



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020023404-4 A2



(22) Data do Depósito: 21/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 09/02/2021

(54) Título: OTIMIZAÇÃO DE ISOMERIZAÇÃO DE C-8 ESTEROL

(51) Int. Cl.: C12N 9/90; C12P 33/00; C12N 1/19.

(30) Prioridade Unionista: 22/05/2018 CH 00626/18.

(71) Depositante(es): DSM IP ASSETS B.V..

(72) Inventor(es): CHRISTOPHER MARK FARRELL; LISA ANN LAPRADE; OTTO MARTIN LEHMANN; JOSHUA TRUEHEART; BASTIEN JEAN WOLFGANG CHEVREUX.

(86) Pedido PCT: PCT EP2019063080 de 21/05/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/224190 de 28/11/2019

(85) Data da Fase Nacional: 17/11/2020

(57) Resumo: A presente invenção se refere a um método aprimorado para produção de 7-desidrocolesterol (7-DHC), um intermediário importante para produção biotecnológica de vitamina D3 ou derivados/metabólitos da mesma. A invenção apresenta cepas de levedura modificada que expressam enzimas que têm atividade de C-8 esterol isomerase aprimorada levando a razões aumentadas de 7-DHC na mistura de esteróis.

“OTIMIZAÇÃO DE ISOMERIZAÇÃO DE C-8 ESTEROL”

[0001] A presente invenção se refere a um método aprimorado para produção de 7-desidrocolesterol (7-DHC), um intermediário importante para produção biotecnológica de vitamina D3 ou derivados/metabólitos da mesma. A invenção caracteriza cepas hospedeiras modificadas que expressam enzimas que têm atividade de C-8 esterol isomerase aprimorada e seu uso em um processo para produção de vitamina D3 ou derivados e/ou metabólitos da mesma.

[0002] A vitamina D3 (também conhecida como colecalciferol ou calciol) pode ser sintetizada na pele de mamíferos a partir da provitamina D3 (também conhecida como 7-desidrocolesterol ou 7-DHC) que é o produto da biossíntese de colesterol mediante a exposição à luz UV, através disso, 7-DHC é fotoquimicamente convertido em provitamina D3, que isomeriza à temperatura corporal na forma biologicamente ativa de vitamina D3. No fígado, a vitamina D3 é convertida em 25-hidroxivitamina D3 biologicamente ativa (também conhecida como calcidiol, calcifediol, 25-hidroxicolecalciferol, 25-OH-D3 ou HyD), que é a principal forma circulante da vitamina D3. Hidroxilação adicional ocorre no rim.

[0003] Para produção industrial de vitamina D3, a síntese tanto química quanto biotecnológica está disponível (em princípio). A síntese química começa com o colesterol isolado de, por exemplo, gordura de lã que é desidrogenada em 7-DHC, um intermediário importante tanto na síntese química quanto na síntese biotecnológica. Através da exposição por luz UV e outras etapas de purificação/extração, 7-DHC é convertido

em vitamina D3. As cepas de levedura modificadas podem ser usadas para biossíntese de 7-DHC, em que acetil-CoA é convertido em um processo enzimático de múltiplas etapas em 7-DHC. A dita conversão enzimática ocorre no retículo endoplasmático da levedura. Quantidades excessivas de esteróis, incluindo 7-DHC e precursores do mesmo, não necessários nas membranas celulares, são tóxicas à levedura e são, desse modo, armazenadas como ésteres esterílicos em organelas intracelulares (assim chamadas corpos lipídicos) a partir das quais podem ser adicionalmente isoladas. O equilíbrio entre esteróis livres e aqueles armazenados nos corpos lipídicos (principalmente na forma de ésteres esterílicos) é desencadeado pela ação de várias proteínas (enzimas), incluindo a ação de esterol aciltransferases.

[0004] Devido à ação inespecífica das ditas enzimas esterol aciltransferases, o agrupamento de ésteres esterílicos que é armazenado dentro dos corpos lipídicos é relativamente diverso, incluindo, porém sem limitação, por exemplo, ésteres de ergosterol, zimosterol, lanosterol, latosterol, colest-5,7,24(25)-trienol, colest-8-enol ou 7-DHC. Apenas 7-DHC pode ser adicionalmente processado em vitamina D3.

[0005] Assim, uma tarefa em andamento consiste em gerar células hospedeiras, como levedura capaz de produzir esteróis, com alta produtividade/especificidade para 7-DHC e/ou acúmulo reduzido de produtos colaterais/intermediários incluindo zimosterol, lanosterol ou latosterol, em particular, ésteres de tais intermediários armazenados nos corpos lipídicos.

[0006] Surpreendentemente, constatou-se agora que a

produtividade de 7-DHC em uma célula hospedeira, em particular, a razão entre 7-DHC e colest-8-enol, pode ser deslocada para 7-DHC através da modificação de atividade de C-8 esterol isomerase dentro da célula hospedeira, isto é, expressão de enzimas heterólogas que têm atividade de C-8 esterol isomerase, o que leva a maior produtividade da célula hospedeira para 7-DHC como intermediário importante na produção de vitamina D3.

[0007] Assim, a presente invenção é direcionada ao uso de uma enzima que tem atividade de C-8 esterol isomerase em um processo para produção de 7-DHC, em que o dito polipeptídeo tem pelo menos 41 %, como, por exemplo, pelo menos 44, 45, 48, 49, 53, 56, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 ou até 100 % de identidade com a SEQ ID NO:6 que é expressa (de maneira heteróloga) em uma célula hospedeira adequada para produção de 7-DHC, em que a razão entre 7-DHC e produtos colaterais incluindo colest-8-enol é aumentada em pelo menos 2 vezes em comparação com uma célula hospedeira não modificada.

[0008] O polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO:6, que mostra atividade de C-8 esterol isomerase, que pode ser codificado pelo polinucleotídeo de acordo com a SEQ ID NO:2, foi isolado de *Ustilago maydis*.

[0009] Os termos "C-8 esterol isomerase", "delta 8,7-isomerase", "enzima que tem C-8 esterol isomerase", "isomerase" ou "homólogo de ERG2" são usados intercambiavelmente no presente documento e se referem a enzimas que são capazes de catalisar a conversão de colest-8-enol em colest-7-enol e/ou zimosterol em colest-7,24-dienol. As enzimas definidas no presente documento são homólogos de ERG2 de *Saccharomyces cerevisiae* (sequência de

polipeptídeos derivada de UniProtKB - P32352) de acordo com a SEQ ID NO:5, que podem ser codificados por um polinucleotídeo de acordo com a SEQ ID NO:1.

[0010] Os termos "conversão", "conversão enzimática" ou "isomerização" em conjunto com catálise enzimática de, por exemplo, colest-8-enol para colest-7-enol (latosterol) e/ou zimosterol para colest-7,24-dienol são usados intercambiavelmente no presente documento e se referem à ação de C-8 esterol isomerase como definido no presente documento e conhecido na técnica.

[0011] A isomerase pode ser usada em uma forma isolada (por exemplo, em um sistema livre de célula) ou pode ser introduzida e expressa como enzima heteróloga ou extracópia de enzimas endógenas em uma célula hospedeira adequada. Desse modo, uma célula hospedeira adequada, expresse uma, duas ou mais cópias de enzimas isomerase como definido no presente documento, levando a um aumento em 7-DHC e/ou razão aprimorada entre 7-DHC e colest-8-enol, em que a dita célula hospedeira é referida no presente documento como célula hospedeira geneticamente modificada. Uma célula hospedeira não modificada ou geneticamente não modificada referida no presente documento é a respectiva célula hospedeira que porta apenas a atividade endógena de C-8 esterol isomerase expressa pelo gene ERG2 endógeno.

