



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

**(21) PI 0913714-9 A2**



\* B R P I 0 9 1 3 7 1 4 A 2 \*

**(22) Data do Depósito: 18/09/2009**

**(43) Data da Publicação Nacional: 13/10/2020**

**(54) Título:** POLIPEPTÍDEO MUTANTE QUE POSSUI ATIVIDADE DE A5 DESSATURASE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA MICROBIANA E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E DE ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO

**(51) Int. Cl.:** C07K 14/00; C07H 21/00; C12P 21/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 19/09/2008 US 61/098,333.

**(71) Depositante(es):** E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY.

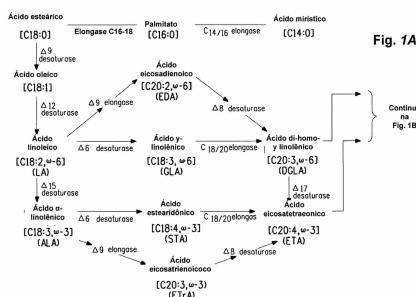
**(72) Inventor(es):** QUN ZHU; DANA M. WALTERS POLLAK.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2009057393 de 18/09/2009

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/033753 de 25/03/2010

**(85) Data da Fase Nacional:** 18/03/2011

**(57) Resumo:** POLIPEPTÍDEO MUTANTE QUE POSSUI ATIVIDADE DE (Delta)5 DESSATURASE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA MICROBIANA E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E DE ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO A presente invenção refere-se a (Delta)5 dessaturases mutantes, que possuem a capacidade de conversão de ácido di-homo-(Gama)-linolênico (DGLA; 20:3 (Ômega)-6) em ácido araquidônico (ARA; 20:4 (Ômega)-6) e/ou ácido eicosatetraenoico (ETA; 20:4 (Ômega)-3) em ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 w-3) e que contêm 10 pelo menos uma mutação no motivo HPGG do domínio similar a citocromo b5. São descritos fragmentos de ácido nucleico isolados e construções recombinantes que compreendem esses fragmentos que codificam (Delta)5 dessaturases, junto com um método de elaboração de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ("PUFAs") utilizando essas (Delta)5 dessaturases mutantes em levedura oleaginosa.



**“POLIPEPTÍDEO MUTANTE QUE POSSUI ATIVIDADE DE Δ5  
DESSATURASE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA  
HOSPEDEIRA MICROBIANA E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO  
ARAQUIDÔNICO E DE ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO”**

5 O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório Norte-Americano nº 61/098.333, depositado em dezenove de setembro de 2008, cujo relatório descritivo é integralmente incorporado ao presente como referência.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção encontra-se no campo da biotecnologia.  
10 Mais especificamente, a presente invenção refere-se à criação de fragmentos de ácidos nucleicos que codificam enzimas dessaturase de ácido graxo Δ5 mutantes (em que ocorre pelo menos uma mutação dentro do motivo HPGG do domínio similar a citocromo b5) e ao uso dessas dessaturases na elaboração de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (“PUFAs”).

15 **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Diversos hospedeiros diferentes, incluindo plantas, algas, fungos, estramenópilos e leveduras, estão sendo pesquisados como meios de produção de ácido graxo poli-insaturado comercial (“PUFA”). A engenharia genética demonstrou que as capacidades naturais de alguns hospedeiros (mesmo os limitados de forma nativa a ácido linoleico (LA; 18:2 ω-6) e ácido α-linolênico (ALA; 18:3 ω-3)) podem ser substancialmente alteradas para que resultem em produção em alto nível de diversos PUFAs ω-3/ω-6 de cadeia longa. Seja este o resultado de capacidades naturais ou tecnologia recombinante, a produção de ácido araquidônico (ARA; 20:4 ω-6), ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 ω-3) e ácido docosa-hexaenoico (DHA; 22:6 ω-3) pode necessitar da expressão de uma Δ5 dessaturase.

A maior parte das enzimas Δ5 dessaturase identificadas até aqui possui a capacidade primária de conversão de ácido di-homo-γ-linolênico

