



\* B R 1 1 2 0 2 1 0 2 2 2 2 3 B 1 \*

**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112021022223-5 B1**

**(22) Data do Depósito:** 04/03/2021

**(45) Data de Concessão:** 26/09/2023

---

**(54) Título:** POLIPEPTÍDEO MODIFICADO, POLINUCLEOTÍDEO, MICRO-ORGANISMO E MÉTODO PARA PRODUZIR L-GLUTAMINA

**(51) Int.Cl.:** C12N 9/00; C12N 15/77; C12P 13/14.

**(30) Prioridade Unionista:** 04/03/2020 KR 10-2020-0027322.

**(73) Titular(es):** CJ CHEILJEDANG CORPORATION.

**(72) Inventor(es):** SU JIN CHOI; IMSANG LEE; HEEYEONG KIM; BYEONG SOO KIM; KWANG WOO LEE.

**(86) Pedido PCT:** PCT KR2021002652 de 04/03/2021

**(87) Publicação PCT:** WO 2021/177731 de 10/09/2021

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 05/11/2021

**(57) Resumo:** POLIPEPTÍDEO MODIFICADO, POLINUCLEOTÍDEO, MICRO-ORGANISMO E MÉTODO PARA PRODUZIR L-GLUTAMINA. A presente invenção se refere a um polipeptídeo modificado de glutamina sintetase com atividade melhorada, e a um método para produzir L-glutamina usando o mesmo. Uma vez que a produção de L-glutamina pode ser aumentada usando o polipeptídeo modificado inédito sem uma diminuição na taxa de crescimento, comparado às cepas tipo selvagem com atividade de glutamina sintetase, o polipeptídeo modificado pode ser amplamente usado para produção em massa de L-glutamina.

## RELATÓRIO DESCRITIVO

### “POLIPEPTÍDEO MODIFICADO, POLINUCLEOTÍDEO, MICRO-ORGANISMO E MÉTODO PARA PRODUZIR L-GLUTAMINA”

#### CAMPO DA TÉCNICA

**[001]** A presente revelação se refere a um polipeptídeo modificado de glutamina sintetase com atividade intensificada, e a um método para produzir L-glutamina usando o mesmo.

#### ANTECEDENTES DA TÉCNICA

**[002]** L-Glutamina é um aminoácido amplamente usado em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentos funcionais saudáveis, tais como agentes terapêuticos para problemas digestivos, intensificadores da função hepática, intensificadores da função cerebral, intensificadores imunológicos, medicações para úlcera estomacal, medicações para alcoolismo, hidratantes cosméticos, suplementos nutricionais para atletas, e suplementos nutricionais para pacientes.

**[003]** *Corynebacterium glutamicum* e *Escherichia coli* têm sido usados como micro-organismos representativos para produção de L-glutamina. Na via de biossíntese de L-glutamina, L-glutamato é produzido por glutamato desidrogenase usando ácido  $\alpha$ -ceto glutâmico, que é produzido por meio de glicólise e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), como um precursor, e L-glutamina é finalmente produzida através de uma reação por meio de glutamina sintetase.

**[004]** Para produção de L-glutamina com uma alta concentração, é muito importante otimizar a expressão de glutamina sintetase e intensificar a atividade desta. Um íon metálico divalente é exigido para a ativação de glutamina sintetase, e a atividade é inibida por glicina, alanina, triptofano, histidina, glucosamina-6-fosfato, citidina-3-fosfato e similares. A atividade também é inibida por adenilação do 405º aminoácido. De acordo com um estudo prévio, foi relatado que a atividade inibida por adenilação foi recuperada substituindo tirosina na 405ª posição por fenilalanina (EP 1229121 B1). Entretanto, ainda existe uma necessidade de desenvolver um método para produzir L-glutamina com alta eficiência.

## **REVELAÇÃO**

### **PROBLEMA DA TÉCNICA**

**[005]** Com este contexto, em função de esforços intensivos para desenvolver micro-organismos com capacidade intensificada de produzir L-glutamina, os presentes inventores descobriram um polipeptídeo modificado de glutamina sintetase capaz de aumentar a produção de L-glutamina, completando assim a presente revelação.

### **SOLUÇÃO TÉCNICA**

**[006]** A presente revelação provê um polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, em que um aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup> ou 404<sup>a</sup> posição de uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 é substituído por um aminoácido diferente.

**[007]** A presente revelação provê um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado.

**[008]** A presente revelação provê um micro-organismo que inclui o polipeptídeo modificado ou o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado.

**[009]** A presente revelação provê um método para produzir L-glutamina, o método incluindo cultivar o micro-organismo da presente revelação em um meio de cultura.

### **EFEITOS VANTAJOSOS DA INVENÇÃO**

**[010]** Quando o polipeptídeo modificado inédito com atividade de glutamina sintetase intensificada de acordo com a presente revelação é usado, a produção de glutamina pode ser aumentada sem uma diminuição na taxa de crescimento, comparada a uma cepa tipo selvagem com atividade de glutamina sintetase e, assim, o polipeptídeo modificado pode ser amplamente usado para a produção em massa de glutamina.

### **MELHOR MODO DA INVENÇÃO**

**[011]** A presente revelação será descrita em detalhes. Ao mesmo tempo, cada descrição e modalidade revelada na presente revelação pode ser aplicada aqui a

diferentes descrições e modalidades. Em outras palavras, todas as combinações de vários componentes revelados na presente revelação são incluídas no escopo da presente revelação. Além disso, o escopo da presente revelação não deve ser limitado pelas descrições aqui providas.

**[012]** Os versados na técnica reconhecerão ou serão capazes de determinar, usando não mais que experimentação de rotina, muitos equivalentes para modalidades específicas da presente revelação. Pretende-se que tais equivalentes sejam incluídos no escopo das reivindicações a seguir.

**[013]** Um aspecto da presente revelação provê uma variante de glutamina sintetase preparada substituindo um aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup> ou 404<sup>a</sup> posição de uma sequência de aminoácido de glutamina sintetase com um aminoácido diferente.

**[014]** Especificamente, o aspecto da presente revelação provê um polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, em que um aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup> ou 404<sup>a</sup> posição de uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 é substituído por um aminoácido diferente.

**[015]** Da maneira aqui usada, o termo “variante”, “polipeptídeo modificado”, ou “proteína modificada (enzima)” pode ser usado indiferentemente.

**[016]** Da maneira aqui usada, o termo “glutamina sintetase” se refere a uma enzima que converte ácido glutâmico e amônia em glutamina na presença de ATP em micro-organismos. Por exemplo, a glutamina sintetase pode ser codificada pelo gene *glnA*, sem ser limitado a este. Em vista dos objetivos da presente revelação, qualquer proteína com a atividade para converter ácido glutâmico e amônia em glutamina pode ser usada, independente da origem desta, e enzimas derivadas de quaisquer organismos (plantas, micro-organismos e similares) podem ser usadas, sem ser limitado a estas. A glutamina sintetase pode ser uma enzima derivada de um micro-organismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* ou uma variante desta, por exemplo, uma enzima derivada de *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*,

*Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens* ou *Corynebacterium stationis*, ou uma variante destas, mas não é limitada a estas.

**[017]** Especificamente, a glutamina sintetase pode apresentar a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido com uma homologia ou identidade de 80% ou mais, e menor que 100%, com a mesma, mas a sequência de aminoácido não é limitada a esta, contanto que a atividade de glutamina sintetase seja assim obtida. Mais especificamente, a glutamina sintetase da presente revelação pode incluir um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de homologia ou identidade com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1. Igualmente, é evidente que qualquer proteína acessória com eliminação, modificação, substituição, ou adição de um ou vários aminoácidos na sequência de aminoácido está no escopo da presente revelação, contanto que a sequência de aminoácido mantenha a homologia ou identidade anteriormente descrita e um efeito equivalente a este da proteína.

**[018]** Da maneira aqui usada, o termo “polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase” ou “variante de glutamina sintetase” se refere a um polipeptídeo com atividade de glutamina sintetase alterada, substituindo uma parte de uma sequência de aminoácido de um polipeptídeo com atividade de glutamina sintetase por um aminoácido diferente. Especificamente, o polipeptídeo modificado pode ser um polipeptídeo modificado com várias sequências com atividade de glutamina sintetase, preparado substituindo um aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup> ou 404<sup>a</sup> posição da sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 por um aminoácido diferente.

**[019]** A “N-ésima posição” pode incluir a N-ésima posição e uma posição de um aminoácido que corresponde à N-ésima posição. Especificamente, a N-ésima posição pode incluir uma posição de aminoácido correspondente de um polipeptídeo com a mesma atividade daquela da proteína alvo. Mais especificamente, a sequência de aminoácido do polipeptídeo com a mesma atividade daquela da proteína alvo pode ser a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido com pelo menos 98% identidade com esta, e a 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup> ou 404<sup>a</sup> posição da

sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 pode incluir uma posição de um aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup> ou 404<sup>a</sup> posição em uma sequência de aminoácido com uma homologia ou identidade de 80% ou mais, e menor que 100%, com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1.

**[020]** A posição de aminoácido que corresponde à N-ésima posição ou a posição de aminoácido correspondente do polipeptídeo, com a mesma atividade daquela da proteína alvo, pode ser determinada usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (documento: Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443–453), especificamente a versão 5.0.0 ou superior, da maneira implementada no programa Needleman do pacote EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, documento: [Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16:276–277]). Os parâmetros usados para os mesmos podem ser uma penalidade de abertura de espaçamento de 10, uma penalidade de extensão de espaçamento de 0,5, e uma matriz de substituição EBLOSUM62 (EMBOSS de versão BLOSUM62).

