он экспрессирует фермент, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, как определено выше, предпочтительно, фермент с активностью HMG CoA синтазы (EC 2.3.3.10), и/или фермент с активностью лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза (EC 4.1.3.4), и/или PksG протеин.

Что касается источника, природы, свойств, последовательности и т.д. фермента, в частности, HMG CoA синтазы, лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеина, экспрессированного в организме в соответствии с изобретением, применяют те же самые, которые уже изложены выше в связи со способом в соответствии с изобретением.

В одном предпочтительном варианте осуществления организм в соответствии с изобретением является организмом, предпочтительно микроорганизмом, который в природе имеет способность продуцировать ацетон, то есть, характерная черта (a) упомянутая выше является характерной чертой, которую организм, преимущественно микроорганизм, демонстрирует в природе. Таким образом, предпочтительно организм является микроорганизмом, который принадлежит роду *Clostridium*, *Bacillus* или *Pseudomonas*, более предпочтительно к виду *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium cellulolyticum*, *Bacillus polymyxa* или *Pseudomonas putida*.

В другом предпочтительном варианте осуществления, организм, преимущественно микроорганизм, в соответствии с изобретением является генетически модифицированным организмом/микроорганизмом, полученным из организма/микроорганизма, который в природе не продуцирует ацетон, но который генетически модифицированным таким образом, чтобы продуцировать ацетон, то есть путем введения гена(ов) необходимых для разрешения продуцирования ацетона в организм/микроорганизме. В принципе какой-либо организм/микроорганизм может быть генетически модифицированным таким способом. Ферменты ответственные за синтез ацетона описаны выше. Гены, кодирующие соответствующие ферменты, известны с уровня техники и могут быть использованы для генетического модифицирования предоставленного организма, предпочтительно микроорганизма, таким образом, чтобы продуцировать ацетон.

В предпочтительном варианте осуществления, генетически модифицированный организм/микроорганизм, полученный из организма/микроорганизма, который в природе не продуцирует ацетон, модифицируют, таким образом, чтобы содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент, который катализирует превращение ацетоацетата в ацетон путем декарбоксации, например, ацетоацетат декарбоксилазой (EC 4.1.1.4). Нуклеотидные последовательности из различных организмов, кодирующие этот фермент, известны с уровня техники, например, *adc* ген из *Clostridium acetobutylicum*.

Более предпочтительно, организм/микроорганизм является генетически модифицированным таким образом, чтобы быть трансформированным молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 2 реакции синтеза ацетона, то есть превращение ацетоацетила CoA в ацетоацетат.

Еще более предпочтительно, организм/микроорганизм является генетически модифицированным таким образом, чтобы быть трансформированным молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 1 реакции синтеза ацетона, то есть конденсацию двух молекул ацетил-CoA в ацетоацетил CoA.

В особенно предпочтительном варианте осуществления организм/микроорганизм является генетически модифицированным таким образом, чтобы быть трансформированным молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 1 реакции синтеза ацетона, и молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 2 реакции синтеза ацетона, или молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 1 реакции синтеза ацетона, и молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 3 реакции синтеза ацетона, или молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 2 реакции синтеза ацетона, и молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 3 реакции синтеза ацетона, или молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 1 реакции синтеза ацетона, и молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 2 реакции синтеза ацетона, и молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, способный катализировать упомянутую выше стадию 3 реакции синтеза ацетона. Способы получения упомянутых выше генетически модифицированных организмов/микроорганизмов хорошо известны с уровня техники. Таким образом, как правило, организм/микроорганизм трансформируют ДНК конструкциями, разрешающими экспрессию соответствующего фермента в организм/микроорганизм. Такая конструкция обычно содержит кодирующую последовательность, до известной степени, связанную с регуляторными последовательностями, позволяющими транскрипцию и трансляцию в соответствующей клетке-хозяине, например, промотор и/или терминатор транскрипции, и/или рибосомосвязывающие сайты и т.д. В уровне техники уже описаны организмы, в частности, микроорганизмы, которые были генетически модифицированными, таким образом, чтобы быть способными продуцировать ацетон. В частности, гены из, например, *Clostridium acetobutylicum* вводили в *E. coli*, таким образом, разрешая синтез ацетона в *E. coli*, бактерии, которая в природе не продуцирует ацетон (Bermejo et al., Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998); 1079-1085; Hanai et al., Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007), 7814-7818). В частности Hanai и др. (цит.месте) показывает, что достаточным является введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ацетоацетат декарбоксилазу (такую как та, что из *Clostridium acetobutylicum*) для того, чтобы достичь продуцирование ацетона в *E. coli*, свидетельствующее, что эндогенные ферменты в *E. coli*, которые катализируют вышеупомянутые стадии 1 и 2 реакции (то есть продукты экспрессии *E. coli* *atoB* и *atoAD* генов), являются достаточными для того, чтобы обеспечить субстрат для продуцирования ацетона.

В следующем предпочтительном варианте осуществления организм, предпочтительно микроорганизм, в соответствии с изобретением является генетически модифицированным таким образом, чтобы экспрессировать фермент, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O)

5 ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу. В этом контексте, термин "рекомбинантный" означает в первом аспекте, что организм содержит молекулу чужеродной нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы
10 (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, предпочтительно молекулу чужеродной нуклеиновой кислоты, кодирующей HMG CoA синтазу, или молекулу чужеродной нуклеиновой кислоты, кодирующую лиазу расщепления/конденсации C-C связи, такую как HMG CoA лиаза, или молекулу чужеродной нуклеиновой кислоты, кодирующую PksG протеин, или молекулу чужеродной нуклеиновой кислоты, кодирующую какую-либо возможную комбинацию ферментов, которые имеют вышеупомянутое свойство. Термин "чужеродный" в этом контексте означает, что молекула нуклеиновой кислоты в природе не встречается в
20 упомянутом организме/микроорганизме. Это означает, что она не встречается в такой же структуре или в том же местоположении в организме/микроорганизме. В одном предпочтительном варианте осуществления, молекула чужеродной нуклеиновой кислоты является рекомбинантной молекулой, содержащей промотор и кодирующую последовательность, которая кодирует упомянутый фермент, например, HMG CoA синтазу и/или лиазу расщепления/конденсации C-C связи, такую как HMG CoA лиаза,
25 и/или PksG протеин, в котором промотор движущий экспрессией кодирующей последовательности является гетерологичным по отношению к кодирующей последовательности. Гетерологичный в этом контексте означает, что промотор не является по природе промотором, движущим экспрессией упомянутой кодирующей последовательности, но является по природе промотором, движущим экспрессией
30 отличающейся кодирующей последовательности, то есть, полученной с другого гена, или является синтетическим промотором, или химерным промотором. Предпочтительно, промотором является промотор гетерологичный к организму/микроорганизму, то есть промотором, который в природе не встречается в соответствующем организме/
35 микроорганизме. Еще более предпочтительно, промотором является индуцируемый промотор. Промоторы, движущие экспрессией в различных типах организмов, в частности микроорганизмах, хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники.