[0012] Como usado no presente documento, os termos "zimosterol", "lanosterol", "latosterol", "colest-5,8,24(25)-trienol", "colest-5,7,24(25)-trienol" ou "7-DHC" que especificam intermediários de vitamina D3 incluem tanto a forma livre quanto a forma de éster dos ditos compostos. Como usado no presente documento, uma mistura de

esteróis contém 7-DHC e "produtos colaterais" ou intermediários, incluindo, porém sem limitação, zimosterol, lanosterol, latosterol, colestá-8-enol, colestá-5,8,24(25)-trienol ou colestá-5,7,24(25)-trienol.

[0013] Como usado no presente documento, uma "levedura produtora de colesterol" não pode mais produzir ergosterol, mas os produtos de colesterol, incluindo, porém sem limitação, colestá-5,7,24(25)-trienol, colestá-5,8,24(25)-trienol, colestá-7,24(25)-dienol, colestá-8-enol, 7-DHC ou zimosterol. Particularmente, isso pode ser alcançado através da introdução de inativação dupla de *erg5erg6*.

[0014] As isomerases adequadas como definido no presente documento podem ser obtíveis a partir de diferentes fontes, como, por exemplo, plantas, animais, incluindo seres humanos, algas, fungos, incluindo leveduras ou bactérias, de preferência, de fungos, particularmente selecionados a partir do grupo que consiste em *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Magneporte*, *Metarhizium* e *Ustilago*, com mais preferência, selecionados a partir de *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *K. lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *P. pastoris*, *C. albicans*, *P. roqueforti*, *A. nidulans*, *C. neoformans*, *Magneporte oryzae*, *Metarhizium acridum* ou *U. maydis*, com máxima preferência, de *U. maydis*.

[0015] Em uma modalidade preferencial, a enzima que tem atividade de C-8 esterol isomerase é obtível a partir de *Ustilago*, particularmente *Ustilago maydis*, como, por exemplo, uma proteína codificada por um polinucleotídeo de acordo com a SEQ ID NO:2, com mais preferência, a dita

proteína é um polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO:6 (sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - P32360).

[0016] Em uma outra modalidade, a enzima que tem atividade de C-8 esterol isomerase é obténível a partir de *Candida*, particularmente *Candida albicans*, como, por exemplo, uma proteína codificada por um polinucleotídeo de acordo com a SEQ ID NO:3, com mais preferência, a dita proteína é um polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO:7 (sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - C4YFH6).

[0017] Em uma modalidade adicional, a enzima que tem atividade de C-8 esterol isomerase é obténível a partir de *Schizosaccharomyces*, particularmente *Schizosaccharomyces pombe*, como, por exemplo, uma proteína codificada por um polinucleotídeo de acordo com a SEQ ID NO:4, com mais preferência, a dita proteína é um polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO:8 (sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - P87113).

[0018] Em uma modalidade, a enzima que tem atividade de C-8 esterol isomerase é obténível a partir de *Saccharomyces*, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, como, por exemplo, uma proteína codificada por um polinucleotídeo de acordo com a SEQ ID NO:1, com mais preferência, a dita proteína é um polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO:5 (sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - P32352), em que a dita enzima é expressa adicionalmente e/ou como substituição do ERG2 endógeno ao usar *S. cerevisiae* como hospedeiro.

[0019] As modalidades adicionais incluem um processo para produção de 7-DHC em uma célula hospedeira adequada, por exemplo, célula de levedura, particularmente célula de levedura produtora de colesterol, em que um homólogo de ERG2

de *Y. lipolytica* (por exemplo, sequências de polipeptídeos derivadas de UniProtKB - Q6CEA6 ou Q6C3U4), *K. lactis* (por exemplo, sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - Q6CL22), *P. pastoris* (por exemplo, sequências de polipeptídeos derivadas de UniProtKB - F2QZY6 ou C4R749), *P. roqueforti* (por exemplo, sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - W6PX20), *A. nidulans* (por exemplo, sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - C8VT80), *C. neoformans* (por exemplo, sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - J9VMS8), *Magnaporthe oryzae* (por exemplo, sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - P33281) ou *Metarhizium acridum* (por exemplo, sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - E9EHP6) é expresso em uma célula de levedura produtora de colesterol adequada sob condições adequadas como descrito no presente documento.

[0020] Com base nas sequências como revelado no presente documento e no acúmulo aprimorado de 7-DHC e/ou redução de colesta-8-enol na mistura de esteróis, isto é, levando a pelo menos 80 %, como 85, 90, 95, 98 ou até mesmo 100 % de 7-DHC presente na mistura de esteróis, um indivíduo pode facilmente deduzir genes adicionalmente adequados que codificam polipeptídeos que têm atividade de C-8 esterol isomerase como definido no presente documento que podem ser usados para a isomerização de C-8 esteróis como definido no presente documento, particularmente zimosterol e colesta-8-enol. Desse modo, a presente invenção é direcionada a um método para identificação de isomerases inovadoras, em que um polipeptídeo com pelo menos 43 %, como, por exemplo, pelo menos 47, 50, 56, 60, 70, 75, 80, 90, 92, 95, 98 ou até 100 % de identidade com ERG2 de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID

NO:5), é usado como uma sonda em um processo de triagem para novas C-8 esterol isomerases, com preferência para produção de 7-DHC em vez de colest-8-enol, levando a pelo menos 80 % de 7-DHC na mistura de esteróis produzida por uma cepa hospedeira adequada. Qualquer polipeptídeo com atividade de C-8 esterol isomerase e revelado no presente documento deve ser usado para produção de 7-DHC, desde que a ação de isomerização resulta em pelo menos cerca de 80 % de 7-DHC na mistura de esteróis, com base na quantidade total de esteróis produzidos e/ou razão aumentada entre 7-DHC e colest-8-enol.

[0021] A presente invenção é particularmente direcionada ao uso de tais enzimas isomerase inovadoras, particularmente enzimas heterólogas, em um processo para produção de 7-DHC, em que a produção de produtos colaterais na mistura de esteróis incluindo colest-8-enol, zimosterol, latosterol ou lanosterol é reduzida para cerca de 20 % ou menos, como 15, 10, 5, 3 % ou menos com base nas quantidades totais de esteróis, pela ação das ditas isomerases, como definido no presente documento, particularmente em que a quantidade de colest-8-enol em relação à quantidade de 7-DHC é reduzida. O processo pode ser realizado com uma célula de levedura produtora de colesterol adequada que expressa as ditas isomerases heterólogas, de preferência, em que os genes que codificam as ditas enzimas são expressos de maneira heteróloga, isto é, introduzidas nas ditas células hospedeiras. 7-DHC pode ser adicionalmente convertido em vitamina D3 pela ação de mecanismos químicos ou biotecnológicos (conhecidos) adequados.