(DGLA; 20:3  $\omega$ -6) em ARA, com atividade secundária na conversão de ácido eicosatetraenoico (ETA; 20:4  $\omega$ -3) em EPA. Foram descritas diversas  $\Delta 5$  dessaturases na literatura aberta e na literatura de patentes. As características gerais de  $\Delta 5$  dessaturases, com base na evolução da dessaturase, são bem 5 descritas por P. Sperling et al (*Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 68: 73–95 (2003). Além das  $\Delta 6$ ,  $\Delta 8$  e  $\Delta 4$  dessaturases,  $\Delta 5$  dessaturases são conhecidas como dessaturases de “extremidade frontal” de PUFA de cadeia longa (em que a dessaturação ocorre entre uma ligação dupla previamente existente e o terminal carboxila do grupo acila do ácido graxo, ao contrário de 10 dessaturação dirigida a metila). Essas dessaturases são caracterizadas por três caixas de histidina (H(X)<sub>3-4</sub>H (SEQ ID N° 1 e 2), H(X)<sub>2-3</sub>HH (SEQ ID N° 3 e 4) e H/Q(X)<sub>2-3</sub>HH (SEQ ID N° 5 e 6)) e são membros da superfamília de fusão de citocromo *b*<sub>5</sub>, pois elas possuem um domínio citocromo *b*<sub>5</sub> fundido no seu terminal N que serve de doador de elétrons. O domínio citocromo *b*<sub>5</sub> também 15 contém um motivo de ligação heme conservado (ou seja, uma sequência de histidina-prolina-glicina-glicina ou sequência “HPGG” (SEQ ID N° 180)), apesar da divergência das sequências de domínio citocromo *b*<sub>5</sub> restantes. Essas sequências de motivos são o objeto da Patente Norte-Americana n° 5.972.664.

Diversos estudos sugeriram que o motivo HPGG está relacionado 20 com a atividade enzimática. Stankova, O. et al (*Plant Phisiol.*, 121: 641 (1999)) realizaram mutagênese dirigida a local para substituir o resíduo de histidina do motivo HPGG por um resíduo de alanina na  $\Delta 6$  dessaturase de borragem. A enzima mutante foi expressa em *Arabidopsis*; nenhuma atividade enzimática pôde, entretanto, ser medida, o que sugere que o domínio citocromo *b*<sub>5</sub> da 25 dessaturase foi importante para a função. Foi realizado um estudo similar em uma  $\Delta 6$  dessaturase de rato, em que foi elaborada uma substituição de alanina por histidina no motivo HPGG. A proteína que sofreu mutação também não apresentou atividade (Guillou, H. et al, *J. Lipid Res.*, 45: 32-40 (2004)). Mais

recentemente, Hongsthong, A. et al (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72: 1192-1201 (2006)) relataram a substituição do resíduo de histidina do motivo HPGG por um resíduo de alanina na Δ6 dessaturase de *Spirulina*. Como ocorre com os relatos anteriores, a mutação tornou a enzima mutante incapaz de produzir 5 GLA em *E. coli*, o que sugere que o domínio de citocromo *b*<sub>5</sub> foi importante para a atividade e que alterações nesse motivo resultarão em redução da atividade enzimática. Embora as enzimas Δ5 dessaturase sejam relativamente comuns e bem caracterizadas, permanece a necessidade de enzimas que 10 sejam expressas eficientemente em altos níveis em células hospedeiras de produção capazes de elaborar PUFAs.

O problema a ser solucionado é, portanto, descobrir novas enzimas Δ5 dessaturase que possuam alta atividade e sejam apropriadas para integração em processos biossintéticos de PUFA em células hospedeiras comercialmente úteis. Os depositantes solucionaram o problema indicado por 15 meio da verificação inesperada de que alterações no motivo HPGG do domínio citocromo *b*<sub>5</sub> de várias Δ5 dessaturases resultaram em aumento de até 38% da atividade enzimática, com base na conversão de DGLA em ARA.

#### DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a novas construções genéticas que 20 codificam polipeptídeos que possuem atividade Δ5 dessaturase e seu uso em bactérias, leveduras, algas, euglenoides, estramenópilos, oomicetes e fungos para a produção de PUFAs.

É consequentemente fornecido no presente um polipeptídeo mutante que possui atividade Δ5 dessaturase que comprehende um motivo de 25 aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID N° 183 (His-Gly-Gly-Gly ou HGGG), SEQ ID N° 184 (His-His-Gly-Gly ou HHGG), SEQ ID N° 186 (His-Cys-Gly-Gly ou HCGG), SEQ ID N° 187 (His-Trp-Gly-Gly ou HWGG) e SEQ ID N° 185 (His-Pro-Gly-Ser ou HPGS). Polipeptídeos Δ5

dessaturase mutantes preferidos são aqueles que demonstram eficiência de conversão de ácido di-homo- $\gamma$ -linolênico em ácido araquidônico que é maior que a eficiência de conversão de ácido di-homo- $\gamma$ -linolênico do polipeptídeo original do qual foi derivado o mutante.

5 Em uma segunda realização fornecida no presente, encontra-se uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica substancialmente o polipeptídeo de acordo com a presente invenção.

10 Em uma terceira realização fornecida no presente, encontra-se uma célula hospedeira microbiana que expressa o polipeptídeo de acordo com a presente invenção.