В другом предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты является чужеродной к организму/микроорганизму, в котором кодированный фермент (ы), например, HMG CoA синтаза, и/или кодированная лиаза расщепления/конденсации C-C связи, такая как HMG CoA лиаза, и/или кодированный PksG протеин, не является/
40 являются эндогенными к организму/микроорганизму, то есть в природе не являются экспрессированными организмом/микроорганизмом, когда она является негенетически модифицированной. Другими словами, кодированный фермент(ы), например, HMG CoA синтаза и/или кодированная лиаза расщепления/конденсации C-C связи, такая как HMG CoA лиаза, и/или кодированный PksG протеин, является/являются гетерологичным
45 (и) по отношению к организму/микроорганизму.

Термин "рекомбинантный" в другом аспекте означает, что организм является

генетически модифицированным в регуляторной области, контролирующей экспрессию фермента, как определено выше, который встречается в природе в организме, для того чтобы привести к росту экспрессии соответствующего фермента по сравнению с соответствующим негенетически модифицированным организмом. Значение термина высокая "повышенная экспрессия" описано также ниже.

Такая модификация регуляторной области может быть достигнута способами, известными квалифицированному специалисту с уровня техники. Одним примером является замена встречающегося в природе промотора на промотор, который предусматривает повышенную экспрессию, или модифицирование встречающегося в природе промотора, таким образом, чтобы продемонстрировать повышенную экспрессию. Таким образом, в этом варианте осуществления организм в регуляторной области содержит ген, кодирующий фермент, как определено выше, молекулу чужеродной нуклеиновой кислоты, которая в природе не встречается в организме, и которая приводит к повышенной экспрессии фермента по сравнению с соответствующим негенетически модифицированным организмом.

В следующем предпочтительном варианте осуществления организм/микроорганизм характеризуют тем, что экспрессия/активность упомянутого фермента, например, HMG CoA синтазы и/или лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеина, выше в организме/микроорганизме, генетически модифицированном молекулой чужеродной нуклеиновой кислоты, по сравнению с соответствующим негенетически модифицированным организмом/микроорганизмом.

"Повышенная" экспрессия/активность означает, что экспрессия/активность фермента, например, HMG CoA синтазы и/или лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеина, в генетически модифицированном организме/микроорганизме является, по меньшей мере, на 10%, предпочтительно, по меньшей мере, на 20%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 30% или 50%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 70% или 80% и особенно предпочтительно, по меньшей мере, на 90% или 100% выше, чем в соответствующем негенетически модифицированном

организме/микроорганизме. В еще более предпочтительном варианте осуществления возрастание экспрессии/активности может быть, по меньшей мере, на 150%, по меньшей мере, на 200% или, по меньшей мере, на 500%. В особенно предпочтительном варианте осуществления экспрессия является, по меньшей мере, в 10 раз, более предпочтительно, по меньшей мере, в 100 раз и еще более предпочтительно, по меньшей мере, в 1000 раз выше, чем в соответствующем негенетически модифицированном организме/микроорганизме.

Термин "повышенная" экспрессия/активность, кроме того, предусматривает ситуацию, в которой соответствующий негенетически модифицированный организм/микроорганизм не экспрессирует соответствующий фермент, например, HMG CoA синтазу и/или лиазу расщепления/конденсации C-C связи, такую как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеин так, что соответствующая экспрессия/активность в негенетически модифицированном организме/микроорганизме равняется нулю.

Способы измерения уровня экспрессии предоставленного протеина в клетке хорошо известно квалифицированному специалисту с уровня техники. В одном варианте осуществления измерение уровня экспрессии выполняют путем измерения количества соответствующего протеина. Соответствующие способы хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники и включают вестерн-блоттинг, ELISA и т.д. В другом варианте осуществления измерение уровня экспрессии выполняют

путем измерения количества соответствующей РНК. Соответствующие способы хорошо известны квалифицированному специалисту с уровня техники и включают, например, нозерн-блоттинг.

5 Способы измерения ферментной активности вышеупомянутого фермента, в частности, НМГ СоА синтазы, и/или НМГ СоА лиазы, и/или PksG протеина, соответственно, известны с уровня техники и уже описаны выше.

10 Термин "организм", как использовано в контексте представленного изобретения, относится, как правило, к каким-либо возможным разновидностям организма, в частности, эукариотическим организмам, прокариотическим организмам и архибактериям. Термин включает животных, растения, грибы, бактерии и архибактерии. Термин, кроме того, включает изолированные клетки или клетки-агрегаты, таких организмов, подобные тканям или мозолям.

15 В одном предпочтительном варианте осуществления организм является микроорганизмом. Термин "микроорганизм" в контексте представленного изобретения относится к прокариотическим клеткам, в частности, бактериям, а также грибам, таким как дрожжевидные грибы, и также водорослям и архибактериям. В одном предпочтительном варианте осуществления, микроорганизм является бактерией. В принципе может быть использована любая бактерия. Предпочтительными бактериями, что используют в процессе в соответствии с изобретением, являются бактерии рода 20 *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* или *Escherichia*. В особенно предпочтительном варианте осуществления бактерия принадлежит к роду *Escherichia* и еще более предпочтительно к виду *Escherichia coli*.

25 В другом предпочтительном варианте осуществления микроорганизмом является гриб, более предпочтительно гриб рода *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus* или *Trichoderma*, и еще более предпочтительно вида *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus niger* или вида *Trichoderma reesei*.

30 В еще другом предпочтительном варианте осуществления микроорганизмом является фотосинтетически активный микроорганизм, такой как бактерии, которые способны осуществлять фотосинтез, или микроводоросли. В особенно предпочтительном варианте осуществления микроорганизмом является водоросли, более предпочтительно водоросли рода, который принадлежит к *diatomeae*.

35 В другом предпочтительном варианте осуществления организмом в соответствии с изобретением является организм, который способен к фотосинтезу, такой как растение или микроводоросль. В принципе, он может быть каким-либо возможным растением, то есть однодольным растением или двудольным растением. Предпочтительным является использование растения, которое может быть выращено в сельскохозяйственно-значимых масштабах, и которое позволит продуцировать большие количества биомассы. Примерами являются травы, такие как плевел, зерновые культуры, такие как рожь, 40 ячмень, овес, просо, кукуруза, другие крахмал запасующие растения, такие как картофель, или сахар запасующие растения, такие как сахарный тростник или сахарная свекла. Возможным является также использование табака или овощных растений, таких как помидор, перец, огурец, баклажан и т.д. В другом предпочтительном варианте осуществления растение является масло запасующим растением, таким как рапсовое семя, маслина и т.д. Кроме того, является возможным использование деревьев, в частности, быстро растущих деревьев, таких как эвкалипт, тополь или каучуковое 45 дерево (*Hevea brasiliensis*).

Представленное изобретение также относится к использованию организма, предпочтительно микроорганизма, который характеризуется следующими признаками:

(a) он способен продуцировать ацетон; и

(b) он экспрессирует фермент, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, как определено выше в данном документе, предпочтительно фермент с активностью HMG CoA синтазы (ЕС 2.3.3.10), и/или фермент с активностью лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза (ЕС 4.1.3.4), и/или PksG протеин

для продуцирования 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты. То есть, представленное изобретение также относится к использованию организма/микроорганизма в соответствии с изобретением для продуцирования 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты.

Представленное изобретение также относится к композиции, содержащей организм в соответствии с представленным изобретением.