**[021]** Um resíduo de aminoácido na posição de aminoácido que corresponde à N-ésima posição, ou a posição de aminoácido correspondente do polipeptídeo com a mesma atividade daquela da proteína alvo pode ser determinada por alinhamento de múltiplas sequências de polipeptídeo usando vários programas de computador incluindo, mas sem limitação, MUSCLE (comparação de sequência múltipla por expectativa de log; versão 3.5 ou superior; documento: [Edgar, 2004, *Nucleic Acids Research* 32:1792–1797]), MAFFT (versão 6.857 ou superior; documento: [Kato e Kuma, 2002, *Nucleic Acids Research* 30:3059–3066]; documento: [Kato *et al.*, 2005, *Nucleic Acids Research* 33:511–518]; documento: [Kato e Toh, 2007, *Bioinformatics* 23:372–374]; documento: [Kato *et al.*, 2009, *Methods in Molecular Biology* 537:39–64]; documento: [Kato e Toh, 2010, *Bioinformatics* 26:1899–1900]), e EMBOSS EMMA usando ClustalW (1.83 ou superior; documento: [Thompson *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Research* 22:4673–4680]), usando os respectivos parâmetros padrões destes.

**[022]** Quando uma relação entre polipeptídeos não pode ser detectada por

comparação baseada em sequência convencional (documento: [Lindahl e Elofsson, 2000, *J. Mol. Biol.* 295:613–615]), outros algoritmos de comparação de sequência em pares podem ser usados. Maior sensibilidade na pesquisa baseada em sequência pode ser obtida usando programas de pesquisa que usam representações de probabilidade de famílias de polipeptídeo (perfis) em uma base de dados de pesquisa. Por exemplo, o programa PSI-BLAST gera perfis através um processo de pesquisa de base de dados de repetição, e é capaz de detectar homólogos remotos (documento: [Atschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402]). Mesmo uma alta sensibilidade pode ser obtida quando a família ou superfamília para o polipeptídeo apresenta um ou mais representativos na base de dados da estrutura da proteína. Os programas tais como GenTHREADER (documento: [Jones, 1999, *J. Mol. Biol.* 287:797–815]; e documento: [McGuffin e Jones, 2003, *Bioinformatics* 19:874–881]) utilizam a informação de uma variedade de fontes (PSI-BLAST, previsão de estrutura secundária, perfis de alinhamento estrutural e potenciais de solvatação) como entrada em uma rede neural que prevê a dobra estrutural para uma sequência de consulta. Similarmente, um método revelado em um documento [Gough *et al.*, 2000, *J. Mol. Biol.* 313:903–919] pode ser usado para alinhar uma sequência de uma estrutura desconhecida com os modelos de superfamília presentes na base de dados SCOP. Estes alinhamentos, por sua vez, podem ser usados para gerar uma homologia, similaridade, ou modelo de identidade para o polipeptídeo, e tais modelos podem ser avaliados para precisão usando uma variedade de ferramentas desenvolvidas para este propósito.

**[023]** O “aminoácido diferente” não é particularmente limitado, contanto que o aminoácido seja diferente do aminoácido de cada posição antes da substituição. Especificamente, o aminoácido pode incluir pelo menos um aminoácido selecionado do grupo que consiste em glicina, alanina, arginina, valina, leucina, metionina, isoleucina, treonina, asparagina, glutamina, prolina, serina, triptofano, fenilalanina, histidina, cisteína, tirosina, lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico, mas não é limitado a estes.

**[024]** Os “aminoácidos” são classificados em quatro tipos: aminoácidos acídicos, básicos, polares (hidrofílicos), e não polares (hidrofóbicos), de acordo com propriedades de cadeias laterais.

**[025]** A variante pode ser uma proteína na qual um aminoácido em cada posição da sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 é substituído por pelo menos um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: um aminoácido não polar, por exemplo, glicina (G), alanina (UM), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), metionina (M), fenilalanina (F), triptofano (W) e prolina (P); um aminoácido polar, por exemplo, serina (S), treonina (T), cisteína (C), tirosina (Y), ácido aspártico (D) e glutamina (Q); um aminoácido acídico, por exemplo, asparagina (N) e ácido glutâmico (E); e um aminoácido básico, por exemplo, lisina (K), arginina (R) e histidina (H), sem ser limitado a estes.

**[026]** Especificamente, o aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup> posição pode ser substituído por um aminoácido acídico ou um aminoácido polar, o aminoácido que corresponde à 402<sup>a</sup> posição pode ser substituído por um aminoácido básico, e o aminoácido que corresponde à 404<sup>a</sup> posição pode ser substituído por um aminoácido não polar, sem ser limitado a estes.

**[027]** Mais especificamente, o aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup> posição pode ser substituído por asparagina, ácido glutâmico ou serina, o aminoácido que corresponde à 402<sup>a</sup> posição pode ser substituído por histidina, e o aminoácido que corresponde à 404<sup>a</sup> posição pode ser substituído por valina, sem ser limitado a estes.

**[028]** Na presente revelação, o polipeptídeo modificado, no qual um aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup> ou 404<sup>a</sup> posição da sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 é substituído por um aminoácido diferente, pode apresentar uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2 a 6.

**[029]** Especificamente, um polipeptídeo modificado no qual o aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup> posição é substituído por asparagina pode apresentar a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2, um polipeptídeo modificado no qual o aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup> posição é substituído por ácido glutâmico pode

apresentar a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 3, e um polipeptídeo modificado no qual o aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup> posição é substituído por serina pode apresentar a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 4.

**[030]** Além disso, um polipeptídeo modificado no qual o aminoácido que corresponde à 402<sup>a</sup> posição é substituído por histidina pode apresentar a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5, e um polipeptídeo modificado no qual o aminoácido que corresponde à 404<sup>a</sup> posição é substituído por valina pode apresentar a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6.

**[031]** O polipeptídeo modificado pode ser um polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase e uma homologia de sequência de 80% ou mais, e menor que 100%, com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1, mas não é limitado a estes. Especificamente, o polipeptídeo modificado da presente revelação pode ser um com pelo menos 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de homologia com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1, e é evidente que qualquer proteína que inclui eliminação, modificação, substituição, ou adição de um ou vários aminoácidos na sequência de aminoácido além da substituição na 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup> ou 404<sup>a</sup> posição está no escopo da presente revelação, contanto que a sequência de aminoácido mantenha a homologia descrita anteriormente e um efeito equivalente àquele da proteína.

**[032]** Na presente revelação, embora expressa como uma “proteína com uma sequência de aminoácido da maneira apresentada em uma SEQ ID NO pré-determinada”, é evidente que que proteína que inclui eliminação, modificação, substituição, substituição conservativa, ou adição de um ou vários aminoácidos pode ser usada na presente revelação, contanto que a proteína apresente atividade idêntica ou equivalente àquela da proteína que consiste na sequência de aminoácido do SEQ ID NO. Por exemplo, adição de uma sequência que não altera a função da proteína na direção direta ou reversa da sequência de aminoácido, uma mutação de ocorrência natural, uma mutação silenciosa desta, ou uma substituição conservativa desta não é excluída, contanto que atividade idêntica ou equivalente àquela da proteína seja

obtida, e é evidente que tal adição de sequência ou mutação está no escopo da presente revelação.

**[033]** O polipeptídeo modificado pode incluir um polipeptídeo obtido por substituição conservativa e/ou modificação de pelo menos um aminoácido diferente daquele da sequência citada, mantendo ao mesmo tempo funções ou propriedades da proteína, além da substituição de um aminoácido na posição particular por um aminoácido diferente.

**[034]** Da maneira aqui usada, o termo “substituição conservativa” se refere à substituição de um aminoácido por um outro aminoácido com propriedades estruturais e/ou químicas similares. Cada substituição de aminoácido pode ocorrer em geral com base na similaridade de polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e/ou natureza anfipática de um resíduo. Em geral, a substituição conservativa apresenta pouca ou nenhuma influência na atividade de uma proteína ou um polipeptídeo.

**[035]** Igualmente, variantes com pelo menos aminoácido modificado, além do aminoácido na posição descrita anteriormente, podem apresentar eliminação ou adição de aminoácidos que apresentam influência mínima em propriedades, e uma estrutura secundária do polipeptídeo. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser conjugado com uma sequência sinal (ou líder) da terminação N de uma proteína que direciona cotraducionalmente ou pós-traducionalmente a transferência da proteína. Além disso, o polipeptídeo pode ser conjugado com uma outra sequência ou ligante para identificar, purificar, ou sintetizar o polipeptídeo.

**[036]** Além disso, o polipeptídeo modificado pode incluir uma sequência de aminoácido com a modificação anteriormente descrita de SEQ ID NO: 1, e/ou tanto a modificação de SEQ ID NO: 1 quanto uma homologia ou identidade de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% ou mais, além da posição de modificação. Isto é, o polipeptídeo pode incluir uma sequência de aminoácido com uma homologia de 80% ou mais, e menor que 100%, com uma das sequências de SEQ ID NOS: 2 a 6, mas não é limitado a este. Especificamente, o polipeptídeo modificado da presente

revelação pode incluir uma sequência de aminoácido com uma homologia ou identidade de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% ou mais com uma das sequências de SEQ ID NOS: 2 a 6. A modificação de SEQ ID NO: 1 é da maneira descrita anteriormente, e a homologia ou identidade desta pode ser homologia ou identidade em uma posição sem ser a modificação descrita anteriormente.

**[037]** Em vista dos objetivos da presente revelação, a atividade do polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase pode ser intensificada, comparada àquela de um tipo selvagem. Especificamente, a atividade de glutamina sintetase pode ser aumentada e intensificada, comparada à tipo selvagem de SEQ ID NO: 1.