15 Em uma quarta realização fornecida no presente, encontra-se um método de produção de ácido araquidônico que compreende o cultivo de uma célula hospedeira microbiana que expressa o polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1 na presença de ácido di-homo- $\gamma$ -linolênico, em que o ácido di-homo- $\gamma$ -linolênico é convertido em ácido araquidônico.

20 Em uma quinta realização, é fornecido no presente um método de produção de ácido eicosapentaenoico que compreende o cultivo de uma célula hospedeira microbiana que expressa o polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1 na presença de ácido eicosatetraenoico, em que o ácido eicosatetraenoico é convertido em ácido eicosapentaenoico.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E LISTAGENS DE SEQUÊNCIAS

25 A Fig. 1A e a Fig. 1B ilustram o processo biossintético de ácido graxo  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 e deverão ser observadas em conjunto ao considerar-se a descrição deste processo abaixo.

A Fig. 2 fornece mapas de plasmídeos para os seguintes: (A) pDMW369; e (B) pZUF17.

A presente invenção pode ser compreendida mais completamente a partir da descrição detalhada a seguir e das descrições de sequências anexas que fazem parte do presente pedido.

As sequências a seguir atendem a 37 C. F. R. §1.821-1.825

5 *(Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures – the Sequence Rules)* e são consistentes com o Padrão ST.25 (1998) da Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI) e as exigências de listagens de sequências do EPO e PCT (Regras 5.2 e 49.5 (a-bis) e Capítulo 208 e Anexo C das Instruções Administrativas). Os 10 símbolos e formato utilizados para dados de sequências de aminoácidos e de nucleotídeos atendem às regras definidas em 37 C. F. R. §1.822.

SEQ ID N° 7-19, 58, 97-100, 139, 140 e 179-195 são ORFs que codificam genes ou proteínas (ou suas partes) ou plasmídeos, conforme identificado na Tabela 1.

15

**TABELA 1**

**RESUMO DE NÚMEROS DE SEQ ID DE ÁCIDOS NUCLEICOS E PROTEÍNAS**

Descrição	Ácido nucleico SEQ ID N°	Proteína SEQ ID N°
Motivo rico em His: H(X) <sub>3</sub> H	--	1
Motivo rico em His: H(X) <sub>4</sub> H	--	2
Motivo rico em His: H(X) <sub>2</sub> HH	--	3
Motivo rico em His: H(X) <sub>3</sub> HH	--	4
Motivo rico em His: (H/Q)(X) <sub>2</sub> HH	--	5
Motivo rico em His: (H/Q)(X) <sub>3</sub> HH	--	6
Δ5 dessaturase de <i>Euglena gracilis</i> ("EgD5")	7 (1350 bp)	8 (449 AA)
Δ5 dessaturase sintética, derivada de <i>Euglena gracilis</i> , otimizada por códons para expressão em <i>Yarrowia lipolytica</i> ("EgD5S")	9 (1350 bp)	10 (449 AA)
Δ5 dessaturase de <i>Euglena anabaena</i> ("EaD5")	11 (1362 bp)	12 (454 AA)
Δ5 dessaturase sintética, derivada de <i>Euglena anabaena</i> , otimizada por códons para expressão em <i>Yarrowia lipolytica</i> ("EaD5S")	13 (1362 bp)	14 (454 AA)
Δ5 dessaturase de <i>Peridinium</i> sp CCMP626 ("RD5")	15 (1392 bp)	16 (463 AA)

Descrição	Ácido nucleico SEQ ID N°	Proteína SEQ ID N°
Δ5 dessaturase sintética, derivada de <i>Peridinium</i> sp CCMP626, otimizada por códons para expressão em <i>Yarrowia lipolytica</i> ("RD5S")	17 (1392 bp)	18 (463 AA)
Plasmídeo pDMW369	19 (8438 bp)	--
Δ5 dessaturase mutante EgD5S-HXGG (ou seja, que compreende um motivo HGGG ou HHGG)	--	58 (449 AA)
Δ5 dessaturase mutante EgD5S-HPGS (ou seja, que compreende um motivo HPGS)	--	97 (449 AA)
Plasmídeo pZUFmEaD5S	98 (8357 bp)	--
Plasmídeo pZUF17	99 (8165 bp)	--
Plasmídeo pEaD5S	100 (3983 bp)	--
Δ5 dessaturase mutante EaD5S-HPGS (ou seja, que compreende um motivo HCGG)	--	139 (454 AA)
Plasmídeo pZURD5S	140 (8480 bp)	--
Δ5 dessaturase mutante RD5S-HXGG (ou seja, que compreende um motivo HCGG ou HWGG)	--	179 (463 AA)
Motivo HPGG	--	180
Motivo HXGG	--	181
Motivo HPGX	--	182
Motivo HGGG	--	183
Motivo HHGG	--	184
Motivo HPGS	--	185
Motivo HCGG	--	186
Motivo HWGG	--	187
Motivo HAGG	--	188
Motivo HPGA	--	189
Δ5 dessaturase mutante EgD5S-HGGG	190 (1350 bp)	--
Δ5 dessaturase mutante EgD5S-HHGG	191 (1350 bp)	--
Δ5 dessaturase mutante EgD5S-HPGS	192 (1350 bp)	--
Δ5 dessaturase mutante EaD5S-HCGG	193 (1365 bp)	--
Δ5 dessaturase mutante RD5S-HCGG	194 (1392 bp)	--
Δ5 dessaturase mutante RD5S-HWGG	194 (1392 bp)	--