Более того, представленное изобретение также относится к композиции, содержащей (i) ацетон; и (ii) соединение, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, как определено выше в данном документе; и (iii) фермент, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, как определено выше в данном документе.

Для предпочтительного варианта осуществлений фермента применяют то же самое, что уже изложено выше в связи со способом и организмом в соответствии с изобретением.

Более того, представленное изобретение также относится к использованию фермента, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, как определено выше в данном документе, для продуцирования 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты. Для предпочтительного варианта осуществлений фермента применяют то же самое, что уже изложено выше в связи со способом и организмом в соответствии с изобретением.

В заключение, представленное изобретение также относится к использованию ацетона для получения 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты, которое включает ферментное превращение ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, как определено выше в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления ферментное превращение достигается с помощью фермента, как описано выше в связи со способом в соответствии с изобретением, более предпочтительно с ферментом, имеющим ферментную активность HMG CoA синтазы, и/или с ферментом, имеющим ферментную активность лиазы расщепления/конденсации C-C связи, такой как HMG CoA лиаза, и/или PksG протеином, и наиболее предпочтительно превращение достигают путем использования организма в соответствии с изобретением.

Фигура 1: Химическая структура 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты (также упоминаемая как бета-гидроксиизовалерат)

Фигура 2: Реакционная схема реакции, катализируемой HMG-CoA синтазой

Фигура 3: Реакционная схема реакции, катализируемой HMG-CoA лиазой

Фигура 4: Реакционные схемы реакций pksX пути, включая реакции, катализируемые

PksG протеином

Фигура 5: Реакционная схема реакции превращения ацетона и соединения, содержащего активированную ацетильную группу, в 3-гидрокси-3-метилмасляную кислоту

5 X означает S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(OH)-C(CH₃)₂-CH₂-O-PO₂H-C₁₀H₁₃N₅O₇P (кофермент А), S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-ГМН-CO-CH(OH)-C(CH₃)₂-CH₂-O-PO₂H-полипептид (протеин ацил-носитель), S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(OH)-C(CH₃)₂-CH₂-OH (пантетеин), S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₃ (N-ацетил-цистамин), S-CH₃ (метантиол), S-CH₂-CH(NH₂)-C(=O)H (цистеин), S-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-C(=O)H (гомоцистеин), S-CH₂-CH(NH-C₅H₈N₃)-CO-NH-CH₂-C(=O)H (глутатион), S-CH₂-CH₂-SO₃H (кофермент М) и OH (уксусная кислота).

Фигура 6: Масс-спектр коммерчески доступного 3-гидрокси-3-метилбутирата.

Фигура 7: Масс-спектр образования 3-гидрокси-3-метилбутирата из ацетил-СоА и ацетона в присутствии Hmg-СоА синтазы из *Gallus gallus* (P23228).

Фигура 8: Масс-спектр контрольного исследования без фермента.

Фигура 9: Диаграмма Михаэлиса - Ментена реакции с HMG СоА синтазой *S. Epidermidis*, которая описана в примере 7

Следующие примеры служат для иллюстрации изобретения.

Пример 1

Биоинформационный способ, использованный для создания базы данных HMG-СоА синтаз и HMG-СоА лиаз

Панель из 12 HMG-СоА синтаз и 8 HMG-СоА лиаз были отобраны для создания основного блока набора протеинов, стремясь представить разнообразие этих классов ферментов, как найдено в параллели эукариотических организмов. Эти протеины были идентифицированы путем выполнения многократных поисков основанных на последовательности и текстовых поисков в Универсальной базе данных протеиновых ресурсов Uniprot (Universal Protein Resource Database Uniprot) (<http://www.uniprot.org/>). Они все содержат уникальные признаки, такие как консервативные области белка и фрагмент характерный для интересующего класса ферментов. С целью эффективного покрытия разнообразия последовательностей, без надлежащего отбора большой серии протеинов, начальный пул ферментов был сужен путем группирования их в кластеры последовательностей с большей чем 85% гомологичностью и далее отбирая одного единственного кандидата последовательности представителя каждого кластера.

Идентичность последовательности белка находится в пределах от 30% до 80% и от 50% до 80% между какими-либо двумя протеинами из панели HMG-СоА синтаз и панели лиаз, соответственно. Такой же подход применяли к отбору HMG-СоА синтаз и HMG-СоА лиаз из прокариотических организмов. Созданные серии, содержавшие 50 гомологов протеинов HMG-СоА синтаз, включая pksG протеины, и 59 гомологов протеинов HMG-СоА лиаз.

Пример 2

Клонирование, экспрессия и очистка совокупности HMG-СоА лиаз и HMG-СоА синтаз
Клонирование гена:

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие HMG-СоА синтазу и лиазу из эукариотического организма, оптимизировали преимущественно для кодона *E.coli*, и гены были получены посредством химического синтеза (GeneArt).

Гены, кодирующие HMG-СоА синтазы и лиазы из прокариотических организмов, клонировали из геномной ДНК из различных исходных материалов с помощью

рутинных рекомбинантных методик. Дальше эти гены вводили в гистиридиновый тэг (His-tag), содержащий рЕТ 25b и рЕТ 22b вектора (Novagen), соответственно, для эукариотических и прокариотических организмов. Надэкспрессия в *E. coli*:

Плазмиды электропорировали в *E. coli* BL21 бактерии (Novagen), далее это распространяли на ампициллин, содержащий LB-агар на чашках Петри. Культуры выращивали при 30°C в ТВ среде, содержащей 0,5 М сорбита, 5 мМ бетаина, 100 мкг/мл ампициллина при умеренном встряхивании. Когда OD (600 нм) достигло 0,8, добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ, и экспрессия проходила в течение 16 часов при 20°C при умеренном встряхивании. Дальше клетки бактерий собирали центрифугированием при 4°C, 10000 об./мин., 20 минут и замораживали при - 80°C.

Приготовление экстракта клеток:

Экстракты клеток готовят ресуспендированием 1,6 г пеллетов клеток в 5 мл 50 мМ Na₂HPO₄ буфера, содержащего 300 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT pH 8. Затем добавляют 20 мкл Lysonase (Novagen) к препаратам, которые инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре и 20 минут на льду. Клеточный лизис доводят до конца тройной обработкой ультразвуком по 5 минут в ультразвуковой водяной бане на льду и гомогенизацией экстракта между каждым импульсом. Сырые экстракты затем осветляют центрифугированием при 4°C, 10.000 об./мин., 20 минут.

Очистка протеина:

Прозрачные супернатанты загружают в PROTINO-1000 Ni-IDA колонку (Macherey-Nagel) которая дает возможность специфической иммобилизации протеинов, несущих 6-гистиридиновые хвосты. Колонки промывают, и ферменты элюируют 4 мл 50 мМ Na₂HPO₄ буфера, содержащего 300 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ г, 1 мМ DTT, 250 мМ имидазола pH 8. Фермент, содержащий фракции затем концентрируют и обессоливают на Amicon Ultra-4 10 кДа фильтрующем блоке (Millipore) и ресуспендируют в 250 мкл 40 мМ Трис-НСI pH8, содержащем 0,5 мМ DTT. Концентрацию протеина определяют способом Брэдфорда. Гомогенность очищенных ферментов варьировала от 20% до 75%.