**[038]** Da maneira aqui usada, o termo “intensificação” da atividade do polipeptídeo se refere a um aumento na atividade do polipeptídeo, comparada à atividade intrínseca. A intensificação pode ser usada indiferentemente com ativação, suprarregulação, superexpressão, aumento e similares. Em relação a isso, a ativação, intensificação, suprarregulação, superexpressão e aumento podem incluir todas aquelas que exibem atividade que não possuíam originalmente, ou que exibem melhor atividade comparada à atividade intrínseca ou atividade antes de modificação. A “atividade intrínseca” se refere a atividade de um polipeptídeo particular originalmente presente em uma cepa parental ou micro-organismo não modificado antes da transformação, quando o micro-organismo é transformado por modificação genética causada por um fator natural ou artificial. Este termo pode ser usado indiferentemente com “atividade antes da transformação”. A “intensificação”, “suprarregulação”, “superexpressão” ou “aumento” de atividade de um polipeptídeo, comparada à atividade intrínseca, significa que a atividade e/ou concentração (nível de expressão) de um polipeptídeo particular é melhorada, comparada àquela originalmente presente em uma cepa parental ou micro-organismo não modificado, antes da transformação.

**[039]** A intensificação pode ser atingida pela introdução de um polipeptídeo externo, ou intensificação e/ou concentração de atividade (nível de expressão) do polipeptídeo intrínseco. A intensificação da atividade do polipeptídeo pode ser identificada com base no aumento do grau de atividade, no nível de expressão do

polipeptídeo, ou na quantidade de um produto liberado a partir do polipeptídeo.

**[040]** A intensificação do polipeptídeo pode ser obtida aplicando vários métodos bem conhecidos na técnica, e os métodos não são limitados, contanto que a atividade do polipeptídeo alvo seja melhorada, comparada àquela do micro-organismo antes da modificação. Especificamente, qualquer método de engenharia genética e/ou engenharia proteica bem conhecido na técnica como métodos de rotina de biologia molecular pode ser usado, sem ser limitado a estes (por exemplo, Sitnicka *et al.* Functional Analysis of Genes. *Advances in Cell Biology*. 2010, Vol. 2. 1–16, Sambrook *et al.* *Molecular Cloning* 2012, *etc.*).

**[041]** Especificamente, a intensificação do polipeptídeo da presente revelação pode ser atingida por:

- 1) aumento no número de cópia de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo nas células;
- 2) substituição de uma região regulatória da expressão de gene em um cromossomo que codifica o polipeptídeo com uma sequência com maior atividade;
- 3) modificação de uma sequência de nucleotídeo que codifica um códon de iniciação ou região 5'-UTR de uma transcrição de gene que codifica o polipeptídeo;
- 4) modificação de uma sequência de aminoácido do polipeptídeo para intensificar a atividade do polipeptídeo;
- 5) modificação de uma sequência de nucleotídeo que codifica o polipeptídeo para intensificar a atividade do polipeptídeo (por exemplo, modificação de uma sequência de nucleotídeo de um gene de polipeptídeo para codificar um polipeptídeo modificado com atividade intensificada do polipeptídeo);
- 6) introdução de um polipeptídeo externo que exibe a atividade do polipeptídeo ou um polinucleotídeo externo que codifica o mesmo;
- 7) otimização de códon de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo;
- 8) modificação ou modificação química de uma região exposta selecionada analisando uma estrutura tridimensional do polipeptídeo; ou
- 9) qualquer combinação de pelo menos dois selecionados de 1) a 8)

anterior, sem ser limitado a estes.

**[042]** Mais especificamente, o aumento no número de cópia de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo nas células de 1) pode ser atingido pela introdução de um vetor, que pode replicar e funcionar independentemente de um hospedeiro, e é operavelmente ligado a um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo em uma célula hospedeira. Alternativamente, isto pode ser atingido introduzindo uma cópia, ou duas ou mais cópias, do polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo no cromossomo em uma célula hospedeira. A introdução do cromossomo pode ser realizada introduzindo o vetor capaz de inserir o polinucleotídeo no cromossomo do hospedeiro na célula hospedeira, mas não é limitada a isto. O vetor é da maneira descrita anteriormente.

**[043]** A substituição de uma região regulatória de expressão de gene (ou sequência regulatória de expressão) em um cromossomo que codifica o polipeptídeo com uma sequência com maior atividade de 2) pode ser, por exemplo, mutação na sequência por eliminação, inserção, substituição não conservativa, substituição conservativa, ou qualquer combinação destas para intensificar adicionalmente a atividade da região regulatória de expressão, ou substituição por uma sequência com maior atividade. A região regulatória de expressão pode incluir, mas sem limitação, um promotor, uma sequência operadora, uma sequência que codifica um sítio de ligação ao ribossomo, e uma sequência que regula a finalização de transcrição e tradução. Por exemplo, a substituição pode ser substituição de um promotor intrínseco por um promotor mais forte, mas não é limitada a esta.

**[044]** Exemplos do promotor mais forte conhecido na técnica pode incluir os promotores CJ1 a CJ7 (patente U.S. 7662943 B2), promotor lac, promotor trp, promotor trc, promotor tac, promotor PR do fago Lambda, promotor PL, promotor tet, promotor gapA, promotor SPL7, promotor SPL13(sm3) (patente U.S 10584338 B2), promotor O2 (patente U.S 10273491 B2), promotor tkt e promotor yccA, mas não são limitados a estes.

**[045]** A modificação de uma sequência de nucleotídeo que codifica um códon de

iniciação ou região 5'-UTR de uma transcrição de gene que codifica o polipeptídeo de 3) pode ser, por exemplo, substituição por uma sequência de nucleotídeo que codifica um outro códon de iniciação com um nível de expressão do polipeptídeo maior que um códon de iniciação intrínseco, mas não é limitada a esta.

**[046]** A modificação de uma sequência de aminoácido ou uma sequência de polinucleotídeo de 4) e 5) pode ser modificação na sequência de aminoácido do polipeptídeo, ou a sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo por eliminação, inserção, substituição não conservativa, substituição conservativa, ou qualquer combinação destas para intensificar a atividade do polipeptídeo, ou substituição por uma sequência de aminoácido ou uma sequência de polinucleotídeo modificada para apresentar maior atividade, ou uma sequência de aminoácido ou uma sequência de polinucleotídeo modificada para aumentar a atividade, mas não é limitada a estas. A substituição pode ser realizada inserindo o polinucleotídeo no cromossomo, especificamente por recombinação homóloga, mas não é limitada a esta. No caso, um vetor usado pode incluir adicionalmente um marcador de seleção para identificar a inserção no cromossomo. O marcador de seleção é da maneira descrita anteriormente.

**[047]** A introdução de um polipeptídeo externo que exibe a atividade do polipeptídeo de 6) pode ser introdução de um polinucleotídeo externo que codifica o polipeptídeo que exibe atividade idêntica/similar àquela do polipeptídeo em uma célula hospedeira. A origem e sequência do polinucleotídeo externo não são particularmente limitadas, contanto que o polinucleotídeo exiba atividade idêntica/similar àquela do polipeptídeo. Qualquer método de transformação selecionado apropriadamente pelos versados na técnica pode ser usado para a introdução. Uma vez que o polinucleotídeo introduzido é expresso na célula hospedeira, o polipeptídeo é produzido, aumentando assim a atividade do polipeptídeo.

**[048]** A otimização de códon de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de 7) pode ser otimização de códon de um polinucleotídeo intrínseco para aumentar a transcrição ou tradução em uma célula hospedeira, ou otimização de códon de um

polinucleotídeo externo para otimizar a transcrição e tradução deste em uma célula hospedeira.

**[049]** A modificação ou modificação química de uma região exposta selecionada analisando uma estrutura tridimensional do polipeptídeo de 8) pode ser, por exemplo, modificação ou modificação química de uma região exposta para ser modificada ou quimicamente modificada, comparando a informação de sequência de um polipeptídeo a ser analisada com uma base de dados que que armazena a informação de sequência de proteínas existentes, determinando um candidato de proteína molde de acordo com a similaridade das sequências, e identificando a estrutura baseada neste.

**[050]** Tal intensificação de atividade da atividade de polipeptídeo pode ser um aumento na atividade ou concentração do polipeptídeo expresso, comparado à atividade ou concentração de um polipeptídeo expresso em micro-organismos tipo selvagem ou cepas de micro-organismo antes da transformação, ou um aumento na quantidade de um produto obtido a partir do polipeptídeo, sem ser limitado a estes.

**[051]** Por exemplo, foi confirmado que o aumento na capacidade de produção de glutamina do polipeptídeo modificado da presente revelação aumentou em comparação ao tipo selvagem, indicando atividade de glutamina sintetase intensificada (Tabelas 1 a 3).

**[052]** No micro-organismo da presente revelação, a modificação do polinucleotídeo como um todo ou em parte pode ser induzida por (a) recombinação homóloga usando um vetor para inserção cromossômica no micro-organismo, ou edição do genoma usando uma nuclease geneticamente modificada (por exemplo, CRISPR-Cas9), e/ou (b) tratamento com luz, tal como raios UV e raios radioativos, e/ou uma substância química, sem ser limitado a estes. Um método para modificar o gene como um todo ou em parte pode incluir uma técnica de recombinação de DNA. Por exemplo, uma parte ou o gene inteiro pode ser eliminado induzindo a recombinação homóloga, injetando uma sequência de nucleotídeo ou vetor que inclui uma sequência de nucleotídeo com uma homologia com um gene alvo no micro-

organismo. A sequência injetada de nucleotídeo ou vetor pode incluir um marcador de seleção dominante, sem ser limitado a este.

**[053]** Um outro aspecto da presente revelação provê um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado, ou um vetor incluindo o polinucleotídeo.

**[054]** A sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1, a glutamina sintetase, e o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase são da maneira descrita anteriormente.

**[055]** Da maneira aqui usada, o termo “polinucleotídeo” se refere a uma fita de DNA ou RNA com um certo tamanho mínimo, como um polímero de nucleotídeos, em que os monômeros de nucleotídeo são ligados uns nos outros na forma de uma cadeia longa por ligações covalentes, mais especificamente um fragmento de polinucleotídeo que codifica a proteína modificada.