SEQ ID N° 20-57 correspondem a *primers* de oligonucleotídeos utilizados para realizar mutação individual do resíduo de prolina do motivo HPGG de EgD5S por meio de mutagênese dirigida a local.

SEQ ID N° 59-96 correspondem a *primers* de oligonucleotídeos 5 utilizados para realizar mutação individual do segundo resíduo de glicina do motivo HPGG de EgD5S por meio de mutagênese dirigida a local.

SEQ ID N° 101-138 correspondem a *primers* de oligonucleotídeos utilizados para realizar mutação individual do resíduo de prolina do motivo HPGG de EaD5S por meio de mutagênese dirigida a local.

10 SEQ ID N° 141-178 correspondem a *primers* de oligonucleotídeos utilizados para realizar mutação individual do resíduo de prolina do motivo HPGG de RD5S por meio de mutagênese dirigida à local.

#### DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Novas enzimas Δ5 dessaturase mutantes e genes que as 15 codificam que podem ser utilizados para manipulação dos processos bioquímicos para a produção de PUFA's saudáveis são descritos no presente. Essas Δ5 dessaturases mutantes contêm pelo menos uma mutação dentro do motivo HPGG (SEQ ID N° 10) do domínio citocromo *b*<sub>5</sub>.

PUFA's ou seus derivados são utilizados como substitutos ou 20 suplementos alimentares, particularmente fórmulas para bebês, para pacientes que sofrem alimentação intravenosa ou para evitar ou tratar de má nutrição. Alternativamente, os PUFA's purificados (ou seus derivados) podem ser incorporados em óleos de cozinha, gorduras ou margarinas formuladas de tal forma que, durante o uso normal, o paciente receberia a quantidade desejada 25 de suplementação alimentar. Os PUFA's podem também ser incorporados a fórmulas para bebês, suplementos nutricionais ou outros produtos alimentícios e podem encontrar uso como agentes redutores do colesterol ou anti-inflamatórios. Opcionalmente, as composições podem ser empregadas para

uso farmacêutico, seja humano ou veterinário.

Toda a literatura de patente e não de patente mencionada no presente é incorporada ao presente como referência.

No presente relatório descritivo, são utilizados diversos termos e 5 abreviações. São fornecidas as definições a seguir.

"Estrutura de leitura aberta" é abreviada "ORF".

"Reação em cadeia de polimerase" é abreviada "PCR".

"Coleção Norte-Americana de Cultivo de Tipos" é abreviada "ATCC".

10 "Ácido(s) graxo(s) poli-insaturado(s)" é(são) abreviado(s) "PUFA(s)".

"Triacilgliceróis" são abreviados "TAGs".

"Ácidos graxos totais" são abreviados "TFAs".

A expressão "invenção" ou "presente invenção", da forma utilizada 15 no presente, não se destina a limitar-se a nenhuma realização específica da presente invenção, mas aplica-se, de forma geral, a toda e qualquer realização da presente invenção conforme descrito nas reivindicações e no relatório descritivo.

A expressão "ácidos graxos" designa ácidos alifáticos de cadeia 20 longa (ácidos alcanoicos) com comprimentos de cadeia variáveis de cerca de C<sub>12</sub> a C<sub>22</sub>, embora sejam conhecidos ácidos com comprimento de cadeia mais longo e mais curto. Os comprimentos de cadeia predominantes são de C<sub>16</sub> a C<sub>22</sub>. A estrutura de um ácido graxo é representada por um sistema de notação simples de "X:Y", em que X é o número total de átomos de carbono ("C") no 25 ácido graxo específico e Y é o número de ligações duplas. Detalhes adicionais referentes à diferenciação entre "ácidos graxos saturados" e "ácidos graxos insaturados", "ácidos graxos monoinsaturados" e "ácidos graxos poli-insaturados" ("PUFAs") e "ácidos graxos ômega 6" ("ω-6" ou "n-6") contra

"ácidos graxos ômega 3" ("ω-3") ou ("n-3") são fornecidos na Patente Norte-Americana nº 7.238.482, que é incorporada ao presente como referência.