[0022] Os termos "identidade de sequência", "% de

identidade" são usados de modo intercambiável no presente documento. Para o propósito desta invenção, é definido aqui que, para determinar a percentagem de identidade de sequência de duas sequências de aminoácidos ou de duas sequências de ácidos nucleicos, as sequências são alinhadas para fins de comparação ideal. De modo a otimizar o alinhamento entre as duas sequências, podem ser introduzidas lacunas em qualquer uma das duas sequências que são comparadas. Esse alinhamento pode ser realizado ao longo de todo o comprimento das sequências a serem comparadas. Alternativamente, o alinhamento pode ser realizado ao longo de um comprimento menor, por exemplo, ao longo de cerca de 20, cerca de 50, cerca de 100 ou mais ácidos nucleicos/bases ou aminoácidos. A identidade de sequência é a percentagem de correspondências idênticas entre as duas sequências ao longo da região alinhada relatada. A identidade de sequência em percentagem entre duas sequências de aminoácidos ou entre duas sequências de nucleotídeos pode ser determinada com o uso do algoritmo Needleman e Wunsch para o alinhamento de duas sequências (Needleman, S. B. e Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Ambas dentre as sequências de aminoácidos e sequências de nucleotídeos podem ser alinhadas pelo algoritmo. O algoritmo de Needleman-Wunsch foi implementado no programa de computador NEEDLE. Para os propósitos da presente invenção, foi usado o programa NEEDLE do pacote EMBOSS (versão 2.8.0 ou superior, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, Longden and Bleasby, Trends in Genetics 16, (6) páginas 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). É usado EBLOSUM62 para as sequências de proteínas para a matriz de substituição. Para

a sequência de nucleotídeos, é usado EDNAFULL. Os parâmetros opcionais usados têm uma penalidade de abertura de lacunas de 10 e penalidade de extensão de lacuna de 0,5. Um técnico no assunto compreenderá que todos estes parâmetros diferentes produzirão resultados ligeiramente diferentes, mas que a porcentagem total de identidade de duas sequências não é significativamente alterada quando são usados diferentes algoritmos.

[0023] Após o alinhamento pelo programa NEEDLE como descrito acima, a porcentagem de identidade de sequência entre uma sequência de consulta e uma sequência da invenção é calculada como a seguir: número de posições correspondentes no alinhamento que mostra um aminoácido idêntico ou um nucleotídeo idêntico em ambas as sequências dividido pelo comprimento total do alinhamento após a subtração do número total de vãos no alinhamento. A identidade como definido no presente documento pode ser obtida a partir de NEEDLE através do uso da opção NOBRIEF e é etiquetada na saída do programa como "identidade mais longa". Se ambas as sequências de aminoácidos que são comparadas não diferirem em que qualquer um dos seus aminoácidos, as mesmas são idênticas ou têm 100 % de identidade. Em relação às enzimas originadas a partir de plantas como definido no presente documento, o elemento versado está ciente do fato de que as enzimas derivadas de planta podem conter um sinal de direcionamento de cloroplasto deve ser clivado através de enzimas específicas, como, por exemplo, enzimas de processamento de cloroplasto (CPEs).

[0024] As enzimas/homólogos de ERG2, como definido no presente documento, também abrangem as enzimas que portam a substituição (ou substituições) de aminoácido que não altera

a atividade de enzima, isto é, que mostra as mesmas propriedades em relação à enzima do tipo selvagem e catalisam a isomerização de C-8 esteróis, levando a uma porcentagem de pelo menos 80 % de 7-DHC (com redução de colest-8-enol para 7-DHC) na mistura de esteróis. Tais mutações são denominadas também "mutações silenciosas", que não alteram a atividade (enzimática) das enzimas como descrito no presente documento.

[0025] Dependendo da célula hospedeira, os polinucleotídeos como definido no presente documento envolvidos na isomerização de C-8 esterol podem ser otimizados para expressão na respectiva célula hospedeira. A pessoa versada sabe como gerar tais polinucleotídeos modificados. Entende-se que os polinucleotídeos como definido no presente documento abrange também tais moléculas de ácido nucleico otimizadas por hospedeiro desde que os mesmos expressem o polipeptídeo com as respectivas atividades como definido no presente documento. Exemplos de tais homólogos de ERG2 otimizados por hospedeiro são mostrados em, por exemplo, SEQ ID NOs:9, 10 e 11.

[0026] Assim, em uma modalidade, a presente invenção é direcionada a uma célula hospedeira que compreende polinucleotídeos que codificam homólogos de ERG2 (heterólogos) como definido no presente documento que são otimizados para expressão na dita célula hospedeira, sem impacto no crescimento ou padrão de expressão da célula hospedeira ou das enzimas. Particularmente, a levedura, por exemplo, a célula de levedura produtora de colesterol, é selecionada a partir de *Saccharomyces*, como, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, em que uma, duas ou mais cópias

dos polinucleotídeos que codificam as enzimas ERG2 como definido no presente documento são selecionadas a partir de polinucleotídeos com pelo menos 52 %, como, por exemplo, 54, 60, 70, 80, 85, 90, 92, 97 ou até 100 % de identidade com SEQ ID NOs:9, incluindo polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de acordo com a SEQ ID NO:5, 6, 7, 8.

[0027] Uma molécula de ácido nucleico de acordo com invenção pode compreender apenas uma porção ou um fragmento da sequência de ácidos nucleicos fornecida pela presente invenção, como, por exemplo, as sequências mostradas em SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 9, 10 ou 11, por exemplo um fragmento que pode ser usado como uma sonda ou iniciador ou um fragmento que codifica uma porção de homólogo de ERG2 como definido no presente documento. A sonda/iniciador compreende tipicamente oligonucleotídeos substancialmente purificados que compreendem tipicamente uma região de sequência de nucleotídeos que hibridiza, de preferência, sob condições altamente rigorosas a pelo menos cerca de 12 ou 15, de preferência, cerca de 18 ou 20, com mais preferência, cerca de 22 ou 25, ainda com mais preferência, cerca de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, ou 75 ou mais nucleotídeos consecutivos de uma sequência de nucleotídeos de acordo com a SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 9, 10 ou 11 ou fragmentos ou derivados dos mesmos.

[0028] Um exemplo não limitante preferencial de tais condições de hibridização em 6x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45 °C, seguida por uma ou mais lavagens em 1x SSC, 0,1 % de SDS a 50 °C, de preferência, a 55 °C, com mais preferência, a 60 °C em ainda com mais preferência, a 65 °C.

[0029] Condições altamente rigorosas incluem, por exemplo, 2 h a 4 dias de incubação a 42 °C com o uso de uma sonda de DNA identificada com digoxigenina (DIG) (preparada através do uso de um sistema de identificação de DIG; Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Alemanha) em uma solução como solução de DigEasyHyb (Roche Diagnostics GmbH) com ou sem 100 µg/ml de DNA de espermatozoides de salmão, ou uma solução que compreende 50 % de formamida, 5x de SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato de trissódio), 0,02 % de dodecil sulfato de sódio, 0,1 % de N-lauroilsarcosina e 2 % de reagente de bloqueio (Roche Diagnostics GmbH), seguido de lavagem dos filtros duas vezes por 5 a 15 minutos em 2x SSC e 0,1 % de SDS à temperatura ambiente e, então, lavagem de duas vezes por 15-30 minutos em 0,5x SSC e 0,1 % de SDS ou 0,1x SSC e 0,1 % de SDS a 65-68 °C.

[0030] A presente invenção é particularmente direcionada ao uso de enzimas heterólogas que têm atividade de C-8 esterol isomerase como definido no presente documento em um processo para produção de 7-DHC, um intermediário para vitamina D3. De preferência, as enzimas modificadas da presente invenção são introduzidas e/ou expressas em uma célula hospedeira adequada, como levedura, em particular, uma célula de levedura produtora de colesterol, como selecionado a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* spp., *Pichia* spp., *Kluyveromyces* spp., *Hansenula* spp. ou *Yarrowia lipolytica*, de preferência, *S. cerevisiae*. O hospedeiro modificado é usado para produção de 7-DHC, que pode ser adicionalmente convertido em vitamina D3 e/ou 25-hidroxivitamina D3.