Пример 3

Измерение активности HMG-CoA синтазы, используя природные субстраты ацетоацетил-CoA и ацетил-CoA

Активность HMG-CoA синтазы измеряли в соответствии с Clinkenbeard et al. (J. Biol.Chem. 250 (1975), 3108-3116). Стандартная смесь среды исследования для HMG-CoA синтаз содержит 40 мМ Трис-НСI pH 8, 1 мМ MgCl₂, 100 мкМ ацетоацетил-CoA, 200 мкМ ацетил-CoA, 0,5 мМ DTT в общем объеме 1 мл. Митохондриальные HMG-CoA синтазы исследуют при отсутствии MgCl₂ во избежание ингибирования, наблюдаемого для этого фермента (Reed et al., J. Biol.Chem. 250 (1975), 3117-3123). Реакцию инициализируют добавлением 0,02 мг/мл фермента.

Контрольное исследование проводят при отсутствии фермента. Активность HMG-CoA синтазы измеряют путем мониторинга понижения абсорбции на 303 нм, что сопровождается исчезновением ацетил-CoA-зависимой енолятной формы ацетоацетил-CoA. Для объяснения неспецифического исчезновения ацетоацетил-CoA, результаты, полученные в контрольном исследовании в отсутствие фермента, были вычтены из результатов, полученных при исследовании образцов. Видимый коэффициент поглощения для ацетоацетил-CoA при условиях исследования составлял 5600 М⁻¹.

Таблица 1

Физиологическая активность некоторых очищенных HMG-CoA синтаз или ферментов гомологичных HMG CoA синтазам

Uniprot номер доступа	Организм	Физиологическая активность мкмоль/мин·мг протеина
P54961	<i>Blattella germanica</i> (таракан рыжий)	0,02
P23228	<i>Gallus gallus</i> (курица)	0,02
Q01581	<i>Homo sapiens</i> (человек)	0,03

5

Uniprot номер доступа	Организм	Физиологическая активность мкмоль/мин·мг протеина
P54873	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,19
P54871	<i>Caenorhabditis elegans</i>	0,23
P54874	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (делящиеся дрожжи)	0,61
P54839	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (пекарские дрожжи)	0,28
P54872	<i>Dictyostelium discoideum</i> (слизевой гриб)	0,09
Q86HL5	<i>Dictyostelium discoideum</i> (слизевой гриб)	0,02
Q9M6U3	<i>Brassica juncea</i>	0,02
A5FM54	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,02
Q03WZO	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,28
Q2NHU7	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	0,02
Q8CN06	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,07
Q03QR0	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,18
A6UPL1	<i>Methanosarcina mazei</i>	0,01
B2HGT6	<i>Mycobacterium marinum</i>	0,01
Q4L958	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0,18
Q4A0D6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0,08
Q1GAH5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0,32

10

15

20

Пример 4

Измерение активности HMG-CoA лиазы, используя природный субстрат HMG-CoA

25

Активность HMG-CoA лиазы измеряют в соответствии с Mellanby J et al. (Methods of Enzymatic Analysis; Bergmeyer Ed. (1963), 454-458). Полную реакционную смесь (1 мл), содержащую 40 мМ Трис-HCl pH 8, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ DTT, 0,4 мМ HMG-CoA, 0,2 мМ NADH, 5 единиц 3-гидроксибутират-дегидрогеназы, инкубируют в течение 5 минут, после чего добавляют 0,005 мг/мл HMG-CoA лиазы, и далее протекание реакции

мониторят понижением абсорбции на 340 нм. Контрольное исследование проводят при

отсутствии фермента.

30

Для объяснения неспецифического исчезновения NADH, результаты, полученные в контрольном исследовании в отсутствие фермента, вычитают из результатов, полученных при исследовании образцов. Специфические активности рассчитывали как

Дмкмоль NADH/мин·мг протеина.

35

Физиологическая активность некоторых очищенных HMG-CoA лиаз		
Uniprot номер доступа	Организм	Физиологическая активность мкмоль/мин·мг протеина
A8WG57	<i>Danio rerio</i> (Данио-рерио) (брахиданио-рерио)	4,05
Q29448	<i>Bos taurus</i> (бычий)	5,79
B6U7B9	<i>Zea mays</i>	13,31
A5FHS2	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	2,89
A1VJH1	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	34,92
A9IFQ7	<i>Bordetella petrii</i>	9,84
A9IR28	<i>Bordetella petrii</i>	1,74
A1VT25	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	0,39

40

45

Пример 5

Получение 3-гидрокси-3-метилбутирата

Полная реакционная смесь для синтеза 3-гидрокси-3-метилбутирата включала 40 мМ Трис-НСI pH 8, от 5 до 50 мМ ацетил-СоА, от 100 до 500 мМ ацетона, 1 MgCl₂ (за исключением митохондриальной HMG-СоА синтазы), 0,5 мМ DTT и фермент, варьирующий в диапазоне от 0,2 до 8 мг/мл. Контрольные реакции проводили при
5 отсутствию фермента и одного из субстратов.

За протеканием синтеза следили путем анализа аликвот, взятых после периода возрастания инкубации при 30 или 37°C. Обычно, аликвоту 50 мкл отбирали спустя 48 ч инкубации, нагревали в течение 1 минуты при 100°C для удаления протеинов, центрифугировали и супернатант переносили в чистую виалу для обнаружения ГИВ,
10 используя масс-спектрометрию. Раствор 3-гидрокси-3-метилбутирата готовили в 40 мМ Трис-НСI pH 8, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ DTT, нагревали, как описано ранее, и использовали как референтный.

Образцы анализировали на PE SCIEX API 2000 тройном квадрупольном масс-спектрометре в режиме отрицательных ионов с раствором H₂O/ацетонитрил=60/40,
15 содержащим 0,1% триэтиламина в качестве подвижной фазы, скорость потока составляла 40 мкл/мин. 10 мкл каждого супернатанта смешивали с равным количеством подвижной фазы и напрямую впрыскивали в масс-спектрометр. Контролировали присутствие [3-гидрокси-3-метилбутират-Н]⁻ иона.

Пик, соответствующий 3-гидрокси-3-метилбутирату наблюдали для следующих ферментов:

Blattella germanica (рыжего таракана) P54961 (SEQ ID NO: 6)

Gallus gallus (курицы) P23228 (SEQ ID NO: 7)

Homo sapiens (человека) Q01581 (SEQ ID NO: 8)

25 *Arabidopsis thaliana* P54873 (CAA58763) (SEQ ID NO: 4)

Caenorhabditis elegans P54871 (SEQ ID NO: 1)

Schizosaccharomyces pombe (делящихся дрожжей) P54874 (SEQ ID NO: 2)

Saccharomyces cerevisiae (пекарских дрожжей) P54839 (SEQ ID NO: 3)

Dictyostelium discoideum (слизевого гриба) Q86HL5 (SEQ ID NO: 10)

30 *Leuconostoc mesenteroides* Q03WZ0 (SEQ ID NO:)

Staphylococcus epidermidis Q8CN06 (SEQ ID NO: 11)

Lactobacillus delbrueckii Q1GAH5 (SEQ ID NO: 24)

Staphylococcus haemolyticus Q4L958 (I98>V различие по сравнению с протеином дикого типа) (SEQ ID NO: 25)

35 Фигуры 6-8 демонстрируют достоверные результаты для коммерчески доступного 3-гидрокси-3-метилбутирата, для реакции, используя HMG СоА синтазау из *Gallus gallus* (P23228) и для контрольного исследования без фермента.