A nomenclatura utilizada para descrever PUFA's no presente é exibida abaixo na Tabela 2. Na coluna intitulada "Notação Abreviada", o sistema de referência ômega é utilizado para indicar o número de carbonos, o número de ligações duplas e a posição da ligação dupla mais próxima do carbono ômega, a partir do carbono ômega (que recebe o número 1 com este propósito). O restante da Tabela resume os nomes comuns de ácidos graxos ω-3 e ω-6 e seus precursores, as abreviações que serão utilizadas ao longo de todo o relatório descritivo e o nome químico de cada composto.

**TABELA 2**

**NOMENCLATURA DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS E PRECURSORES**

Nome comum	Abreviação	Nome químico	Notação abreviada
Mirístico	--	Tetradecanoico	14:0
Palmítico	Palmitato	Hexadecanoico	16:0
Palmitoleico	--	9-hexadecenoico	16:1
Esteárico	--	Octadecanoico	18:0
Oleico	--	<i>Cis</i> -9-octadecenoico	18:1
Linoleico	LA	<i>Cis</i> -9,12-octadecadienoico	18:2 ω-6
γ-Linolênico	GLA	<i>Cis</i> -6,9,12-octadecatrienoico	18:3 ω-6
Eicosadienoico	EDA	<i>Cis</i> -11,14-eicosadienoico	20:2 ω-6
Di-homo-γ-linolênico	DGLA	<i>Cis</i> -8,11,14-eicosatrienoico	20:3 ω-6
Araquidônico	ARA	<i>Cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4 ω-6

$\alpha$ -Linolênico	ALA	<i>Cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	18:3 $\omega$ -3
Estearidônico	STA	<i>Cis</i> -6,9,12,15-octadecatetraenoico	18:4 $\omega$ -3
Eicosatrienoico	ETrA	<i>Cis</i> -11,14,17-eicosatrienoico	20:3 $\omega$ -3
Sciadônico	SCI	<i>Cis</i> -5,11,14-eicosatrienoico	20:3b $\omega$ -6
Juniperônico	JUP	<i>Cis</i> -5,11,14,17-eicosatetraenoico	20:4b $\omega$ -3
Eicosatetraenoico	ETA	<i>Cis</i> -8,11,14,17-eicosatetraenoico	20:4 $\omega$ -3
Eicosapentaenoico	EPA	<i>Cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	20:5 $\omega$ -3
Docosatetraenoico	DTA	<i>Cis</i> -7,10,13,16-docosatetraenoico	22:4 $\omega$ -6
Docosapentaenoico	DPA <sub>n</sub> -6	<i>Cis</i> -4,7,10,13,16-docosapentaenoico	22:5 $\omega$ -6
Docosapentaenoico	DPA	<i>Cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenoico	22:5 $\omega$ -3
Docosa-hexaenoico	DHA	<i>Cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosa-hexaenoico	22:6 $\omega$ -3

Embora os PUFA  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 relacionados na Tabela 2 sejam os mais propensos a acúmulo nas frações de óleo de hospedeiros microbianos utilizando os métodos descritos no presente, a lista não deverá ser considerada limitadora nem completa.

5 O termo “óleo” designa uma substância de lipídio que é líquida a 25 °C e normalmente poli-insaturada. Em organismos oleaginosos, óleo constitui uma parte importante do total de lipídios. “Óleo” é composto

principalmente de triacilgliceróis ("TAGs"), mas pode também conter outros lipídios neutros, fosfolipídios e ácidos graxos livres. A composição de ácidos graxos no óleo e a composição de ácidos graxos do total de lipídio são geralmente similares; desta forma, um aumento ou 5 redução da concentração de PUFA no total de lipídio corresponderá a um aumento ou redução da concentração de PUFA no óleo e vice-versa.

"Lipídios neutros" designam os lipídios comumente encontrados em células em corpos de lipídios na forma de gorduras de armazenagem e recebem esse 10 nome porque, sob pH celular, os lipídios não contêm grupos carregados. Geralmente, eles são completamente não polares sem afinidade para água. Lipídios neutros geralmente designam mono, di e/ou triésteres de glicerol com ácidos graxos, também denominados monoacilglicerol, diacilglicerol ou triacilglicerol, respectivamente, ou, coletivamente, acilgliceróis. É necessário 15 que ocorra uma reação de hidrólise para liberar ácidos graxos livres de acilgliceróis.

O termo "triacilgliceróis" ("TAGs") designa lipídios neutros compostos de três resíduos acila graxos esterificados para uma molécula de glicerol. TAGs podem conter PUFA de cadeia longa e ácidos graxos 20 saturados, bem como ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia mais curta.