**[056]** O polinucleotídeo da presente revelação pode incluir qualquer sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase da presente revelação sem limitação. Especificamente, o polinucleotídeo da presente revelação pode incluir qualquer sequência que codifica o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, em que o aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup> ou 404<sup>a</sup> posição da sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 é substituído por um aminoácido diferente sem limitação. Por exemplo, o polinucleotídeo pode apresentar uma sequência de polinucleotídeo que codifica uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2 a 6, sem ser limitado a estas. Várias modificações podem ser realizadas em uma região codificante do polinucleotídeo, em uma faixa que não altera a sequência de aminoácido da proteína, em virtude da degeneração do códon ou em consideração de um códon preferido por um organismo no qual a proteína é expressa. Assim, é evidente que o polinucleotídeo pode incluir um polinucleotídeo que pode ser traduzido no polipeptídeo consistindo na sequência de aminoácido, ou um polipeptídeo com uma homologia ou identidade com a mesma, mais especificamente uma homologia ou identidade de 80% ou mais, e menor que 100%, em virtude da degeneração do códon.

**[057]** Além disso, o polinucleotídeo pode incluir qualquer sequência hibridizada com uma sonda construída usando sequências conhecidas de gene, por exemplo, uma sequência de nucleotídeo completamente ou parcialmente complementar ao polinucleotídeo em condições de estringência, para codificar o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, sem limitação.

**[058]** O termo “condições de estringência” se refere às condições que permitem hibridização específica entre polinucleotídeos. Tais condições são reveladas em detalhes em documentos conhecidos (J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989; F.M. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque 9.50-9.51, 11.7-11.8).

**[059]** Por exemplo, as condições de estringência podem incluir condições para realizar hibridização entre polinucleotídeos com uma alta homologia ou identidade, por exemplo, uma homologia ou identidade de 70% ou mais, 75% ou mais, 80% ou mais, 85% ou mais, 90% ou mais, 95% ou mais, 96% ou mais, 97% ou mais, 98% ou mais, ou 99% ou mais, sem realizar hibridização entre polinucleotídeos com uma homologia ou identidade menor que as homologia ou identidades anteriores, ou lavagem uma vez, especificamente duas vezes ou três vezes, em condições de lavagem geral para hibridização Southern em uma concentração de sal e temperatura de 60°C, 1×SSC, 0,1% de SDS, especificamente 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, e mais especificamente 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS.

**[060]** A hibridização exige que dois polinucleotídeos apresentem sequências complementares, embora bases possam se ligar de maneira inespecífica de acordo com o grau de estringência de hibridização. O termo “complementar” é usado para descrever a relação entre bases de nucleotídeos capazes de hibridizar umas com as outras. Por exemplo, com relação a DNA, adenosina é complementar à timina, e citosina é complementar à guanina. Assim, o polinucleotídeo da presente revelação pode incluir não apenas uma sequência de ácido nucleico substancialmente similar, mas também um fragmento de ácido nucleico isolado, mas complementar à sequência

completa.

**[061]** Especificamente, um polinucleotídeo com uma homologia ou identidade com o polinucleotídeo da presente revelação pode ser detectado usando as condições de hibridização anteriormente descritas, incluindo um processo de hibridização em um valor de  $T_m$  de 55°C. Igualmente, o valor de  $T_m$  pode ser, mas sem limitação, 60°C, 63°C, ou 65°C, e pode ser ajustado adequadamente pelos versados na técnica, de acordo com os propósitos pretendidos.

**[062]** Um grau apropriado de estringência para hibridização dos polinucleotídeos pode depender do tamanho, e o grau de complementaridade dos polinucleotídeos e parâmetros destes são bem conhecidos na técnica (por exemplo, Sambrook *et al.*, descrito anteriormente).

**[063]** Da maneira aqui usada, o termo “homologia” ou “identidade” se refere ao grau de relação entre as duas dadas sequências de aminoácido ou sequências de nucleotídeo, e pode ser expresso como um percentual. Os termos homologia e identidade podem ser usados frequentemente indiferentemente.

**[064]** A homologia de sequência ou identidade de polinucleotídeos ou polipeptídeos conservados pode ser determinada usando um algoritmo de alinhamento padrão, e penalidades de espaçamento padrão estabelecidas por um programa podem ser usadas juntas a estes. Substancialmente, sequências homólogas ou idênticas podem em geral hibridizar umas com as outras, como um todo ou em parte, em condições moderadas ou altamente de estringência. É evidente que a hibridização inclui hibridização com um polinucleotídeo incluindo um códon comum, ou um códon relacionado à degeneração de códon no polinucleotídeo.

**[065]** A homologia de sequência, similaridade, ou identidade entre dois polinucleotídeos ou sequências de polipeptídeo pode ser determinada usando qualquer algoritmo de computador conhecido na técnica, tal como o programa “FASTA”, que usa parâmetros padrões revelados por Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 85:2444. Alternativamente, a homologia, similaridade ou identidade pode ser determinada usando o algoritmo de Needleman-Wunsch

(Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443–453) da maneira implementada no programa Needleman do pacote EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16:276–277) (versão 5.0.0 ou superior) (incluindo pacote de programa GCG (Devereux, J. *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. *et al.*, *J MOLEC BIOL* 215:403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, e CARILLO *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). Por exemplo, a homologia, similaridade ou identidade pode ser determinada usando BLAST da base de dados do National Center for Biotechnology Information, ou ClustalW.

**[066]** A homologia, similaridade, ou identidade entre polinucleotídeos ou polipeptídeos pode ser determinada comparando informação de sequência usando o programa de computador GAP da maneira introduzida por, por exemplo, Needleman *et al.* (1970), *J Mol Biol.* 48:443 da maneira descrita por Smith e Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482. Resumidamente, o programa GAP define similaridade como o número de símbolos alinhados (isto é, nucleotídeos ou aminoácidos) que são similares, dividido pelo número total de símbolos na mais curta de duas sequências. Parâmetros padrões para o programa GAP podem incluir: (1) uma matriz de comparação binária (contendo um valor de 1 para identidade e 0 para não identidade), e uma matriz de comparação de peso de Gribkov *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:6745 revelada em Schwartz e Dayhoff, eds., *Atlas Of Protein Sequence E Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353–358 (1979) (ou a matriz de substituição EDNAFULL (EMBOSS versão de NCBI NUC4.4)); (2) uma penalidade de 3,0 para cada espaçamento, e uma penalidade adicional de 0.10 para cada símbolo, em cada espaçamento (ou uma penalidade de abertura de espaçamento de 10, e uma penalidade de extensão de espaçamento de 0.5); e (3) nenhuma penalidade para espaçamentos finais.

**[067]** Um outro aspecto da presente revelação provê um micro-organismo que inclui: o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase da presente

revelação; o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado da presente revelação; ou o vetor da presente revelação.

**[068]** O vetor da presente revelação pode ser um vetor de expressão para expressar o polinucleotídeo em uma célula hospedeira, mas não é limitado a este.

**[069]** O vetor da presente revelação pode incluir uma construção de DNA contendo uma sequência de nucleotídeo de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo alvo, operavelmente ligada a uma região regulatória de expressão (ou sequência regulatória de expressão), adequada para expressar o polipeptídeo alvo em um hospedeiro adequado. A região regulatória de expressão pode incluir um promotor capaz de iniciar a transcrição, qualquer sequência operadora para regular a transcrição, uma sequência que codifica um sítio de ligação ao ribossomo RNAm adequado, e uma sequência para regular a finalização de transcrição e tradução. Uma vez transformado em uma célula hospedeira adequada, o vetor pode replicar ou funcionar independentemente de um genoma hospedeiro, ou pode integrar no genoma.

**[070]** O vetor usado na presente revelação não é particularmente limitado, e qualquer vetor conhecido na técnica pode ser usado. Exemplos de vetores convencionais podem incluir um plasmídeo natural ou recombinante, cosmídeo, vírus e bacteriófago. Por exemplo, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A e Charon21A podem ser usados como um vetor de fago ou um vetor de cosmídeo. Como um vetor de plasmídeo, tipo pDZ, tipo pBR, tipo pUC, tipo pBluescriptII, tipo pGEM, tipo pTZ, tipo pCL, e tipo pET podem ser usados. Especificamente, os vetores pDZ, pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118 e pCC1BAC podem ser usados.

**[071]** Por exemplo, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo alvo pode ser inserido em um cromossomo usando um vetor para inserção cromossômica. A inserção do polinucleotídeo no cromossomo pode ser realizada por meio de qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, recombinação homóloga, sem ser limitado a esta. O polinucleotídeo pode incluir adicionalmente um marcador de seleção para

confirmar a inserção cromossômica. O marcador de seleção é usado para selecionar células que são transformadas com o vetor, isto é, para confirmar inserção de uma molécula de ácido nucleico desejada, e exemplos do marcador de seleção podem incluir marcadores que proveem fenótipos selecionáveis, tais como resistência a fármaco, exigência de nutriente, resistência aos agentes citotóxicos, ou expressão de polipeptídeo de superfície. Apenas células que expressam o marcador de seleção são capazes de sobreviver ou mostrar diferentes fenótipos no ambiente tratado com um agente seletivo e, assim, as células transformadas podem ser selecionadas.

**[072]** O micro-organismo pode ser um micro-organismo com capacidade de produzir L-glutamina.

**[073]** Da maneira aqui usada, o “micro-organismo (ou cepa)” inclui tanto micro-organismos tipo selvagem quanto micro-organismos incluindo modificação genética natural ou artificial, tais como micro-organismos com um mecanismo particular enfraquecido ou intensificado por meio da introdução de um gene exógeno, ou intensificação ou inativação de um gene endógeno, e incluindo modificação genética para produzir um polipeptídeo, proteína ou produto alvo.

**[074]** Especificamente, o micro-organismo que inclui o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase da presente revelação pode ser um micro-organismo naturalmente com capacidade de produzir L-glutamina. ou um micro-organismo preparado provendo a capacidade de produzir L-glutamina a uma cepa parental incapaz de produzir L-glutamina.