Пример 6

Получение 3-гидрокси-3-метилбутирил-СоА, используя лиазы

40 Синтез 3-гидрокси-3-метилбутирил-СоА проводят в присутствии ацетона с радиоизотопной меткой [2-¹⁴C]. Полная реакция смесь для синтеза 3-гидрокси-3-метилбутирил-СоА включает 40 мМ Трис-НСI pH 8, от 5 до 50 мМ ацетил-СоА, от 100 до 500 мМ ацетона, от 1 до 10 мМ MgCl₂, 0,5 мМ DTT и фермент, варьирующий в диапазоне от 0,5 до 7 мг/мл. Образование продукта анализируют после разделения
45 реакционной смеси путем ТСХ или ВЭЖХ. Кроме того, 3-гидрокси-3-метилбутирил-СоА анализируют способом ТСХ (Stadtman E.R., J. Biol. Chem. 196 (1952), 535-546). Аликвоту реакционной смеси помещают в целлюлозную пластину и хроматографируют в следующей системе растворителей: этанол/0,1 М натрия ацетат pH 4,5 (1/1). Со-А и

ацетил-СоА используют как внутренние стандарты. Rf, описанное для 3-гидрокси-3-метилбутирил-СоА составляет 0,88.

Пример 7

Кинетические параметры для ферментной реакции между ацетил-СоА и ацетоном в случае НМГ синтаз

Кинетические параметры измеряли, используя переменную концентрацию ацетона и постоянную концентрацию ацетил-СоА (10 мМ) при следующих условиях:

40 мМ Трис-НСI рН 8

2 мМ MgCl₂

0-1 М ацетона

Конечное значение рН довели до 8.

Реакцию инициировали добавлением 3 мг очищенного фермента к 1 мл реакционной смеси. Затем смесь инкубировали без встряхивания при 37°C в течение 40 ч.

Анализ продуцирования 3-гидрокси-3-метилбутирата

Применяют термохимические условия, которые приводят к разложению 3-гидрокси-3-метилбутирата до изобутена (Pressman et al., JACS, 1940, 2069-2080): рН реакционных смесей довели сначала до уровня рН 4, используя 6N HCl, и затем образцы переносили в виалы для газовой хроматографии (Interchim). Виалы запаивали и инкубировали при 110°C в течение 4 часов, таким образом, приводя к разложению 3-гидрокси-3-метилбутират до изобутена.

Калибровочную кривую строили при тех же условиях, используя коммерческий 3-гидрокси-3-метилбутират.

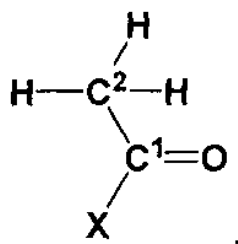
Один миллилитр газового пространства над образцом собирали и впрыскивали в HP5890 газовый хроматограф (HP), оснащенный FID детектором и CP SilicaPlot колонкой (Varian). Коммерческий изобутен использовали как референтный образец. По сигналу изобутена рассчитывали количество 3-гидрокси-3-метилбутирата изначально присутствующего в образце. Параметры кинетики для нескольких изученных НМГ-СоА синтаз представлены в следующей таблице.

Организм	K _M для ацетона, мМ	k _{cat} ×10 ⁻⁴ , сек ⁻¹	k _{cat} /K _M ×10 ⁻⁶ , мМ ⁻¹ ×сек ⁻¹
Gallus gallus	250	5	2
Staphylococcus epidermidis	200	0,6	0,3
Schizosaccharomyces pombe	200	0,2	0,1

Для фермента из *S. epidermidis* Фигура 9 демонстрирует соответствующую диаграмму Михаэлиса - Ментена.

Формула изобретения

1. Способ получения 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты, который включает ферментное превращение ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу и представлено следующей формулой (I):



в которой X является S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(OH)-C(CH₃)₂-CH₂-O-PO₂H-O-PO₂H-C₁₀H₁₃N₅O₇P (кофермент А),

с помощью фермента, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения формулы (I), и где упомянутый фермент является ферментом, имеющим активность HMG CoA синтазы EC 2.3.3.10.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что превращение осуществляют в присутствии организма, способного продуцировать ацетон и экспрессирующего фермент, имеющий активность HMG CoA синтазы EC 2.3.3.10.

3. Рекомбинантный организм, выбранный из группы, включающей растения, грибы, бактерии и архибактерии, предназначенный для получения 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты, продуцирующий ацетон, и модифицирован путем введения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей HMG CoA синтазу (EC 2.3.3.10), которая способна катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы соединения формулы (I).

4. Организм по п. 3, где организм получен из организма, обладающего способностью продуцировать ацетон в природе.

5. Организм по п. 4, где организм является микроорганизмом, принадлежащим к роду *Clostridium*, *Bacillus* или *Pseudomonas*.

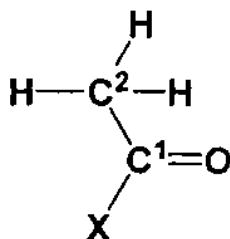
6. Организм по п. 5, где организм является микроорганизмом, принадлежащим к виду *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium cellulolyticum*, *Bacillus polymyxa* или *Pseudomonas putida*.

7. Организм по п. 3, где организм получен из организма, который в природе не продуцирует ацетон, и является генетически модифицированным, таким образом, что становится способным продуцировать ацетон, путем введения гена(ов), необходимого (ых), обеспечивающего(их) продуцирование ацетона в организме.

8. Организм в по п. 7, где организм является организмом, способным к фотосинтезу.

9. Применение организма по любому из пп. 3-8 для продуцирования 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты.

10. Композиция для продуцирования 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты, которая содержит в эффективных количествах организм по любому из пп. 3-8 и соединение, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, представленное следующей формулой (I):



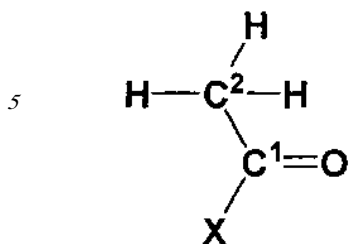
в которой X является S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(OH)-C(CH₃)₂-CH₂-O-PO₂H-O-PO₂H-C₁₀H₁₃N₅O₇P (кофермент А).

11. Композиция для продуцирования 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты, которая содержит в эффективных количествах

а. ацетон;

б. соединение, которое обеспечивает активированную ацетильную группу,

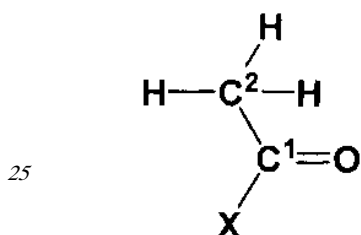
представленное следующей формулой (I):



10 в которой X является S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(OH)-C(CH₃)₂-CH₂-O-PO₂H-O-PO₂H-C₁₀H₁₃N₅O₇P (кофермент А), и

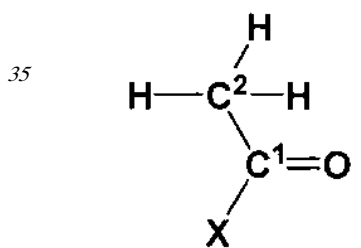
15 в. фермент, который способен катализировать образование ковалентной связи между атомом углерода оксо-группы (то есть C=O) ацетона и атомом углерода (C²) соответствующей метильной группы упомянутого соединения, определенного в (б), и где упомянутый фермент является ферментом, имеющим активность HMG CoA синтазы EC 2.3.3.10.