A expressão "total de ácidos graxos" ("TFAs") designa no presente a soma de todos os ácidos graxos celulares que podem ser derivados em metil ésteres de ácido graxo ("FAMEs") por meio do método de 25 transesterificação de bases (conforme conhecido na técnica) em uma dada amostra, que pode ser, por exemplo, biomassa ou óleo. Desta forma, o total de ácidos graxos inclui ácidos graxos e frações de lipídios neutros (incluindo diacilgliceróis, monoacilgliceróis e TAGs) e de frações de lipídios polares

(incluindo as frações de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina), mas não ácidos graxos livres.

A expressão "teor total de lipídio" de células é uma medida de TFAs na forma de percentual do peso de células secas ("DCW"), embora o teor 5 total de lipídios possa ser aproximado como medida de FAMEs na forma de percentual do DCW ("% DCW FAMEs"). Desta forma, o teor total de lipídios ("% DCW TFAs") é equivalente, por exemplo, a miligramas do total de ácidos graxos por cem miligramas de DCW.

A concentração de um ácido graxo no total de lipídios é expressa 10 no presente na forma de percentual em peso de TFAs ("% TFAs"), tal como miligramas do dado ácido graxo por cem miligramas de TFAs. A menos que indicado especificamente em contrário no presente relatório descritivo, a referência ao percentual de um dado ácido graxo com relação ao total de lipídios é equivalente à concentração do ácido graxo na forma de % TFAs e % 15 EPA do total de lipídios, por exemplo, é equivalente a % EPA TFAs.

As expressões "perfil de lipídios" e "composição de lipídios" são intercambiáveis e designam a quantidade de ácidos graxos individuais contidos em uma fração de lipídio específica, tal como no lipídio total ou no óleo, em que a quantidade é expressa na forma de percentual em peso de TFAs. A soma de 20 cada ácido graxo individual presente na mistura deverá ser de 100.

A expressão "processo biossintético de PUFA" designa um processo metabólico que converte ácido oleico em ácidos graxos  $\omega$ -6 tais como LA, EDA, GLA, DGLA, ARA, DTA e DPAn-6 e ácidos graxos  $\omega$ -3 tais como ALA, STA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHA. Este processo é bem descrito na 25 literatura. Vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2006/0115881-A1. Resumidamente, este processo envolve o alongamento da cadeia de carbono por meio da adição de átomos de carbono e dessaturação da molécula por meio da adição de ligações duplas, por uma

série de enzimas de dessaturação e alongamento especiais denominadas "enzimas do processo biossintético de PUFA" que estão presentes na membrana do retículo endoplasmático. Mais especificamente, "enzimas do processo biossintético de PUFA" designam qualquer uma das enzimas a seguir

5 (e genes que codificam as mencionadas enzimas) associadas à biossíntese de um PUFA, incluindo: Δ4 dessaturase, Δ5 dessaturase, Δ6 dessaturase, Δ12 dessaturase, Δ15 dessaturase, Δ17 dessaturase, Δ9 dessaturase, Δ8 dessaturase, Δ9 elongase, elongase C<sub>14/16</sub>, elongase C<sub>16/18</sub>, elongase C<sub>18/20</sub> e/ou elongase C<sub>20/22</sub>.

10 O termo "dessaturase" designa um polipeptídeo que pode ser dessaturado, ou seja, introduzir uma ligação dupla, em um ou mais ácidos graxos para produzir um ácido graxo ou precursor de interesse. Apesar do uso do sistema de referência ômega ao longo de todo o presente relatório descritivo para designar ácidos graxos específicos, é mais conveniente indicar a atividade 15 de uma dessaturase por meio de contagem a partir da extremidade carboxila do substrato utilizando o sistema delta. São de interesse específico no presente Δ5 dessaturases que realizam dessaturação de um ácido graxo entre o quinto e o sexto átomo de carbono numerados a partir da extremidade carboxil-terminal da molécula e podem, por exemplo, catalisar a conversão de DGLA 20 em ARA e/ou ETA em EPA. Outras dessaturases de ácidos graxos incluem, por exemplo: Δ8 dessaturases, Δ6 dessaturases, Δ4 dessaturases, Δ12 dessaturases, Δ15 dessaturases, Δ17 dessaturases e Δ9 dessaturases. Na técnica, Δ15 e Δ17 dessaturases também são ocasionalmente denominadas "ômega-3 dessaturases", "w-3 dessaturases" e/ou "ω-3 dessaturases", com 25 base na sua capacidade de conversão de ácidos graxos ω-6 nos seus correspondentes ω-3 (tal como conversão de LA em ALA e ARA em EPA, respectivamente). Pode ser desejável determinar empiricamente a especificidade de uma dessaturase de ácido graxo específica por meio da

transformação de um hospedeiro apropriado com o gene da dessaturase de ácido graxo e determinar o seu efeito sobre o perfil de ácido graxo do hospedeiro.