**[075]** Da maneira aqui usada, o termo “micro-organismo que inclui o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase” pode se referir a um micro-organismo recombinante que expressa o polipeptídeo modificado da presente revelação.

**[076]** Por exemplo, o micro-organismo se refere a um micro-organismo que inclui um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, ou uma célula hospedeira ou micro-organismo transformado com um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado, ou um vetor incluindo o

mesmo, para ser capaz de expressar o polipeptídeo modificado.

**[077]** Da maneira aqui usada, o termo “glutamina” é um aminoácido amplamente usado em produtos farmacêuticos, cosméticos, e alimentos saudáveis, tais como agentes terapêuticos para problemas digestivos, intensificadores da função hepática, intensificadores da função cerebral, intensificadores imunológicos, medicações para úlcera estomacal, medicações para alcoolismo, hidratantes cosméticos, suplementos nutricionais para atletas e suplementos nutricionais para pacientes. A glutamina pode ser produzida a partir de ácido glutâmico e amônia, por glutamina sintetase, na presença de ATP. Isto é, na presente revelação, uma vez que a atividade de glutamina sintetase é intensificada pela inclusão do polipeptídeo modificado com a atividade de glutamina sintetase, a capacidade de produzir glutamina de um micro-organismo que inclui o mesmo pode ser intensificada.

**[078]** Especificamente, na presente revelação, a glutamina pode ser L-glutamina. Em toda a especificação, o termo “glutamina” pode ser usado indiferentemente com “L-glutamina”.

**[079]** Da maneira aqui usada, o termo “transformação” se refere a um processo de introduzir um vetor incluindo um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo alvo em uma célula hospedeira ou micro-organismo, de maneira tal que o polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo é expresso na célula hospedeira. O polinucleotídeo transformado pode estar tanto em uma forma inserida no cromossomo da célula hospedeira, quanto na forma localizada fora do cromossomo, contanto que a proteína seja expressa na célula hospedeira. Além disso, o polinucleotídeo inclui DNA e/ou RNA que codifica o polipeptídeo alvo. O polinucleotídeo pode ser introduzido na célula hospedeira em qualquer forma, contanto que o polinucleotídeo seja introduzido na célula hospedeira e o polipeptídeo seja expresso na mesma. Por exemplo, o polinucleotídeo pode ser introduzido na célula hospedeira na forma de um cassete de expressão, que é uma construção de gene incluindo todos os elementos essenciais exigidos para autorreplicação. O cassete de expressão pode incluir em geral um promotor operavelmente ligado ao polinucleotídeo, um sinal de finalização de

transcrição, um sítio de ligação ao ribossomo, e um sinal de finalização de tradução. O cassete de expressão pode estar na forma de um vetor de expressão autorreplicável. Igualmente, o polinucleotídeo pode ser introduzido na célula hospedeira em sua forma original, e operavelmente ligado a uma sequência exigida para a expressão na célula hospedeira, sem ser limitado a este.

**[080]** Além disso, da maneira aqui usada, o termo “operavelmente ligado” se refere a uma ligação operável entre uma sequência promotora, o que possibilita o início e mediação de transcrição de um polinucleotídeo que codifica a variante alvo da presente revelação, e a sequência de polinucleotídeo.

**[081]** Em vista dos objetivos da presente revelação, o micro-organismo pode ser especificamente um micro-organismo que expressa o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, em que um aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup> ou 404<sup>a</sup> posição da sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 é substituído por um aminoácido diferente. Especificamente, o micro-organismo pode ser um micro-organismo que expressa o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, substituindo o aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup> posição da terminação N da sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 por asparagina, ácido glutâmico ou serina, substituindo o aminoácido que corresponde à 402<sup>a</sup> posição por histidina, ou substituindo o aminoácido que corresponde à 404<sup>a</sup> posição por valina. Mais especificamente, o micro-organismo pode ser um micro-organismo que expressa o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, substituindo o aminoácido na 401<sup>a</sup> posição da terminação N da sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 por asparagina, ácido glutâmico ou serina, substituindo o aminoácido na 402<sup>a</sup> posição por histidina, ou substituindo o aminoácido na 404<sup>a</sup> posição por valina, sem ser limitado a estes. Por exemplo, o micro-organismo pode ser um micro-organismo que expressa um polipeptídeo modificado, incluindo modificação na 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup>, ou 405<sup>a</sup> posição, e com uma homologia ou identidade de 80% ou mais, e menor que 100%, com a sequência de SEQ ID NO: 1, ou um micro-organismo que expressa um polipeptídeo modificado com uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2

a 6. Uma vez que o micro-organismo inclui o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, em que o aminoácido é substituído na posição descrita anteriormente, a atividade de glutamina sintetase é intensificada, aumentando assim a produção de glutamina sem inibir crescimento.

**[082]** Na presente revelação, o micro-organismo que inclui o polipeptídeo modificado pode ser um micro-organismo que pertence ao gênero *Enterobacter*, o gênero *Escherichia*, o gênero *Erwinia*, o gênero *Serratia*, o gênero *Pseudomonas*, o gênero *Providencia*, o gênero *Corynebacterium*, e o gênero *Brevibacterium*, mas tipos destes não são particularmente limitados a estes. Mais especificamente, o micro-organismo pode ser um micro-organismo que pertence ao gênero *Corynebacterium*.

**[083]** Na presente revelação, o “micro-organismo que pertence ao gênero *Corynebacterium*” pode ser *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, ou *Corynebacterium efficiens*, mas não é limitado a estes. Em uma modalidade, o micro-organismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* pode ser *Corynebacterium glutamicum*.

**[084]** O micro-organismo da presente revelação pode incluir quaisquer micro-organismos capazes de expressar o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase da presente revelação por meio de vários métodos conhecidos, bem como a introdução do polinucleotídeo ou vetor.

**[085]** Um outro aspecto da presente revelação provê um método para produzir L-glutamina, o método incluindo cultivar um micro-organismo que inclui um polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, em que um aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup>, 402<sup>a</sup> ou 404<sup>a</sup> posição da sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 é substituído por um aminoácido diferente ou um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado (o micro-organismo da presente revelação), em um meio de cultura.

**[086]** Igualmente, em uma modalidade da presente revelação, o micro-organismo pode ser um micro-organismo que pertence ao gênero *Corynebacterium*, e o micro-

organismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* pode ser *Corynebacterium glutamicum*.

**[087]** Na presente revelação, o termo “cultivar” se refere a crescer o micro-organismo em um ambiente ajustado apropriadamente. Na presente revelação, um processo de cultivo pode ser realizado em um meio apropriado e condições de cultivo bem conhecidas na técnica. O processo de cultivo pode ser facilmente usado após ajuste, de acordo com uma cepa que é selecionada pelos versados na técnica. Especificamente, o cultivo do micro-organismo pode ser realizado em um processo em lotes, um processo contínuo e/ou um processo em lote alimentado, mas não é limitado a estes.

**[088]** Da maneira aqui usada, o termo “meio de cultura” se refere a uma mistura contendo nutrientes exigidos para cultivar o micro-organismo da presente revelação como ingredientes principais, e que fornece nutrientes e fatores de crescimento incluindo água, que são essenciais para sobrevivência e crescimento. Especificamente, embora o meio de cultura usado para cultivo da cepa *Corynebacterium glutamicum* e outras condições de cultivo de acordo com a presente revelação não sejam particularmente limitados, contanto que o meio de cultura seja comumente usado para cultivar micro-organismos, o micro-organismo da presente revelação pode ser cultivado em um meio de cultura comum contendo uma fonte de carbono apropriada, fonte de nitrogênio, fonte de fósforo, composto inorgânico, aminoácido e/ou vitamina em condições aeróbicas, ajustando ao mesmo tempo a temperatura, pH e similares.

**[089]** Especificamente, um meio de cultura para uma cepa que pertence ao gênero *Corynebacterium* é revelado em um documento [“Manual of Methods for General Bacteriology” pela American Society for Bacteriology (Washington D.C., Estados Unidos, 1981)].

**[090]** Na presente revelação, exemplos da fonte de carbono podem incluir: carboidratos tais como glicose, sacarose, lactose, frutose e maltose; álcoois de açúcar tais como manitol e sorbitol; ácidos orgânicos tais como ácido pirúvico, ácido lático e

ácido cítrico; e aminoácidos tais como ácido glutâmico, metionina e lisina. Além disso, nutrientes orgânicos naturais tais como hidrolisados de amido, melação, melação negro, farelo de arroz, mandioca, bagaço de cana de açúcar, e licor de maceração de milho podem ser usados e, especificamente, carboidratos tais como glicose e melaços pré-tratados estéreis (isto é, melaços convertidos em açúcares reduzidos) podem ser usados, e quantidades adequadas de qualquer outra fonte de carbonos também pode ser usada sem limitação. Estas fontes de carbono podem ser usadas sozinhas ou em uma combinação de pelo menos duas destas, mas não são limitadas a estas.

**[091]** Como as fontes de nitrogênio, fontes de nitrogênio inorgânico tais como amônia, sulfato de amônio, cloreto de amônio, acetato de amônio, fosfato de amônio, carbonato de amônio e nitrato de amônio; e fontes de nitrogênio orgânico tais como aminoácidos, por exemplo, ácido glutâmico, metionina e glutamina, peptona, NZ-amina, extrato de carne, extrato de levedura, extrato de malte, licor de maceração de milho, hidrolisado de caseína, peixe ou produtos de degradação deste, e torta de soja desengordurada ou produtos de degradação desta podem ser usados. Estas fontes de nitrogênio podem ser usadas sozinhas ou em uma combinação de pelo menos duas destas, sem ser limitado a estas.