20 12. Применение фермента, имеющего активность HMG CoA синтазы EC 2.3.3.10, для получения 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты в присутствии ацетона и соединения формулы (I):

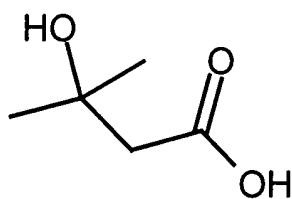


30 в которой X является S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(OH)-C(CH₃)₂-CH₂-O-PO₂H-O-PO₂H-C₁₀H₁₃N₅O₇P (кофермент А).

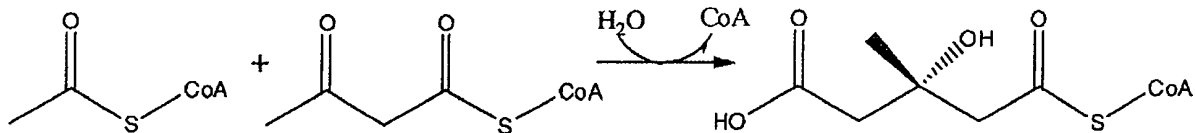
35 13. Применение ацетона для получения 3-гидрокси-3-метилмасляной кислоты путем ферментативного превращения ацетона и соединения, которое обеспечивает активированную ацетильную группу, представленного следующей формулой (I):



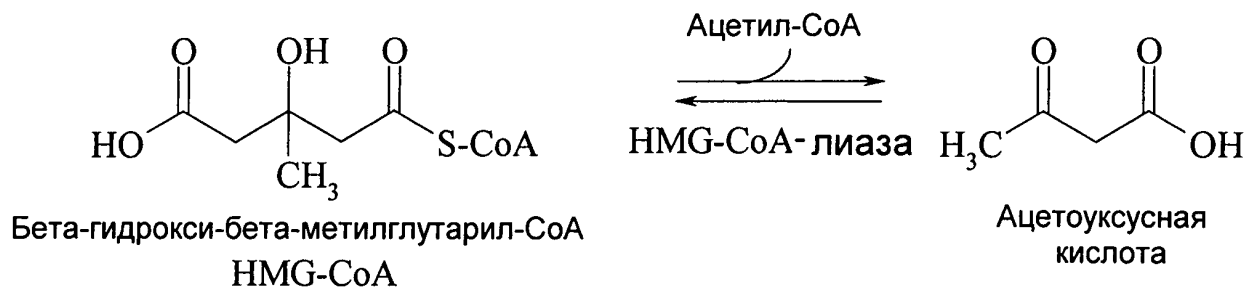
45 в которой X является S-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-CH(OH)-C(CH₃)₂-CH₂-O-PO₂H-O-PO₂H-C₁₀H₁₃N₅O₇P (кофермент А), где ферментное превращение осуществляют с помощью фермента, имеющего ферментную активность HMG CoA синтазы EC 2.3.3.10.



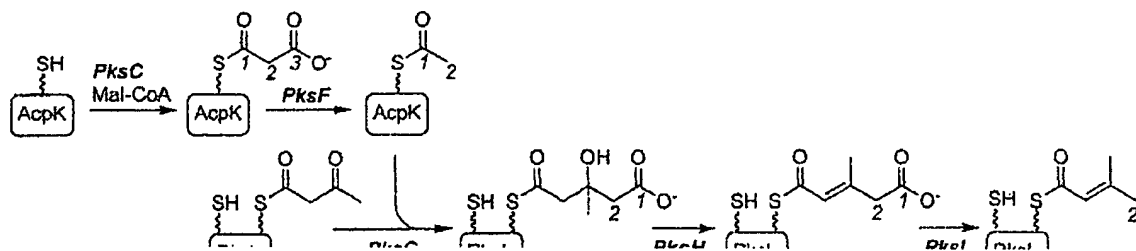
Фиг. 1



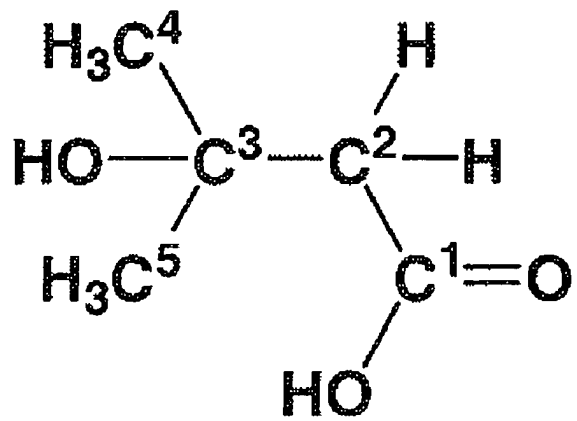
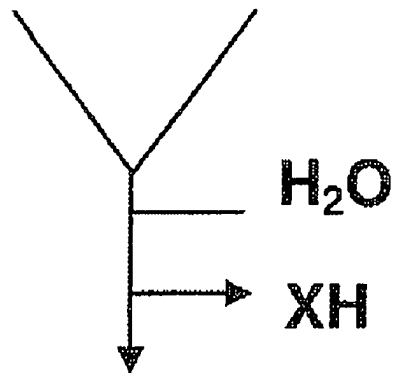
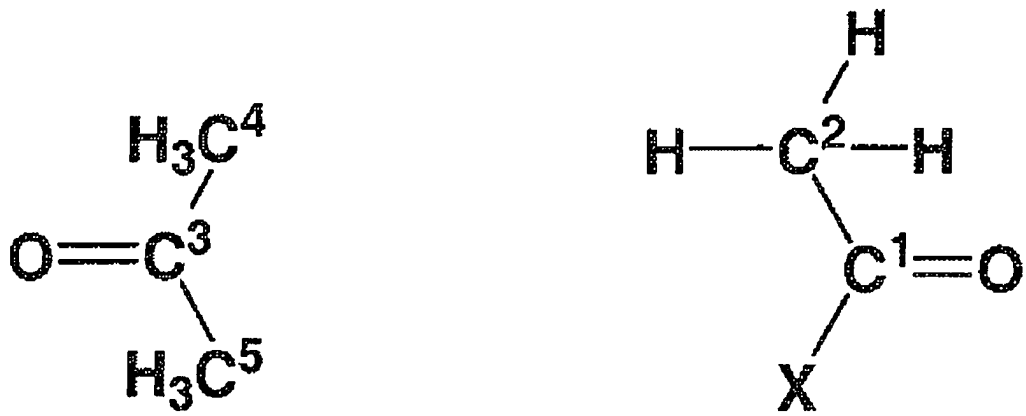
Фиг. 2