[0031] Uma célula hospedeira adequada pode ser

adicionalmente modificada para aumentar adicionalmente a produção de 7-DHC, um intermediário importante para a biossíntese de vitamina D3 e/ou reduzir o acúmulo de produtos colaterais.

[0032] Assim, em uma modalidade, a invenção é direcionada a uma cepa de levedura que tem atividade de C-8 modificada e, adicionalmente, em que ERG5 e ERG6 são inativadas. A célula de levedura pode ser adicionalmente modificada através da expressão de uma enzima heteróloga que tem atividade de C24-redutase, particularmente selecionada a partir de EC 1.3.1.72, como uma C24-redutase heteróloga que está ativa em colest-7,24-dienol, zimosterol ou trienol (por exemplo, colest-5,7,25-trienol), de preferência, uma esterol Δ 24-redutase de planta ou vertebrado, com mais preferência, a partir de fonte de vertebrados, ainda com mais preferência, a partir de ser humano, porco, cão, camundongo, rato, cavalo, *Danio rerio* ou qualquer fonte conhecida, desde que possa ser expressa dentro da dita célula de levedura. Com máxima preferência, a esterol Δ 24-redutase é selecionada a partir de *Danio rerio*, rato ou ser humano. As sequências que expressam as ditas enzimas esterol Δ 24-redutase estão publicamente disponíveis, incluindo, porém sem limitação, sequências de polipeptídeos derivadas de UniProtKB/Swiss-Prot referência Q15392, Q60HC5, Q8VCH6, Q5BQE6, Q39085 ou P93472 (consulte, por exemplo, o documento WO2003064650).

[0033] Em uma outra modalidade, a célula hospedeira de acordo com a presente invenção pode ser adicionalmente modificada através da introdução de homólogos de enzimas endógenas envolvidas na biossíntese de 7-DHC, como, por

exemplo, C5-esterol desaturase (ERG3), resultando em especificidade e/ou produtividade aumentadas de 7-DHC com acúmulo reduzido de produtos colaterais ou intermediários de vitamina D3, incluindo porém sem limitação, zimosterol, lanosterol e/ou latosterol. De preferência, a célula hospedeira modificada como definido no presente documento compreende uma ERG3 heteróloga, em que a ERG3 é, de preferência, selecionada a partir de *Pichia pastoris* (sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - C4QY87; SEQ ID NO:14) ou *Schizosaccharomyces pombe* (sequência de polipeptídeos derivada de UniProtKB - O94457).

[0034] Em uma modalidade adicional, a célula hospedeira de acordo com a presente invenção pode ser adicionalmente modificada na atividade de esteroil aciltransferase, particularmente atividade de isoforma de esteroil aciltransferase Are1p e/ou Are2p, particularmente Are1p, compreendendo uma ou mais substituições (ou substituição) de aminoácidos em (uma) posição (ou posições) que correspondem aos resíduos selecionados a partir de 592 e/ou 595 no polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO:12.

[0035] Em uma modalidade particular, a invenção se refere a um processo para aprimorar uma célula de levedura para produção de 7-DHC, em que uma célula hospedeira modificada como definido no presente documento, isto é, que expressa um homólogo de ERG2 como definido no presente documento, por exemplo, através da introdução de uma, duas ou mais cópias de enzimas isomerase como definido no presente documento, em particular, célula de levedura produtora de colesterol, de preferência, uma célula de levedura em que ERG5 e ERG6 são inativadas e em que opcionalmente uma enzima heteróloga que

tem atividade de C-24-redutase como definido no presente documento é expressa e/ou em que ARE1 e/ou ARE1 são modificadas como descrito no presente documento e/ou em que opcionalmente homólogos de ERG3 são expressos, em que a célula hospedeira é aprimorada de modo que a porcentagem de 7-DHC na quantidade total de esterol produzido pela dita célula hospedeira seja aumentada para cerca de pelo menos 80 %, em particular, em que a razão entre 7-DHC e produtos colaterais incluindo colest-8-enol é aumentada em pelo menos 1,1 vezes e em comparação com uma cepa de levedura não modificada como definido no presente documento, isto é, que expressa apenas a atividade de ERG2 (endógena) do tipo selvagem.

[0036] Em uma modalidade particular, a invenção se refere a um processo para aprimorar uma célula de levedura para produção de 7-DHC, em que, em particular, uma célula de levedura produtora de colesterol, como uma célula de levedura em que ERG5 e ERG6 são inativadas e em que opcionalmente uma enzima heteróloga que tem atividade de C-24-redutase como definido no presente documento é expressa, a dita célula de levedura que expressa um homólogo de ERG2 como definido no presente documento, por exemplo, através de introdução de uma, duas ou mais cópias de enzimas desaturase como definido no presente documento, em que a célula de levedura é aprimorada de modo que a porcentagem de 7-DHC, na quantidade total de esterol produzido pela dita levedura seja aumentada para pelo menos cerca de 80 %, como, por exemplo, 85, 90, 92, 95, 97 ou até mesmo 100 %, e a porcentagem de produtos colaterais na mistura de esteróis incluindo colest-7-enol, latosterol e/ou colest-8-enol e/ou zimosterol, seja

reduzida para cerca de 20 % ou menos com base nas quantidades totais de esteróis, isto é, uma redução de colest-7-enol, latosterol e/ou colest-8-enol e/ou zimosterol na faixa de pelo menos cerca de 20 % com base nas quantidades totais de esteróis e em comparação com uma cepa de levedura não modificada que expressa a atividade de ERG2 (endógena) do tipo selvagem.

[0037] Em um aspecto, a presente invenção é direcionada a um processo para produção de uma mistura de esteróis que compreende 7-DHC e colest-8-enol em uma célula de levedura produtora de colesterol, em que a razão entre 7-DHC e colest-8-enol na mistura de esteróis é aumentada em pelo menos cerca de 2,4 vezes, como, por exemplo, 2,5, 2,8, 4, 4,5, 5 vezes, a dita célula de levedura produtora de colesterol que expressa uma isomerase heteróloga como definido no presente documento, isto é, um polipeptídeo com pelo menos 41 %, como, por exemplo, pelo menos 44, 45, 48, 49, 53, 56, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 ou até 100 % de identidade com a SEQ ID NO:2, com mais preferência, expressa pelos respectivos polinucleotídeos de códon otimizado como definido no presente documento, como, de preferência, obteníveis a partir de *Ustilago maydis*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe* ou *Saccharomyces cerevisiae*, como, de preferência, obteníveis a partir de *Ustilago maydis* ou *Saccharomyces cerevisiae*.

[0038] Em um aspecto, a presente invenção é direcionada a um processo para produção de uma mistura de esteróis que compreende 7-DHC e uma mistura de colest-7-enol (latosterol) e/ou lanosterol em uma célula de levedura produtora de colesterol, em que a razão entre 7-DHC e lano-

/latosterol na mistura de esteróis é aumentada em pelo menos cerca de 1,1 vezes, como pelo menos cerca de 1,3 vezes, a dita célula de levedura produtora de colesterol que expressa uma isomerase (heteróloga) como definido no presente documento, isto é, um polipeptídeo com pelo menos 41 %, como, por exemplo, pelo menos 44, 45, 48, 49, 53, 56, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 ou até 100 % de identidade com a SEQ ID NO:6, com mais preferência, expressa pelos respectivos polinucleotídeos de códon otimizado como definido no presente documento, como, de preferência, obteníveis a partir de *Ustilago maydis* ou *Schizosaccharomyces pombe*, particularmente a partir de *Ustilago maydis*.