**[092]** Como as fontes de fósforo, fosfato monopotássico, fosfato dipotássico, ou sais contendo sódio correspondentes destes podem ser usados. Como os compostos inorgânicos, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de ferro, sulfato de magnésio, sulfato de ferro, sulfato de manganês, carbonato de cálcio e similares podem ser usados. O meio de cultura pode incluir adicionalmente, vitaminas e/ou precursores apropriados. Estes componentes ou precursores podem ser adicionados ao meio de cultura em um processo em lotes ou contínuo. Entretanto, a presente revelação não é limitada a estes.

**[093]** Além disso, durante o processo de cultivo do micro-organismo da presente revelação, compostos tais como hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, amônia, ácido fosfórico e ácido sulfúrico podem ser adicionados ao meio de cultura de uma maneira apropriada para ajustar o pH do meio de cultura. Além disso, um agente

antiespuma tal como um poliglicol éster de ácido graxo pode ser adicionado durante o processo de cultivo para inibir a geração de espuma. Igualmente, oxigênio ou um gás contendo oxigênio pode ser injetado no meio de cultura para manter as condições aeróbicas do meio de cultura, ou nitrogênio, hidrogênio, ou gás de dióxido de carbono ou nenhum gás pode ser injetado para manter uma condição anaeróbica e microaeróbica, sem ser limitado a estes.

**[094]** O cultivo pode ser realizado em uma temperatura de cultivo de 20°C a 40°C, especificamente 25°C a 40°C, por cerca de 10 horas a 160 horas, mas não é limitado a estes.

**[095]** L-Glutamina produzida durante o cultivo da presente revelação pode ser liberada no meio de cultura ou permanecer nas células.

**[096]** O método para produzir L-glutamina de acordo com a presente revelação pode incluir adicionalmente preparar o micro-organismo da presente revelação, preparar um meio de cultura para cultivar a cepa, ou qualquer combinação destes (independente da ordem, em qualquer ordem), por exemplo, antes da etapa de cultivo.

**[097]** O método para produzir L-glutamina de acordo com a presente revelação pode incluir adicionalmente recuperar L-glutamina do meio de cultura após cultivo (meio de cultura onde o cultivo é realizado), ou do micro-organismo da presente revelação. A etapa de recuperação pode ser adicionalmente incluída após a etapa de cultivo.

**[098]** A recuperação pode ser por coleta de L-glutamina desejada, usando o método de cultivo da presente revelação, por exemplo, um método apropriado conhecido na técnica, tal como um método em lotes, contínuo ou em lote alimentado. Por exemplo, centrifugação, filtração, tratamento com um agente de precipitação de proteína (precipitação com alta concentração de sal), extração, desintegração ultrassônica, ultrafiltração, diálise, vários métodos cromatográficos tais como cromatografia de peneira molecular (permeação em gel), cromatografia por adsorção, cromatografia de troca iônica, e cromatografia por afinidade, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), qualquer combinação destes pode ser usada, e a L-

glutamina desejada pode ser recuperada do meio de cultura ou do micro-organismo usando um método apropriado bem conhecido na técnica.

**[099]** Além disso, o método para produzir L-glutamina da presente revelação pode incluir adicionalmente purificar a L-glutamina. A etapa de purificação pode ser realizada usando um método apropriado bem conhecido na técnica. Em uma modalidade, quando o método para produzir L-glutamina da presente revelação inclui as etapas tanto de recuperação quanto de purificação, as etapas de recuperação e purificação podem ser realizadas continuamente ou descontinuamente, independente da ordem, ou podem ser realizadas simultaneamente ou como uma etapa integrada, sem ser limitado a estas.

**[0100]** No método da presente revelação, a variante, o polinucleotídeo, o vetor, o micro-organismo, a L-glutamina e similares são da maneira descrita anteriormente.

**[0101]** Um outro aspecto da presente revelação provê um método de aumentar a capacidade de produzir L-glutamina, incluindo modificar um micro-organismo para expressar um polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, em que um aminoácido que corresponde à 401<sup>a</sup> posição, um aminoácido que corresponde à 402<sup>a</sup> posição, ou um aminoácido que corresponde à 404<sup>a</sup> posição da sequência de aminoácido SEQ ID NO: 1 é substituído por um aminoácido diferente.

**[0102]** Um outro aspecto da presente revelação provê um uso para aumentar a capacidade de produzir L-glutamina de um micro-organismo que expressa: o polipeptídeo modificado; um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado; um vetor incluindo o polinucleotídeo; ou pelo menos um destes.

**[0103]** O polipeptídeo modificado, o aminoácido diferente, o polinucleotídeo, o vetor, o micro-organismo e a L-glutamina são da maneira descrita anteriormente.

**[0104]** Um outro aspecto da presente revelação provê uma composição para produzir L-glutamina incluindo: o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase; um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado; um vetor incluindo o polinucleotídeo; ou um micro-organismo que expressa pelo menos um destes, ou uma solução de cultivo destes.

**[0105]** O polipeptídeo modificado, o polinucleotídeo, o vetor, o micro-organismo e a L-glutamina são da maneira descrita anteriormente.

**[0106]** A composição para produzir L-glutamina pode se referir a uma composição capaz de produzir L-glutamina usando o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase da presente revelação. A composição pode incluir o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase, ou quaisquer componentes capazes de utilizar o polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase sem limitação. O polipeptídeo modificado com atividade de glutamina sintetase pode estar em uma forma incluída em um vetor, de maneira tal que um gene operavelmente ligado a este é expresso em uma célula hospedeira no vetor que é introduzido.

**[0107]** A composição pode incluir adicionalmente um crioprotetor ou um excipiente. O crioprotetor ou excipiente pode ser uma substância que não ocorre naturalmente ou uma substância de ocorrência natural, mas não é limitado a estes.

**[0108]** Como um outro exemplo, o crioprotetor ou excipiente pode ser uma substância que o micro-organismo não entra em contato naturalmente com, ou uma substância que não é naturalmente incluída com o micro-organismo ao mesmo tempo, mas não é limitado a estes.

### **MODO PARA INVENÇÃO**

**[0109]** Daqui por diante, a presente revelação será descrita em mais detalhes com referência aos exemplos a seguir. Entretanto, os exemplos a seguir são meramente apresentados para exemplificar a presente revelação, e o escopo da presente revelação não é limitado a estes.

### **EXEMPLO 1. CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA DE VETOR PARA INTRODUÇÃO DE MUTAÇÃO EM ORF DE GENE GLNA**

**[0110]** Uma biblioteca foi construída no método a seguir para descobrir variantes com níveis de expressão aumentados ou atividade de gene glnA que codifica glutamina sintetase de *Corynebacterium glutamicum*.

**[0111]** Primeiro, um kit de mutagênese aleatória GenemorphII (Stratagene) foi usado para introduzir 0 a 4,5 mutações por kb em um Fragmento de DNA (1.434 bp),

incluindo gene *glnA* (1.434 bp). PCR propensa ao erro foi realizada usando um cromossomo de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (WT) como um molde, e usando um conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 7 e 8. Especificamente, a PCR foi realizada usando uma solução de reação incluindo o cromossomo de uma cepa WT (500 ng), iniciadores 7 e 8 (cada qual com 125 ng), tampão de reação Mutazyme II (1Y), mistura de dNTP (40 mM), e DNA polimerase de Mutazyme II (2,5U) nas condições a seguir: desnaturação a 94°C por 2 minutos; 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto, e polimerização a 72°C por 2 minutos; e a seguir polimerização a 72°C por 10 minutos.

**[0112]** O fragmento de gene amplificado foi ligado um vetor de pCRII usando um kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen), e *E. coli* DH5 $\alpha$  foi transformada com este e plaqueada em um meio sólido LB contendo canamicina (25 mg/L). Vinte colônias transformadas foram selecionadas, e os plasmídeos foram obtidos destas. Como um resultado de analisar a sequência de nucleotídeos, foi confirmado que a mutação foi introduzida em diferentes posições em uma frequência de 0,5 mutações/kb. Finalmente, cerca de 10.000 colônias transformadas de *E. coli* foram obtidas, e os plasmídeos foram extraídos destas e denominados biblioteca pTOPO-*glnA*(mt).

## **EXEMPLO 2: PREPARAÇÃO DE CEPA COM GLNA ELIMINADO E SELEÇÃO DE CEPA MUTADA POR GLNA**

**[0113]** A fim de construir uma cepa na qual o gene *glnA* foi eliminado de uma *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 tipo selvagem, um vetor pDZ- $\Delta$ *glnA*, no qual o gene *glnA* foi eliminado, foi preparado da maneira a seguir. Especificamente, o vetor foi construído de uma forma onde fragmentos de DNA (cada qual com 1.000 bp) localizados nas extremidades 5' e 3' do gene *glnA* são ligados a um vetor pDZ (Patente Coreana 2009-0094433).

**[0114]** Com base em uma sequência de nucleotídeo de gene *glnA* de SEQ ID NO: 29, iniciadores de SEQ ID NOS: 10 e 11 preparados inserindo um sítio de reconhecimento Sall de enzima de restrição no fragmento 5' e fragmento 3', e iniciadores de SEQ ID NOS: 9 e 12 em posições espaçadas dos mesmos por 1.000

bp, respectivamente, foram sintetizados.

**[0115]** O fragmento de gene da extremidade 5' foi preparado por meio de PCR, usando um cromossomo de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 como um molde, com um conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 9 e 10. Da mesma maneira, o fragmento de gene da extremidade 3' do gene *glnA* foi preparado por meio de PCR usando um conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 11 e 12. A PCR foi realizada nas condições a seguir: desnaturação a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto, e polimerização a 72°C por 40 segundos, e a seguir polimerização a 72°C por 10 minutos.