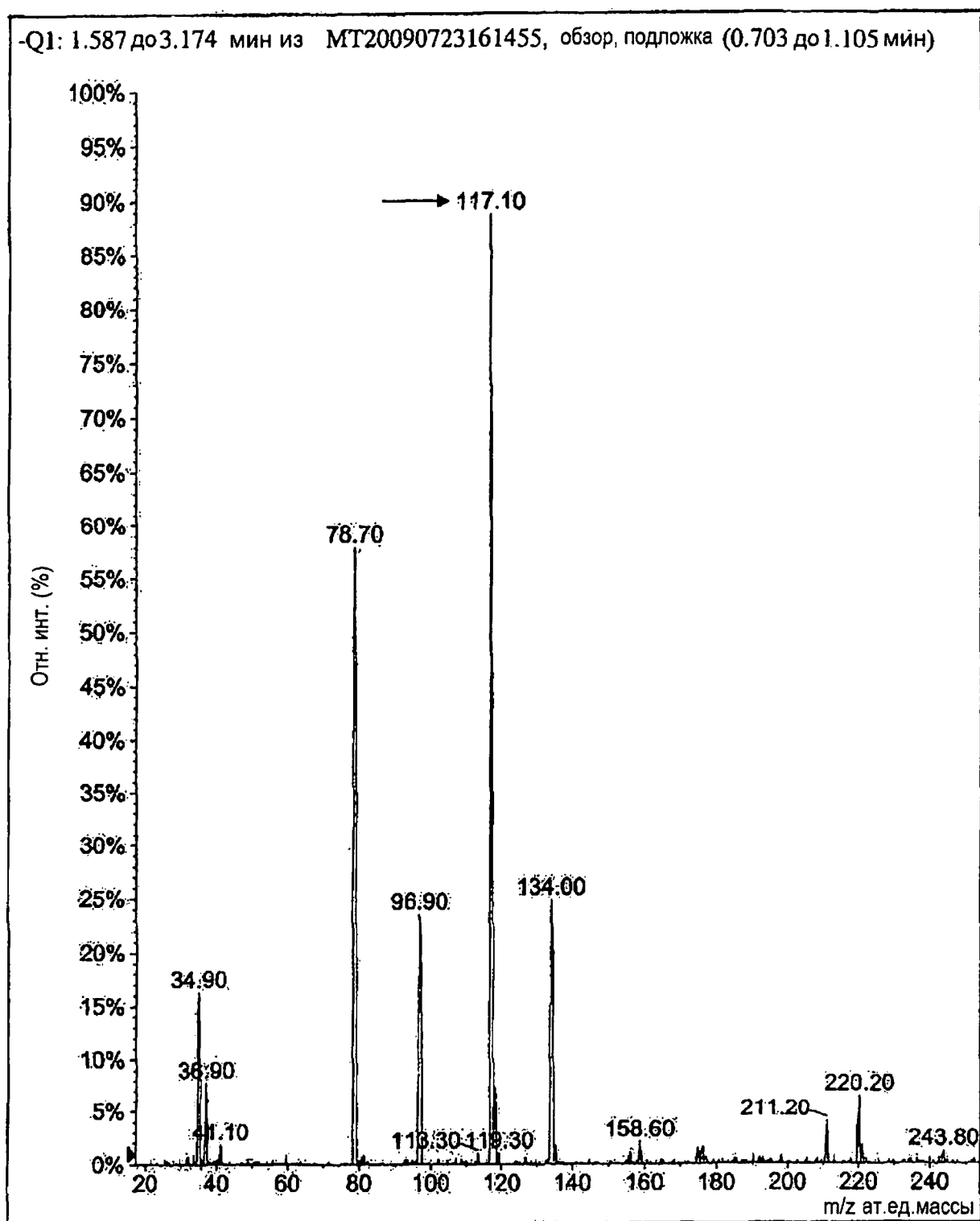
Фиг. 3



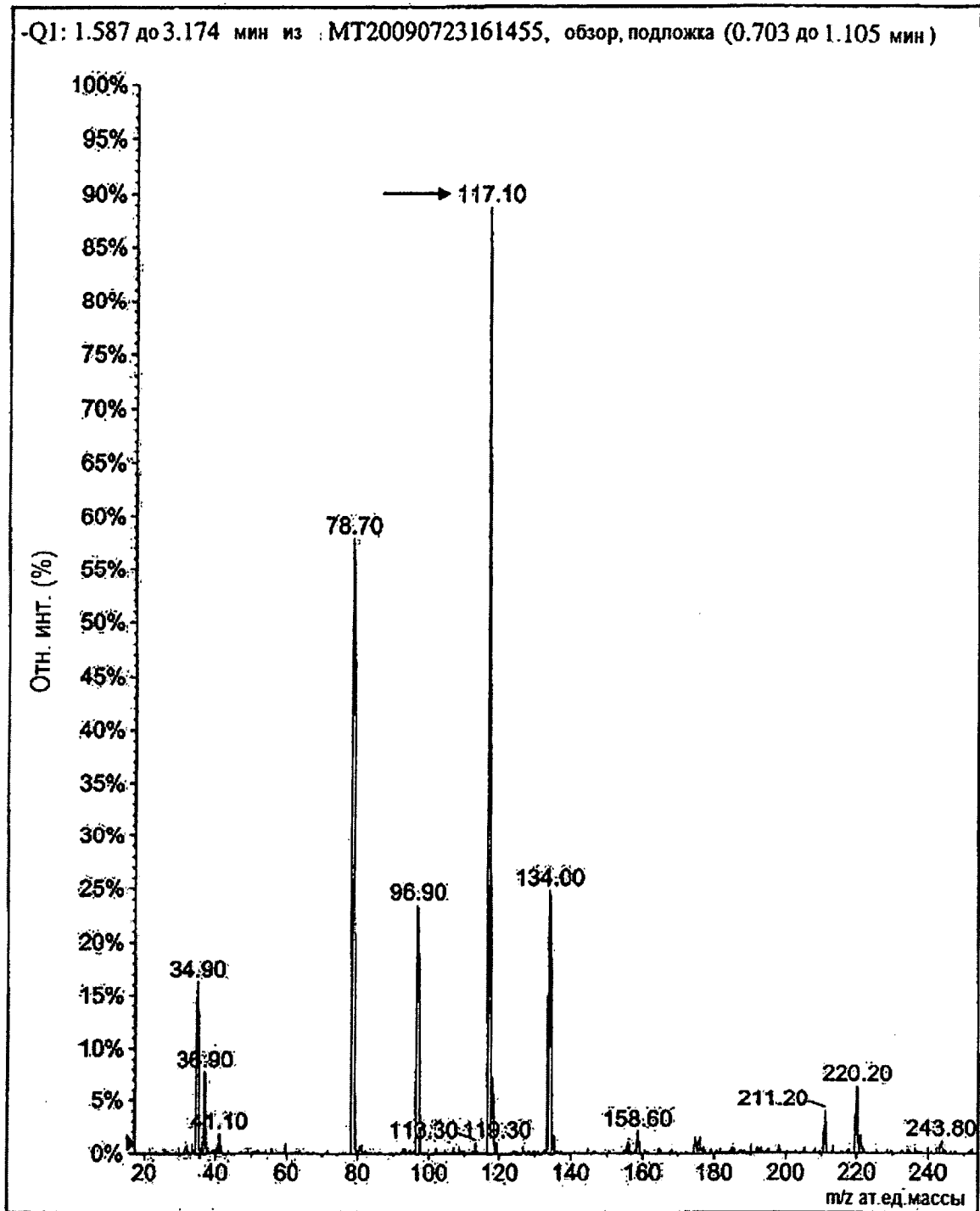
Фиг. 4



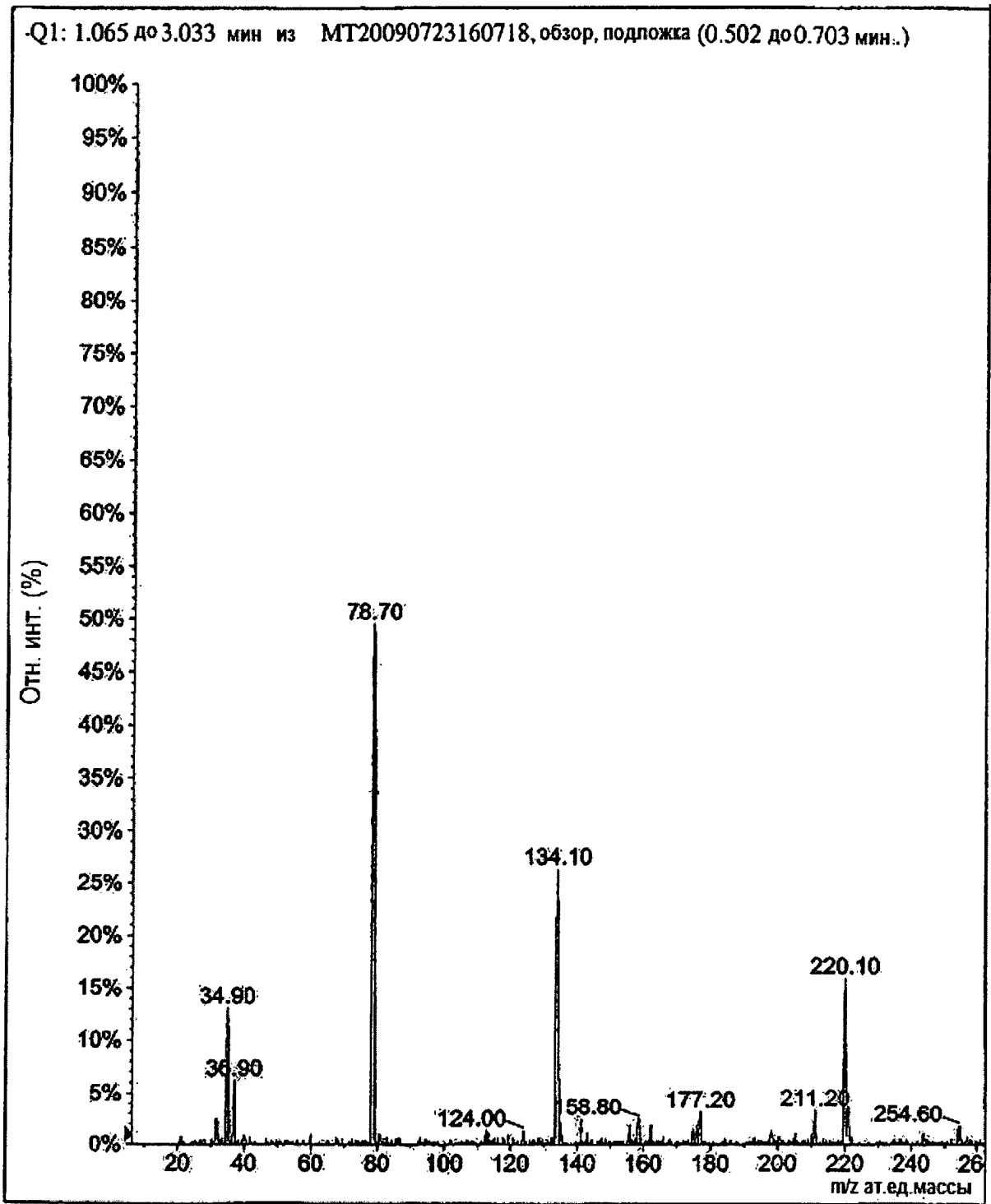