[0039] Em um aspecto adicional, a presente invenção é direcionada a um processo para produção de uma mistura de esteróis que compreende 7-DHC e zimosterol em uma célula de levedura produtora de colesterol, em que a razão entre 7-DHC e zimosterol na mistura de esteróis é aumentada em pelo menos cerca de 1,2 vezes, a dita célula de levedura produtora de colesterol que expressa uma isomerase (heteróloga) como definido no presente documento, isto é, um polipeptídeo com pelo menos 41 %, como, por exemplo, pelo menos 44, 45, 48, 49, 53, 56, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 ou até 100 % de identidade com a SEQ ID NO:6, com mais preferência, expressa pelos respectivos polinucleotídeos de códon otimizado como definido no presente documento, como, de preferência, obteníveis a partir de *Ustilago maydis*.

[0040] Em uma modalidade particular, a presente invenção é direcionada a um processo para produção de uma mistura de esteróis que compreende 7-DHC, zimosterol, colest-8-enol, lano- ou latosterol em uma célula de levedura produtora de

colesterol, em que a porcentagem de 7-DHC é aumentada em pelo menos cerca de 5, 8, 10, 20, 30 % em comparação com zimosterol, colest-8-enol e lano- ou latosterol com base na quantidade total de esteróis, em que a dita célula de levedura produtora de colesterol expressa uma isomerase heteróloga como definido no presente documento, isto é, um polipeptídeo com pelo menos 41 %, como, por exemplo, pelo menos 44, 45, 48, 49, 53, 56, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 ou até 100 % de identidade com a SEQ ID NO:6, com mais preferência, expressa pelos respectivos polinucleotídeos de códon otimizado como definido no presente documento, como, de preferência, obteníveis a partir de *Ustilago maydis*.

[0041] Como usado no presente documento, um aumento na porcentagem de 7-DHC dentro de uma mistura de esteróis é definido como a quantidade de 7-DHC produzido por uma célula hospedeira que expressa um polipeptídeo heterólogo que tem atividade de isomerase como definido no presente documento em comparação com uma célula hospedeira com expressão apenas de C-8 esterol isomerase endógena, como, por exemplo, expressa por ERG2. Ao usar a dita célula hospedeira, por exemplo, levedura, em particular, célula de levedura produtora de colesterol, em um processo de produção de esterol, a porcentagem de 7-DHC pode ser aumentada para cerca de 80 % ou mais, de preferência, como 85, 90, 92, 95, 97 ou até 100 % com base na quantidade total de esteróis e para cerca de até 4,5 vezes em comparação com a porcentagem de um colest-8-enol dentro da quantidade total de esteróis produzido pela dita célula hospedeira. Como usado no presente documento, "expressão de um homólogo de ERG2" inclui a expressão de extracópias de polipeptídeos de ERG2 endógeno,

isto é, expressão de duas ou mais cópias de ERG2.

[0042] Em uma modalidade particular, a invenção é direcionada a um processo para a produção de uma mistura de esteróis em que uma célula de levedura como descrito anteriormente é usada e em que a porcentagem de colest-8-enol e/ou zimosterol e/ou lanosterol e/ou latosterol presentes na dita mistura de esteróis é reduzida, isto é, está na faixa de cerca de 2, 4, 5, 8, 10, 15, 20 % ou menos com base na quantidade total de esteróis, isto é, levando à maior razão de 7-DHC na mistura de esteróis.

[0043] Uma célula hospedeira modificada, que é capaz de expressar os homólogos de ERG2 como definido no presente documento, e genes adicionais necessários para a biossíntese de precursores e/ou intermediários de vitamina D3, é usada em um processo para produção de precursor de vitamina D3 7-DHC. A célula hospedeira modificada pode ser cultivada em um meio aquoso suplementado com nutrientes apropriados sob condições aeróbicas ou anaeróbicas e como conhecido pela pessoa versada para as respectivas células hospedeiras produtoras de colesterol. Opcionalmente, tal cultivo é na presença de proteínas e/ou cofatores envolvidos na transferência de elétrons, como conhecido na técnica. O cultivo/crescimento da célula hospedeira pode ser conduzido na batelada, batelada alimentada, modo semicontínuo ou contínuo. Dependendo da célula hospedeira, de preferência, a produção de vitamina D3 e precursores da mesma, como 7-DHC, pode variar, como é conhecido pela pessoa versada. O cultivo e o isolamento de 7-DHC e outros intermediários na produção de vitamina D3 são descritos, por exemplo, nos documentos WO2011067144 ou WO2017108799.

[0044] Com o uso de uma célula hospedeira como descrito no presente documento, a produtividade/especificidade de atividade de C-8 esterol isomerase pode ser deslocada para 7-DHC, levando a uma razão de pelo menos 80 % de 7-DHC nos esteróis totais produzidos pela dita célula hospedeira, com títulos de até cerca de 12-15 g/l de 7-DHC produzidos após 100 h de fermentação sob condições de cultura adequadas.

[0045] Os termos "ERG5" e "Erg5p" ou "ERG6" e "Erg6p" são usados intercambiavelmente no presente documento e se referem a um polipeptídeo codificado pelos respectivos genes *erg3*, *erg5* e *erg6*.

[0046] Os genes que codificam ERG5, ERG6, ERG2, ERG3, ARE1, ARE2 ou esterol Δ 24-redutase (ERG4), cultivo e engenharia genética da célula de levedura como usado no presente documento são conhecidos e descritos, por exemplo, no documento US 7608421.

[0047] Como usado no presente documento, os termos "C-24-redutase" ou " Δ 24-redutase" são usados intercambiavelmente no presente documento. Em levedura, essa enzima é codificada por *erg4* e está ativa no grupo metila do átomo de carbono na posição 24. Trienol, que não exhibe tal grupo metila na dita posição, não é, portanto, um substrato aceitável para a levedura ERG4.

[0048] Os termos "C-5 esterol desaturase", "enzima que tem atividade de C-5 esterol desaturase" são usados intercambiavelmente no presente documento e se referem a enzimas que são capazes de catalisar a conversão de colest-8-enol em colest-7,24-dienol e/ou colest-7-enol em colest-5,7,24-trienol e/ou 7-DHC. Em levedura, essa enzima é codificada por *erg3*. Um homólogo de ERG3 preferencial a

ser usado em uma célula hospedeira modificada de acordo com a presente invenção é um polipeptídeo que tem pelo menos 45 %, como, por exemplo, pelo menos 50, 52, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 ou até 100 % de identidade com a SEQ ID NO:14 que mostra atividade de C-5 esterol desaturase que pode ser codificada por um polinucleotídeo de acordo com a SEQ ID NO:15 obtível a partir de *Pichia pastoris* ou *Schizosaccharomyces pombe*. Particularmente, 1 ou mais cópias, como pelo menos 1, 2, 3, 5, do dito homólogo de ERG3 são expressas em uma célula hospedeira modificada como definido no presente documento.

[0049] Como usado no presente documento, o termo "atividade específica" ou "atividade" em relação às enzimas significa sua atividade catalítica, isto é, sua habilidade de catalisar a formação de um produto a partir de um determinado substrato. A atividade específica define a quantidade de substrato consumida e/ou produto produzido em um determinado período de tempo e por quantidade definida de proteína em uma temperatura definida. Tipicamente, a atividade específica é expressa em μmol de substrato consumido ou produto formado por min por mg de proteína. Tipicamente, $\mu\text{mol}/\text{min}$ é abreviado por U (= unidade). Portanto, as definições de unidade para atividade específica de $\mu\text{mol}/\text{min}/(\text{mg de proteína})$ ou $\text{U}/(\text{mg de proteína})$ são usadas de modo intercambiável ao longo desse documento. Uma enzima está ativa, se realizar sua atividade catalítica *in vivo*, isto é, dentro da célula hospedeira como definido no presente documento ou dentro de um sistema adequado (livre de célula) na presença de um substrato adequado. A pessoa versada sabe como medir a atividade de enzima, como, por exemplo, por

HPLC.