O termo "EgD5" designa uma enzima  $\Delta 5$  dessaturase (SEQ ID N° 8) isolada de *Euglena gracilis*, codificada por SEQ ID N° 7 no presente. De forma similar, o termo "EgD5S" designa uma  $\Delta 5$  dessaturase sintética derivada de *E. gracilis* que é otimizada por códons para expressão em *Yarrowia lipolytica* (ou seja, SEQ ID N° 9 e 10). Detalhes adicionais referentes a EgD5 e EgD5S são descritos no Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2007/136671.

O termo "EaD5" designa uma enzima  $\Delta 5$  dessaturase (SEQ ID N° 12) isolada de *Euglena anabaena*, codificada por SEQ ID N° 11 no presente. De forma similar, o termo "EaD5S" designa uma  $\Delta 5$  dessaturase sintética derivada de *E. anabaena* que é otimizada por códons para expressão em *Yarrowia lipolytica* (ou seja, SEQ ID N° 13 e 14). Detalhes adicionais referentes a EaD5 e EaD5S são descritos no Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2008/0274521-A1.

O termo "RD5" designa uma enzima  $\Delta 5$  dessaturase (SEQ ID N° 16) isolada de *Peridinium* sp CCMP626, codificada por SEQ ID N° 15 no presente. De forma similar, o termo "RD5S" designa uma  $\Delta 5$  dessaturase sintética derivada de *Peridinium* sp CCMP626 que é otimizada por códons para expressão em *Yarrowia lipolytica* (ou seja, SEQ ID N° 17 e 18). Detalhes adicionais referentes a RD5 e RD5S são descritos no Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2007/136646.

A expressão "domínio conservado" ou "motivo" indica um conjunto de aminoácidos conservados em posições específicas ao longo de uma sequência alinhada de proteínas com evolução relacionada. Embora os aminoácidos em outras posições possam variar entre proteínas homólogas,

aminoácidos que são altamente conservados em posições específicas indicam aminoácidos que são essenciais na estrutura, estabilidade ou atividade de uma proteína. Como eles são identificados pelo seu alto grau de conservação em sequências alinhadas de uma família de homólogos de proteína, eles podem ser utilizados como identificadores, ou "assinaturas", para determinar se uma proteína com sequência recém determinada pertence a uma família de proteínas identificada anteriormente. Motivos que são encontrados universalmente em enzimas Δ5 dessaturase de animais, plantas e fungos incluem três caixas de histidina (ou seja, H(X)<sub>3-4</sub>H (SEQ ID N° 1 e 2), H(X)<sub>2-3</sub>HH (SEQ ID N° 3 e 4) e H/Q(X)<sub>2-3</sub>HH (SEQ ID N° 5 e 6) e um motivo de ligação heme (ou seja, His-Pro-Gly-Gly ou HPGG (SEQ ID N° 180)) com o domínio citocromo *b*<sub>5</sub> fundido no terminal N.

A expressão "Δ5 dessaturase mutante" designa uma Δ5 dessaturase conforme descrito no presente que contém pelo menos uma mutação no motivo HPGG (SEQ ID N° 180) do domínio citocromo *b*<sub>5</sub>, em que a mencionada mutação resulta em uma substituição de aminoácidos, seja ela conservadora ou não conservadora). Embora a(s) mutação (ões) possa(m) incluir qualquer substituição de aminoácido, a Δ5 dessaturase mutante compreende preferencialmente um motivo mutante selecionado a partir do grupo que consiste em His-Xaa-Gly-Gly ou "HXGG" (SEQ ID N° 181) e His-Pro-Gly-Xaa ou "HPGX" (SEQ ID N° 182) e a atividade de Δ5 dessaturase da Δ5 dessaturase mutante é pelo menos aproximadamente equivalente funcionalmente à atividade de Δ5 dessaturase da Δ5 dessaturase do tipo selvagem. De maior preferência, o motivo mutante é selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID N° 183 (His-Gly-Gly-Gly ou "HGGG"), SEQ ID N° 184 (His-His-Gly-Gly ou "HHGG"), SEQ ID N° 186 (His-Cys-Gly-Gly ou "HCGG"), SEQ ID N° 187 (His-Trp-Gly-Gly ou "HWGG") e SEQ ID N° 185 (His-

Pro-Gly-Ser ou "HPGS"). Vide, por exemplo, as  $\Delta 5$  dessaturases descritas como SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 97, SEQ ID N° 139 e SEQ ID N° 179.

Cada " $\Delta 5$  dessaturase mutante" contém uma " $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem correspondente". Especificamente, a  $\Delta 5$  dessaturase mutante e a  $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem correspondente compartilham sequências de aminoácidos idênticas, com exceção de que o tipo selvagem compreenderá um motivo HPGG (SEQ ID N° 180) dentro do domínio citocromo  $b_5$ , enquanto o mutante compreenderá pelo menos uma mutação dentro desse motivo (conforme descrito acima).