**[0116]** Ao mesmo tempo, após tratamento com a enzima de restrição Sall, o vetor pDZ tratado pelo calor a 65°C por 20 minutos foi ligado com os fragmentos de DNA a serem inseridos, amplificados pela PCR usando um kit de clonagem por infusão, *E. coli* DH5 $\alpha$  foi transformada com este e a seguir plaqueada em um meio sólido LB contendo canamicina (25 mg/L). Colônias transformadas com o vetor no qual o gene alvo foi inserido foram selecionadas por meio de PCR usando um conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 13 e 14, e a seguir um plasmídeo foi obtido usando um método de extração de plasmídeo conhecido na técnica e denominado pDZ- $\Delta$ *glnA*.

**[0117]** *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 foi transformada com o vetor pDZ- $\Delta$ *glnA*, preparado por meio de um método de pulso elétrico (Van der Rest *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:541–545, 1999), para preparar uma cepa com gene *glnA* eliminado por recombinação cromossômica homóloga. A cepa na qual o gene *glnA* foi eliminado foi denominada *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032:: $\Delta$ *glnA*.

**[0118]** Igualmente, a cepa ATCC13032:: $\Delta$ *glnA* foi transformada com uma biblioteca pTOPO-*glnA*(mt) por meio de um método de pulso elétrico, e plaqueada em um meio em placa complexo contendo canamicina (25 mg/L), e cerca de 100 colônias foram obtidas. As 100 cepas foram submetidas a uma capacidade de produzir o teste de L-glutamina. Cada uma das 100 cepas obtidas foi inoculada em um frasco de 250 mL de frasco de canto defletor, contendo 25 mL de um meio de produção de glutamina, e cultivada com agitação a 32°C por 48 horas em 200 rpm. 1 mL de uma

cultura semeada foi inoculado em um frasco de canto defletor de 250 mL, contendo 24 mL de um meio de produção de L-glutamina, e cultivado com agitação a 30°C por 48 horas em 200 rpm.

**[0119]** Cepas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 e ATCC13032:: $\Delta$ glnA foram usadas como controles. Após finalização do cultivo, L-glutamina presente em um sobrenadante de um meio livre de célula foi medido usando um sistema bioanalítico multiparâmetros YSI 7100 (YSI Inc.). As cepas com capacidade de produzir L-glutamina superior àquela da cepa ATCC13032:: $\Delta$ glnA e uma concentração de L-glutamina maior que a ATCC13032 foram selecionadas, e concentrações de glutamina nas soluções de cultivo são mostradas na tabela 1. As cepas selecionadas foram denominadas ATCC13032::glnA(mt)-1 a 3. As outras noventa e sete colônias apresentaram concentrações menores de L-glutamina, comparadas àquelas de ATCC13032, que foi usada como um controle.

Tabela 1

Análise de capacidade de produzir L-glutamina de ATCC13032::glnA(mt) derivada de ATCC13032

	Cepa	L-Glutamina (g/L)
Controle	ATCC13032	0,89
	ATCC13032:: $\Delta$ glnA	0,77
Experimental	ATCC13032::glnA(mt)-1	1,25
	ATCC13032::glnA(mt)-2	0,99
	ATCC13032::glnA(mt)-3	1,05

**[0120]** Da maneira mostrada na tabela 1, foi confirmado que a ATCC13032::glnA(mt)-1 apresentou melhor capacidade de produzir L-glutamina em cerca de 40%, a ATCC13032::glnA(mt)-2 apresentou melhor capacidade de produzir L-glutamina em cerca de 11%, e a ATCC13032::glnA(mt)-3 apresentou melhor capacidade de produzir L-glutamina em cerca de 18% comparada ao controle.

### **EXEMPLO 3: IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO DE TRÊS CEPAS COM GLNA MUTADO**

**[0121]** A fim de identificar a sequência de nucleotídeo do gene *glnA* das três cepas selecionadas, ATCC13032::*glnA*(mt)-1 a 3, fragmentos de DNA incluindo o gene *glnA* no cromossomo foram amplificados por meio de PCR usando o conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 7 e 8 do Exemplo 1. A PCR foi realizada nas condições a seguir: desnaturação a 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto, e polimerização a 72°C por 40 segundos; e a seguir polimerização a 72°C por 10 minutos.

**[0122]** Como um resultado de analisar a sequência de nucleotídeos do gene amplificado, foi confirmado que as três cepas são variantes: ATCC13032::*glnA*(mt)-1 é uma variante na qual as 1201<sup>a</sup> a 1203<sup>a</sup> posições de uma sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 5 são alteradas de GAC para ACC, de maneira tal que ácido aspártico, que é o 401<sup>o</sup> aminoácido da terminação N, é substituído por asparagina, ATCC13032::*glnA*(mt)-2 é uma variante na qual as 1204<sup>a</sup> a 1206<sup>a</sup> posições da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 5 são alteradas de AAG para CAC, de maneira tal que lisina, que é o 402<sup>o</sup> aminoácido da terminação N, é substituído por histidina, e ATCC13032::*glnA*(mt)-3 é uma variante na qual as 1210<sup>a</sup> a 1212<sup>a</sup> posições da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 5 são alteradas de CTC para GTC, de maneira tal que leucina, que é o 404<sup>o</sup> aminoácido, é substituído por valina. Entre as três cepas, a cepa ATCC13032::*glnA*(mt)-1 que exibe uma maior produção de L-glutamina, e uma taxa de crescimento similar comparada à ATCC13032, foi selecionada como uma atividade de cepa que intensifica glutamina sintetase.

#### **EXEMPLO 4: CONSTRUÇÃO DE VÁRIAS CEPAS NAS QUAIS 401<sup>o</sup> AMINOÁCIDO (ÁCIDO ASPÁRTICO) É SUBSTITUÍDO POR AMINOÁCIDO DIFERENTE**

**[0123]** Uma vez que foi confirmado que o 401<sup>o</sup> aminoácido é uma posição importante para a atividade enzimática no Exemplo 3, foram realizadas tentativas para substituir o 401<sup>a</sup> aminoácido da sequência de aminoácido, da maneira apresentada em SEQ ID NO: 1, por aminoácidos sem ser o ácido aspártico do tipo selvagem.

**[0124]** A fim de introduzir substituição heteróloga de quatro tipos, incluindo D401N

confirmado no Exemplo 3, os respectivos vetores recombinantes para este foram construídos por meio do método a seguir.

**[0125]** Primeiro, iniciadores de SEQ ID NOS: 15 e 16 foram sintetizados usando um DNA do genoma, extraído da cepa WT como um molde, inserindo um sítio de reconhecimento Sall de enzima de restrição no fragmento 5' e fragmento 3', nas posições espaçadas das 1201<sup>a</sup> a 1203<sup>a</sup> posições do gene *glnA* em cerca de 600 bp, respectivamente. A fim de introduzir substituição heteróloga dos quatro tipos, iniciadores de SEQ ID NOS: 17 a 26 foram sintetizados por substituição das 1201<sup>a</sup> a 1203<sup>a</sup> posições da sequência de nucleotídeo do gene *glnA*.

**[0126]** Igualmente, com relação à Y405F, que é uma mutação previamente conhecida para desadenilação do gene *glnA*, iniciadores de SEQ ID NOS: 27 e 28 foram sintetizados por comparação da capacidade de produção de glutamina.

**[0127]** Especificamente, o plasmídeo pDZ-*glnA*(D401N) foi construído em uma forma onde fragmentos de DNA (cada qual com 600 bp) localizados nas extremidades 5' e 3' do gene *glnA* são ligados a o vetor pDZ (Patente Coreana 2009-0094433). O fragmento de gene da extremidade 5' do gene *glnA* foi construído por meio de PCR usando o cromossomo da cepa WT como um molde, e usando o conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 15 e 18. A PCR foi realizada nas condições a seguir: desnaturação a 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto, e polimerização a 72°C por 40 segundos; e a seguir polimerização a 72°C por 10 minutos. Da mesma maneira, o fragmento de gene localizado na extremidade 3' do gene *glnA* foi construído por meio de PCR usando o conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 16 e 17. Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados usando um kit de purificação de PCR da Quiagen, e usados como fragmentos de DNA para serem inseridos para construção de um vetor.

**[0128]** Ao mesmo tempo, após o vetor pDZ tratado com a enzima de restrição Sall e tratado termicamente a 65°C por 20 minutos ser ligado ao fragmento de DNA, por inserção amplificada pela PCR usando um kit de clonagem por infusão, *E. coli* DH5α foi transformada com este. A cepa foi plaqueada em um meio sólido LB contendo

canamicina (25 mg/L). Colônias transformadas com um vetor inserido com um gene desejado foram selecionadas por meio de PCR, usando um conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 13 e 14, e um plasmídeo foi obtido usando um método de extração de plasmídeo bem conhecido na técnica. O plasmídeo foi denominado pDZ-glnA(D401N).

**[0129]** Da mesma maneira, pDZ-glnA(D401E) foi construído usando um conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 15 e 20 e um conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 16 e 19, e pDZ-glnA(D401S) foi construído usando um conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 15 e 24 e um conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 16 e 23. Igualmente, pDZ-glnA(Y405F) foi construído usando um conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 15 e 28 e um conjunto de iniciador de SEQ ID NOS: 16 e 27.

**[0130]** A fim de determinar mais claramente a concentração de glutamina e taxa de crescimento de acordo com a introdução do gene glnA, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 que produz glutamina foi transformada com cada um dos vetores construídos usando um método de pulso elétrico, e quatro cepas preparadas introduzindo substituição heteróloga no gene glnA por recombinação cromossômica homóloga, isto é, ATCC13032::glnA (D401N), ATCC13032::glnA (D401E), ATCC13032::glnA (D401S) e ATCC13032::glnA (Y405F) foram construídas. Entre estas, a ATCC13032::glnA (D401N) foi denominada CA11-4021 e depositada no *Korean Culture Center of Microorganisms* (KCCM), reconhecido como uma autoridade depositária internacional no Tratado de Budapeste, em 19 de dezembro de 2019, com o número de acesso KCCM12645P.