[0050] Em relação à presente invenção, entende-se que os organismos, como, por exemplo, microrganismos, fungos, algas ou plantas, incluem também sinônimos ou basônimos de tais espécies que têm as mesmas propriedades fisiológicas, como definido pelo Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas ou pelo Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas (Código de Melbourne).

[0051] Em particular, a presente invenção apresenta as presentes modalidades:

[0052] (1) Uma célula de levedura produtora de colesterol como definido no presente documento que compreende uma enzima que tem atividade de C8-esterol isomerase, em que a dita célula de levedura produz uma mistura de esteróis que compreende pelo menos cerca de 80 % de 7-desidrocolesterol (7-DHC), de preferência, compreendendo pelo menos cerca de 82, 85, 88, 90, 92, 95, 97, 98 ou até 100 % de 7-DHC com base na quantidade total de esteróis.

[0053] (2) Uma célula de levedura produtora de colesterol como definido no presente documento e como de (1), em que a razão entre 7-DHC e colest-8-enol está na faixa de 20.

[0054] (3) Uma célula de levedura produtora de colesterol como definido no presente documento e de (1), em que a razão entre 7-DHC e colest-8-enol é aumentada em pelo menos 2 vezes.

[0055] (4) Uma célula de levedura produtora de colesterol como definido no presente documento ou como de (1), (2), (3), expressando uma enzima heteróloga que tem

atividade de C8-esterol isomerase com pelo menos 42 %, como, por exemplo, pelo menos 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 75, 80, 90, 92, 95, 98 ou até 100 % de identidade com o polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO:6.

[0056] (5) Uma célula de levedura produtora de colesterol como definido no presente documento e como de (4) expressando uma enzima heteróloga que tem atividade de C8-esterol isomerase, em que a dita enzima é selecionada a partir do grupo que consiste em *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia*, como *Y. lipolytica*, *Klyveromyces*, como *K. lactis*, *Schizosaccharomyces*, como *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia*, como *P. pastoris*, *Candida*, como *C. albicans*, *Penicillium*, como *P. roqueforti*, *Aspergillus*, como *A. nidulans*, *Cryptococcus*, como *C. neoformans*, *Magneporte*, como *Magneporte oryzae*, *Metarhizium*, como *Metarhizium acridum* e *Ustilago*, como *Ustilago maydis*.

[0057] (6) Uma célula de levedura produtora de colesterol como definido acima e de (1), (2), (3), (4), (5), em que *ERG5* e *ERG6* são inativados.

[0058] (7) Uma célula de levedura produtora de colesterol como definido no presente documento e como de (1), (2), (3), (4), (5), (6), em que a célula de levedura expressa uma enzima heteróloga selecionada a partir de EC 1.3.1.72 que tem atividade de esterol $\Delta 24$ -redutase, de preferência, em que a enzima heteróloga é originada de planta ou vertebrado, com mais preferência, originada de humano, porco, cão, camundongo, rato, cavalo ou *Danio rerio*.

[0059] (8) Uma célula de levedura produtora de colesterol como definido no presente documento ou como de (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), em que a célula de levedura

expressa uma enzima heteróloga que tem atividade de C5-desaturase, de preferência, em que a enzima heteróloga é obtenível a partir de *Pichia pastoris*, com mais preferência, a partir de um polipeptídeo que tem pelo menos 45 %, como, por exemplo, pelo menos 50, 52, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 ou até 100 % de identidade com a SEQ ID NO:14.

[0060] 9. Uso de uma célula de levedura produtora de colesterol como definido no presente documento e como de (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8) para produção de esteróis, de preferência, para a produção de precursores de vitamina D3, com mais preferência, para a produção de 7-DHC.

[0061] (10) Uso de uma célula de levedura produtora de colesterol como definido no presente documento ou como de (9), em que o 7-DHC é adicionalmente convertido em vitamina D3.

[0062] (11) Uso como definido no presente documento e de (9), (10), em que o 7-DHC é adicionalmente convertido em 25-hidroxivitamina D3.

[0063] (12) Um processo para reduzir a quantidade de colest-8-enol em uma mistura de esteróis produzida por uma célula de levedura, em que o dito processo compreende expressão de uma enzima heteróloga que tem atividade de C8-esterol isomerase, em que a dita enzima é selecionada a partir do grupo que consiste em *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia*, como *Y. lipolytica*, *Klyveromyces*, como *K. lactis*, *Schizosaccharomyces*, como *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia*, como *P. pastoris*, *Candida*, como *C. albicans*, *Penicillium*, como *P. roqueforti*, *Aspergillus*, como *A. nidulans*, *Cryptococcus*, como *C. neoformans*, *Magneporte*, como *Magneporte oryzae*, *Metarhizium*,

como *Metarhizium acridum* e *Ustilago*, como *Ustilago maydis*, de preferência, selecionada a partir de *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* ou *Saccharomyces cerevisiae*.

[0064] (13) Um processo para a produção de uma mistura de esteróis, de preferência, um precursor de vitamina D3, com mais preferência, uma mistura de esteróis com pelo menos 80 % de 7-DHC, em uma célula de levedura que compreende:

(a) inativação de ERG5 e ERG6,

(b) expressão de uma enzima heteróloga selecionada a partir de EC 1.3.1.72 que tem atividade de esterol Δ 24-redutase em colest-7,24-dienol, zimosterol ou trienol, de preferência, esterol Δ 24-redutase de planta ou vertebrado, com mais preferência, esterol Δ 24-redutase de vertebrado,

(c) expressão de uma enzima heteróloga que tem atividade de C8-esterol isomerase, em que a dita enzima é selecionada a partir do grupo que consiste em *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia*, como *Y. lipolytica*, *Klyveromyces*, como *K. lactis*, *Schizosaccharomyces*, como *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia*, como *P. pastoris*, *Candida*, como *C. albicans*, *Penicillium*, como *P. roqueforti*, *Aspergillus*, como *A. nidulans*, *Cryptococcus*, como *C. neoformans*, *Magneporte*, como *Magneporte oryzae*, *Metarhizium*, como *Metarhizium acridum* e *Ustilago*, como *Ustilago maydis*, de preferência, selecionada a partir de *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* ou *Saccharomyces cerevisiae*,

(d) cultivo da dita célula de levedura sob condições adequadas para produção de esterol;

em que a razão entre 7-DHC e colest-8-enol presentes

na mistura de esteróis é maior que 8,7.

[0065] Os exemplos a seguir são ilustrativos somente e não se destinam a limitar o escopo da invenção de modo algum.

Exemplos

Exemplo 1: Métodos gerais, cepas e plasmídeos

[0066] Todos os procedimentos de biologia molecular básica e manipulação de DNA descritos no presente documento foram, em geral, realizados de acordo com Sambrook *et al.* (1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Nova York) ou Ausubel *et al.* (1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: Nova York). Os genótipos dos plasmídeos e cepas *S. cerevisiae* usados são listados nas Tabelas 1 e 2. A cepa Y2159 produtora de 7-DHC de *Saccharomyces cerevisiae* foi construída como descrito no Exemplo 4. Todas as cepas listadas são MAT α .