Фиг. 5



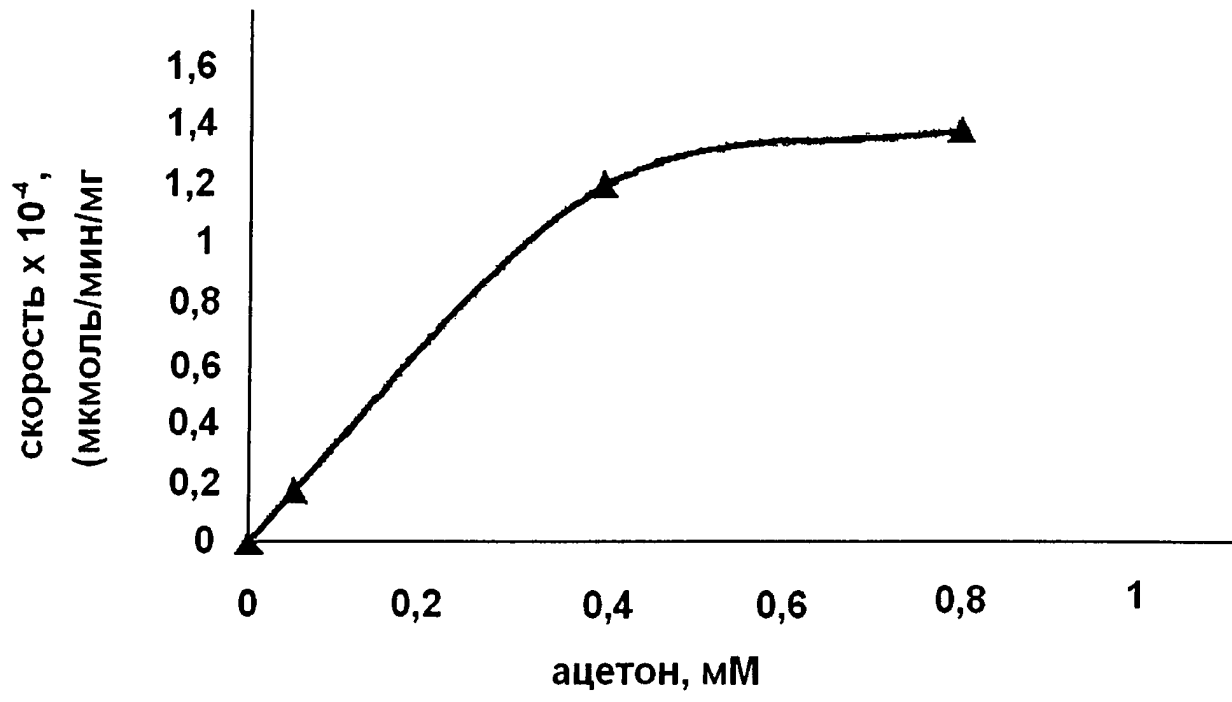
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9