#### **EXEMPLO 5: ANÁLISE DA CAPACIDADE DE PRODUZIR GLUTAMINA DA CEPA COM GLNA MUTADO**

**[0131]** As quatro cepas construídas no Exemplo 4 anterior foram cultivadas no método a seguir para avaliar as taxas de consumo de glicose, e capacidade de produzir glutamina destas usando a cepa ATCC13032 como um controle.

**[0132]** Primeiro, cada uma das cepas foi inoculada em um frasco de canto defletor de 250 mL contendo 25 mL de um meio para semeadura, e cultivadas com agitação a 30°C por 20 horas em 200 rpm. A seguir, 1 mL de um cultivo inicial foi inoculado em

um frasco de canto defletor de 250 mL contendo 24 mL de um meio de produção, e cultivado com agitação a 32°C por 48 horas em 200 rpm. As composições do meio inicial e do meio de produção são da maneira a seguir. Após finalização do cultivo, as concentrações de L-glutamina foram medidas usando HPLC (Waters 2478). Os resultados da medição da capacidade de produzir glutamina e taxas de consumo de glicose são da maneira mostrada na tabela 2 a seguir.

#### MEIO INICIAL (PH 7,0)

**[0133]** 20 g de glicose, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 1,5 g de ureia, 4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{g}$  de biotina, 1.000  $\mu\text{g}$  de tiamina HCl, 2.000  $\mu\text{g}$  de pantotenato de cálcio, e 2.000  $\mu\text{g}$  de nicotinamida (com base em 1 L de água destilada).

#### MEIO DE PRODUÇÃO DE GLUTAMINA (PH 8,0)

**[0134]** 60 g de açúcar não refinado, 45 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,48 g de proteína de soja, 50 g de  $\text{CaCO}_3$ , 0,4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 mg de cloridrato de tiamina, 0,3 mg de biotina, 60 mg de nicotinamida, 10 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , e 10 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (baseado em 1 L de água destilada).

Tabela 2

Análise de capacidade de produzir L-glutamina e taxa de consumo de glicose de ATCC13032::*glnA*(mt) derivada de ATCC13032

	Cepa	L-Glutamina (g/L)	Taxa de consumo de glicose (g/hr)
Controle	ATCC13032:: $\Delta$ <i>glnA</i>	0,77	4,69
	ATCC13032	0,89	4,72
	ATCC13032:: <i>glnA</i> (D401N)	1,25	4,76
	ATCC13032:: <i>glnA</i> (D401E)	1,19	5,16
	ATCC13032:: <i>glnA</i> (D401S)	0,88	6,50

Mutação por desadenilação	ATCC13032::glnA (Y405F)	1,20	4,45
---------------------------	-------------------------	------	------

**[0135]** No caso da cepa que inclui o polipeptídeo modificado, no qual o 401º aminoácido de SEQ ID NO: 1 foi substituído por um aminoácido diferente quando o aminoácido substituído foi asparagina (ATCC13032::glnA (D401N)) e ácido glutâmico (ATCC13032::glnA (D401E)), foi confirmado que a capacidade de produzir glutamina foi aumentada em cerca de 40% e 33%, respectivamente. Estes resultados indicam que a capacidade de produzir glutamina é melhorada, quando comparada com a cepa ATCC13032::glnA (Y405F) introduzida com a mutação por desadenilação de glnA.

#### **EXEMPLO 6: CONSTRUÇÃO DE CEPA MUTADA POR GLNA BASEADA NA CEPAS QUE PRODUZ GLUTAMINA**

**[0136]** A cepa *Corynebacterium glutamicum* KFCC-10680 (Patente Coreana 10-0048440), que é uma cepa produtora de glutamina existente, foi transformada com pDZ-glnA(D401N), pDZ-glnA(D401E) e pDZ-glnA(Y405F), respectivamente, da mesma maneira como no Exemplo 4, por meio de um método de pulso elétrico. Três cepas preparadas introduzindo substituição heteróloga no gene glnA foram denominadas KFCC-10680::glnA (D401N), KFCC-10680::glnA (D401E), e KFCC-10680::glnA (Y405F), respectivamente.

#### **EXEMPLO 7: ANÁLISE DA CAPACIDADE DE PRODUZIR GLUTAMINA DA CEPAS MUTADA POR GLNA BASEADA NA CEPAS QUE PRODUZ GLUTAMINA**

**[0137]** As três cepas selecionadas foram cultivadas da maneira a seguir para avaliar taxas de consumo de glicose, e capacidade de produzir glutamina destas, usando a cepa KFCC-10680 como um controle.

**[0138]** Primeiro, cada uma das cepas foi inoculada em um frasco de canto defletor de 250mL contendo 25 mL de um meio inicial, e cultivada com agitação a 30°C por 20 horas em 200 rpm. A seguir, 1 mL de uma cultura inicial foi inoculado em um frasco de canto defletor de 250 mL contendo 24 mL de um meio de produção, e cultivado com agitação a 32°C por 48 horas em 200 rpm. As composições do meio inicial e o meio de produção são da maneira a seguir. Após finalizar o cultivo, as concentrações

de L-glutamina foram avaliadas usando HPLC (Waters 2478). Os resultados da medição da capacidade de produzir glutamina e taxas de consumo de glicose são da maneira mostrada na tabela 3 a seguir.

#### **MEIO INICIAL (PH 7,0)**

**[0139]** 20 g de glicose, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 1,5 g de ureia, 4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{g}$  de biotina, 1.000  $\mu\text{g}$  de tiamina HCl, 2.000  $\mu\text{g}$  de pantotenato de cálcio, e 2.000  $\mu\text{g}$  de nicotinamida (baseado em 1 L de água destilada).

#### **MEIO DE PRODUÇÃO DE GLUTAMINA (PH 8,0)**

**[0140]** 60 g de açúcar não refinado, 45 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,48 g de proteína de soja, 50 g de  $\text{CaCO}_3$ , 0,4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 mg de cloridrato de tiamina, 0,3 mg de biotina, 60 mg de nicotinamida, 10 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , e 10 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (com base em 1 L de água destilada).

Tabela 3

Análise de capacidade de produzir L-glutamina e taxa de consumo de glicose de KFCC-10680::glnA(mt) derivada de KFCC-10680

	Cepa	L-Glutamina (g/L)	Taxa de consumo de glicose (g/hr)
Controle	KFCC-10680	13,8	2,36
	KFCC-10680::glnA (D401N)	16,7	2,38
	KFCC-10680::glnA (D401E)	15,1	2,58
Mutação por desadenilação	KFCC-10680::glnA (Y405F)	14,1	2,21

**[0141]** No caso da cepa que inclui o polipeptídeo modificado, no qual o 401º aminoácido de SEQ ID NO: 1 foi substituído por um aminoácido diferente, quando o aminoácido substituído foi asparagina (KFCC-10680::glnA (D401N)) e ácido glutâmico (KFCC-10680::glnA (D401E)), foi confirmado que a capacidade de produzir glutamina

foi aumentada em cerca de 21% e 9%.

**[0142]** Estes resultados indicam que a capacidade de produzir glutamina foi melhorada quando comparada com a cepa KFCC-10680::glnA (Y405F), introduzida com mutação por desadenilação do gene glnA.

**[0143]** A descrição anterior da presente revelação é provida com o propósito de ilustração, e deve ser entendido pelos versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser realizadas sem alterar a concepção técnica e características essenciais da presente revelação. Assim, é evidente que as modalidades descritas anteriormente são ilustrativas em todos os aspectos, e não limitam a presente revelação. As várias modalidades aqui descritas não são pretendidas para ser limitantes, com o verdadeiro escopo e espírito sendo indicado pelas reivindicações a seguir. A presente revelação deve ser limitada apenas pelos termos das reivindicações em anexo, junto com o escopo completo de equivalentes aos quais tais reivindicações têm direito.

Autoridade Depositária: *Korean Culture Center of Microorganisms*  
(Internacional)

Número de Acesso: KCCM12645P

Data do depósito: 19/12/2019

## REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo modificado que consiste na sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1, **caracterizado por** um aminoácido que corresponde à posição 401, 402 ou 404 da sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ser substituído por um aminoácido diferente,

em que o aminoácido que corresponde à posição 401 é substituído por asparagina, ácido glutâmico ou serina,

em que o aminoácido que corresponde à posição 402 é substituído por histidina, e

em que o aminoácido que corresponde à posição 404 é substituído por valina.

2. Polipeptídeo modificado, de acordo com a reivindicação 1, sendo que o polipeptídeo modificado é **caracterizado por** consistir em uma sequência de aminoácido da maneira apresentada em SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 6.

3. Polinucleotídeo **caracterizado por** codificar o polipeptídeo modificado, conforme definido na reivindicação 1 ou 2, em que na sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 29 ou sequência degenerada da mesma,

o códon que consiste em 1201º a 1203º nucleotídeos é substituído por um códon que codifica asparagina, ácido glutâmico ou serina,

o códon que consiste em 1204º a 1206º nucleotídeos é substituído por um códon que codifica histidina, e

o códon que consiste em 1210º a 1212º nucleotídeos é substituído por um códon que codifica valina.

4. Micro-organismo **caracterizado por** compreender o polipeptídeo modificado, conforme definido na reivindicação 1 ou 2, ou um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado.

5. Micro-organismo, de acordo com a reivindicação 4, sendo que o micro-organismo é **caracterizado por** pertencer ao gênero *Corynebacterium*.

6. Micro-organismo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado por** o micro-organismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* ser *Corynebacterium glutamicum*.

7. Método para produzir L-glutamina, sendo que o método é **caracterizado por** compreender cultivar um micro-organismo compreendendo o

polipeptídeo modificado, conforme definido na reivindicação 1 ou 2, ou um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo modificado, em um meio de cultura.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** compreender adicionalmente recuperar ou isolar L-glutamina do meio de cultura ou do micro-organismo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** o micro-organismo ser um micro-organismo que pertence ao gênero *Corynebacterium*.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado por** o micro-organismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* ser *Corynebacterium glutamicum*.