Tabela 1: Cepas *Saccharomyces cerevisiae*.

Y2159	<i>erg5</i> Δ :: <i>PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6</i> Δ :: <i>TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4</i> Δ :: <i>PGK1p-Scer-are1</i> <i>G595D-CYC1t-LEU2</i> <i>TDH3p-tHMG1</i>	Consulte o Exemplo 4
	<i>erg5</i> Δ :: <i>PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6</i> Δ :: <i>TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4</i> Δ :: <i>PGK1p-Scer-are1</i> <i>G595D-CYC1t-LEU2</i> <i>TDH3p-tHMG1</i> <i>INT59::HSP26p-S. cerevisiae-ERG2-TDH3t-NAT^R</i>	Construto de inserção direcionada no locus INT59
	<i>erg5</i> Δ :: <i>PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6</i> Δ :: <i>TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4</i> Δ :: <i>PGK1p-Scer-are1</i> <i>G595D-CYC1t-LEU2</i> <i>TDH3p-tHMG1</i> <i>INT59::HSP26p-U. maydis-ERG2-TDH3t-NAT^R</i>	Construto de inserção direcionada no locus INT59

	<i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1 erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3 erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1 INT59:: HSP26p-C. albicans-ERG2-TDH3t-NAT^R</i>	Construto de inserção direcionada no locus INT59
	<i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1 erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3 erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2 TDH3p-tHMG1 INT59:: HSP26p-S. pombe-ERG2-TDH3t-NAT^R</i>	Construto de inserção direcionada no locus INT59

Tabela 2: plasmídeos usados para clonagem de homólogos de ERG2.

Plasmídeo	Cadeia principal	Inserção	Oligos ou fonte
pMB7677	pMB7621	<i>S. cerevisiae-ERG2</i>	Fragmento sintetizado
pMB7732	pMB7621	<i>U. maydis-ERG2</i>	Fragmento sintetizado
pMB7683	pMB7621	<i>C. albicans-ERG2</i>	Fragmento sintetizado
pMB7681	pMB7621	<i>S. pombe-ERG2</i>	Fragmento sintetizado

Exemplo 2: Clonagem de vários homólogos de ERG2 em *S. cerevisiae* Y2159

[0067] Todos os cassetes de ERG2 foram construídos da seguinte forma. Os quadros de leitura aberta foram otimizados por códon com base na sequência de aminoácidos deduzida e sintetizados com sítios 5'-XbaI (TCTAGAACAAAatg...) e sítios 3'-PstI). Esses foram clonados pela inserção de fragmentos de ERG2 digerido por XbaI-PstI em pMB7621 digerido por XbaI-PstI, que permite o direcionamento para locus intergênico INT59 no cromossomo XI entre os genes SRP40 e PTR2 (cerca da posição 615.000).

[0068] Além de *S. cerevisiae* ERG2 (SEQ ID NO:1; plasmídeo pMB7677), os genes sintetizados compreendem homólogos de ERG2 (otimizados por códon) a partir de *Ustilago maydis* (SEQ ID NO:9; plasmídeo pMB7732), *Candida albicans* (SEQ ID NO:10; plasmídeo pMB7683), e *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO:11; plasmídeo pMB7681), consulte a listagem de sequências.

[0069] Para testar o impacto dos diferentes genes de ERG2 na produção de 7-DHC, a cepa Y2159 foi transformada com quatro fragmentos gerados por SfiI diferentes, que representam uma das quatro espécies detalhadas acima, no locus INT59 com o uso de resistência à nourseotricina (NatR) como um marcador selecionável, e o promotor de HSP26 constitutivo forte como um elemento de controle.

[0070] Os transformantes foram selecionados em YPD ágar com 200 mg/l de nourseotricina após 3 dias a 30 °C. As cepas resultantes dessas transformações são listadas na Tabela 1 acima. Essas cepas foram subsequentemente testadas em relação a sua produtividade de 7-DHC e pureza de 7-DHC esterol geral como descrito abaixo.

Exemplo 3: Análise de HPLC de esteróis a partir de cepas transformadas

[0071] As cepas foram cultivadas da seguinte forma. As cepas a serem testadas foram inicialmente colocadas em placa em YPD ágar e incubadas por 48 horas a 30 °C. Duas pré-culturas de YPD em milímetros foram inoculadas a partir dessas placas e crescidas em uma roda de rolo por 24 horas a 30 °C. Em uma placa de microtitulação de 24 poços, 0,8 ml de YPD + 10 g/l de etanol foram inoculados a partir da pré-cultura para um OD₆₀₀ final de 0,5. As placas de

microtitulação foram crescidas a 30 °C em um ambiente umidificado e com agitação a 800 rpm em um agitador com uma órbita de 3 mm. Em 24 e 48 horas pós-inoculação, 16 µl de etanol foram adicionados a cada poço como uma alimentação. Em 72 horas pós-inoculação, as células foram amostradas quanto ao teor de esterol.

[0072] Os esteróis das culturas foram extraídos e avaliados da seguinte forma. Oitenta microlitros de caldo integral foram pipetados em um tubo de Precellys de 2 ml com esferas de vidro. Oitocentos microlitros de solução de saponificação (5 % de KOH em etanol) foram adicionados e as amostras foram colocadas em um Homogeneizador Precellys 24 e agitadas a 6500 rpm por 3 ciclos em 15 segundos por ciclo. Sessenta microlitros de ácido acético glacial foram, então, adicionados e os tubos foram centrifugados por 1 minuto na velocidade de topo. O sobrenadante foi avaliado através de HPLC quanto ao teor de esterol. Os resultados são mostrados na Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3: razões entre 7-DHC e zimosterol no controle e cepas portadoras de homólogos de ERG2.

Cepa	Razão entre 7-DHC e zimosterol
SC2159 - parental	22,9
U. maydis ERG2	28,4

Tabela 3: razões entre 7-DHC e colest-8-enol no controle e cepas portadoras de homólogos de ERG2.

Cepa	Razão entre 7-DHC e Colesta-8-enol
SC2159 - parental	8,7
U. maydis ERG2	38,1
C. albicans ERG2	21,9
S. pombe ERG2	21
S. cerevisiae ERG2	24,4

Tabela 4: razões entre 7-DHC e mistura de lanosterol e latosterol no controle e cepas portadoras de homólogos de ERG2.

Cepa	Razão entre 7-DHC e lanosterol/latosterol
SC2159 - parental	12,9
U. maydis ERG2	17,1
S. pombe ERG2	13,6

Exemplo 4: Construção de Y2159

[0073] ARE1 de *S. cerevisiae* do tipo selvagem foi sintetizado por DNA2.0, incorporando um sítio de XbaI na extremidade 5' (TCTAGAACAAAatg...) e um sítio PstI na extremidade 3'. Esse foi clonado em um plasmídeo de deleção de *erg4Δ::Hyg^R* com o uso de sítios únicos de XbaI e PstI. LEU2 foi subsequentemente usado para substituir a fração de HygR através de uma clonagem de KpnI-AgeI. O resultado foi o plasmídeo pHyD459.

[0074] A variante de pMB7584 mutante de ARE1 de *S. cerevisiae* (F592L) foi gerada pela ligação de um produto de PCR clivado por BsrGI-BsaI gerado a partir de ARE1 (oligos de acordo com a SEQ ID NO:16 & 17) com um oligo de fita dupla derivado pelo anelamento de SEQ ID NO:19 e 20 em pHyD459 clivado por BsrGI-PstI. De modo similar, a variante de pMB7585 mutante de ARE1 de *S. cerevisiae* (G595D) foi gerada pela ligação de um produto de PCR clivado por BsrGI-BsaI gerado a partir de ARE1 (oligos de acordo com a SEQ ID NO:16 & 18) com um oligo de fita dupla derivado pelo anelamento de SEQ ID NO:21 e 22 em pHyD459 clivado por BsrGI-PstI. Os oligos bem como as sequências adicionais usadas no presente

documento são listados na Tabela 5.

Tabela 5: plasmídeos usados para construção de mutações de ARE. "Scer" significa *Saccharomyces cerevisiae*.

Plasmídeo	Cadeia principal	Inserção	Oligos ou fonte	SEQ ID NO
pHyD459	pHyD445	<i>Scer-ARE1</i>	Inserção de LEU2	
pMB7584	pHyD459	<i>Scer-are1 F592L</i>	MO10013 & MO10014,	16 & 17
			MO10016 & MO10017	19 & 20
pMB7585	pHyD459	<i>Scer-are1 G595D</i>	MO10013 & MO10015	16 & 18

REIVINDICAÇÕES

1. Célula de levedura produtora de colesterol **caracterizada por** compreender uma enzima que tem atividade de C8-esterol isomerase, em que a dita célula de levedura produz uma mistura de esteróis que compreende pelo menos cerca de 80 % de 7-desidrocolesterol (7-DHC), de preferência, que compreende pelo menos cerca de 82, 85, 88, 90, 92, 95, 97, 98 ou até 100 % de 7-DHC com base na quantidade total de esteróis.

2. Célula de levedura produtora de colesterol, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que a razão entre 7-DHC e colest-8-enol está na faixa de cerca de 20.

3. Célula de levedura produtora de colesterol, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que a razão entre 7-DHC e colest-8-enol é aumentada em pelo menos cerca de 2 vezes.

4. Célula de levedura produtora de colesterol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada por** expressar uma enzima heteróloga que tem atividade de C8-esterol isomerase com pelo menos cerca de 42 %, como, por exemplo, pelo menos 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 75, 80, 90, 92, 95, 98 ou até 100 % de identidade com o polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO:6.

5. Célula de levedura produtora de colesterol, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada por** expressar uma enzima heteróloga que tem atividade de C8-esterol isomerase, em que a dita enzima é selecionada a partir do grupo que consiste em *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia*, como *Y. lipolytica*, *Kluyveromyces*, como *K. lactis*,

Schizosaccharomyces, como Schizosaccharomyces pombe, Pichia, como P. pastoris, Candida, como C. albicans, Penicillium, como P. roqueforti, Aspergillus, como A. nidulans, Cryptococcus, como C. neoformans, Magnaporthe, como Magnaporthe oryzae, Metarhizium, como Metarhizium acridum e Ustilago, como Ustilago maydis.

6. Célula de levedura produtora de colesterol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada pelo** fato de que ERG5 e ERG6 são inativadas.

7. Célula de levedura produtora de colesterol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, sendo a célula de levedura **caracterizada por** expressar uma enzima heteróloga selecionada a partir de EC 1.3.1.72 que tem atividade de esterol Δ 24-redutase, de preferência, em que a enzima heteróloga é originada de planta ou vertebrado, com mais preferência, originada de humano, porco, cão, camundongo, rato, cavalo ou *Danio rerio*.

8. Célula de levedura produtora de colesterol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, sendo a célula de levedura **caracterizada por** expressar uma enzima heteróloga que tem atividade de C5-desaturase, de preferência, em que a enzima heteróloga é obtenível a partir de *Pichia pastoris*, com mais preferência, a partir de um polipeptídeo que tem pelo menos cerca de 45 %, como, por exemplo, pelo menos 50, 52, 60, 70, 80, 90, 92, 95, 98 ou até 100 % de identidade com a SEQ ID NO:14.

9. Uso de uma célula de levedura produtora de colesterol conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 **caracterizado por** ser para produção de esteróis, de preferência, para a produção de precursores de vitamina D3,

com mais preferência, para a produção de 7-DHC.

10. Uso de uma célula de levedura produtora de colesterol, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pelo** fato de que 7-DHC é adicionalmente convertido em vitamina D3.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, **caracterizado pelo** fato de que 7-DHC é adicionalmente convertido em 25-hidroxivitamina D3.

12. Processo para reduzir a quantidade de colest-8-enol em uma mistura de esteróis produzida por uma célula de levedura, sendo o dito processo **caracterizado por** compreender a expressão de uma enzima heteróloga que tem atividade de C8-esterol isomerase, em que a dita enzima é selecionada a partir do grupo que consiste em *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia*, como *Y. lipolytica*, *Klyveromyces*, como *K. lactis*, *Schizosaccharomyces*, como *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia*, como *P. pastoris*, *Candida*, como *C. albicans*, *Penicillium*, como *P. roqueforti*, *Aspergillus*, como *A. nidulans*, *Cryptococcus*, como *C. neoformans*, *Magneporte*, como *Magneporte oryzae*, *Metarhizium*, como *Metarhizium acridum* e *Ustilago*, como *Ustilago maydis*, de preferência, selecionada a partir de *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* ou *Saccharomyces cerevisiae*.

13. Processo para a produção de uma mistura de esteróis, de preferência, um precursor de vitamina D3, com mais preferência, uma mistura de esteróis com pelo menos 80 % de 7-DHC, em uma célula de levedura, **caracterizado por** compreender:

(a) inativação de ERG5 e ERG6,

(b) expressão de uma enzima heteróloga selecionada a partir de EC 1.3.1.72 que tem atividade de esterol Δ 24-redutase em colest-7,24-dienol, zimosterol ou trienol, de preferência, esterol Δ 24-redutase de planta ou vertebrado, com mais preferência, esterol Δ 24-redutase de vertebrado,

(c) expressão de uma enzima heteróloga que tem atividade de C8-esterol isomerase, em que a dita enzima é selecionada a partir do grupo que consiste em *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia*, como *Y. lipolytica*, *Klyveromyces*, como *K. lactis*, *Schizosaccharomyces*, como *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia*, como *P. pastoris*, *Candida*, como *C. albicans*, *Penicillium*, como *P. roqueforti*, *Aspergillus*, como *A. nidulans*, *Cryptococcus*, como *C. neoformans*, *Magneporte*, como *Magneporte oryzae*, *Metarhizium*, como *Metarhizium acridum* e *Ustilago*, como *Ustilago maydis*, de preferência, selecionada a partir de *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* ou *Saccharomyces cerevisiae*,

(d) cultivo da dita célula de levedura sob condições adequadas para produção de esterol;

em que a razão entre 7-DHC e colest-8-enol presentes na mistura de esteróis é maior que cerca de 8,7.

RESUMO**"OTIMIZAÇÃO DE ISOMERIZAÇÃO DE C-8 ESTEROL"**

A presente invenção se refere a um método aprimorado para produção de 7-desidrocolesterol (7-DHC), um intermediário importante para produção biotecnológica de vitamina D3 ou derivados/metabólitos da mesma. A invenção apresenta cepas de levedura modificada que expressam enzimas que têm atividade de C-8 esterol isomerase aprimorada levando a razões aumentadas de 7-DHC na mistura de esteróis.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 2020-48156_Secuencias.txt
- Data de Geração do Código: 17/11/2020
- Hora de Geração do Código: 08:54:33
- Código de Controle:
 - Campo 1: A27ECA5291B3934D
 - Campo 2: C531B373716FC201