Uma  $\Delta 5$  dessaturase mutante é "pelo menos aproximadamente equivalente funcionalmente" à  $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem correspondente quando a atividade enzimática e a seletividade específica da sequência  $\Delta 5$  mutante forem comparáveis com à da  $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem correspondente. Desta forma, uma  $\Delta 5$  dessaturase mutante funcionalmente equivalente possuirá atividade  $\Delta 5$  dessaturase que não é substancialmente reduzida com relação à da  $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem correspondente quando a "eficiência de conversão" de cada enzima for comparada (ou seja, uma  $\Delta 5$  dessaturase mutante possuirá pelo menos cerca de 50 a 75%, preferencialmente pelo menos cerca de 75 a 85%, de maior preferência pelo menos cerca de 85 a 95% e, de preferência superior, pelo menos cerca de 95% da atividade enzimática da  $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem). A atividade de  $\Delta 5$  dessaturase dos dois polipeptídeos pode ser substancialmente idêntica. Preferencialmente, a  $\Delta 5$  dessaturase mutante possuirá atividade enzimática e seletividade específica mais altas em comparação com as da  $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem correspondente, ou seja, pelo menos cerca de 101 a 105%, de maior preferência pelo menos cerca de 106 a 115% e, de preferência superior, pelo menos cerca de 116 a 125% da atividade enzimática da  $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem.

As expressões "eficiência de conversão" e "percentual de conversão de substrato" designam a eficiência com que uma enzima específica (tal como uma dessaturase) pode converter substrato em produto. A eficiência de conversão é medida de acordo com a fórmula a seguir:  $([\text{produto}]/[\text{substrato} + \text{produto}]) * 100$  Desta forma, "eficiência de conversão de DGLA em ARA" designa a eficiência de conversão com que o substrato, DGLA, é convertido no produto, ARA.

O termo "elongase" designa um polipeptídeo que pode alongar uma cadeia de carbono de ácido graxo para produzir um ácido com mais dois carbonos que o substrato de ácido graxo sobre o qual age a elongase. Este processo de alongamento ocorre em um mecanismo com múltiplas etapas em associação com sintase de ácido graxo, conforme descrito no Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2005/0132442. Exemplos de reações catalisadas por sistemas de elongase são a conversão de GLA em DGLA, STA em ETA e EPA em DPA.

Geralmente, a seletividade de substratos de elongases é um tanto ampla, mas segregada pelo comprimento de cadeia e pelo grau e tipo de insaturação. Uma elongase  $C_{14/16}$ , por exemplo, utilizará um substrato  $C_{14}$  (tal como ácido mirístico), uma elongase  $C_{16/18}$  utilizará um substrato  $C_{16}$  (tal como palmitato), uma elongase  $C_{18/20}$  utilizará um substrato  $C_{18}$  (tal como GLA, STA, LA, ALA) e uma elongase  $C_{20/22}$  (também denominada  $\Delta 5$  elongase) utilizará um substrato  $C_{20}$  (tal como ARA, EPA). Para os propósitos do presente, podem ser definidos dois tipos distintos de elongases  $C_{18/20}$ : uma  $\Delta 6$  elongase catalisará a conversão de GLA e STA em DGLA e ETA, respectivamente, enquanto uma  $\Delta 9$  elongase é capaz de catalisar a conversão de LA e ALA em EDA e ETrA, respectivamente.

É importante observar que algumas elongases possuem ampla especificidade e, portanto, uma única enzima pode ser capaz de catalisar

diversas reações de elongase, por exemplo, de forma a agir como uma elongase C<sub>16-18</sub> e uma elongase C<sub>18-20</sub>. Pode ser desejável determinar empiricamente a especificidade de uma elongase de ácido graxo por meio da transformação de um hospedeiro apropriado com o gene de elongase de ácido graxo e determinar o seu efeito sobre o perfil de ácido graxo do hospedeiro.

O termo "oleaginoso" designa os organismos que tendem a armazenar a sua fonte de energia na forma de óleo (Weete, em: *Fungal Lipid Biochemistry*, segunda edição, Plenum, 1980). Geralmente, o teor de óleo celular de micro-organismos oleaginosos segue uma curva sigmoide, em que a concentração de lipídios aumenta até atingir o máximo da fase de crescimento logarítmico posterior ou estacionário inicial e cai gradualmente em seguida durante as últimas fases estacionária e de morte (Yongmanitchai e Ward, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 419-25 (1991)). É comum que micro-organismos oleaginosos acumulem-se em mais de cerca de 25% do seu peso de células secas na forma de óleo.

A expressão "levedura oleaginosa" designa os micro-organismos classificados como leveduras que podem produzir óleo. Exemplos de levedura oleaginosa incluem, mas sem nenhuma limitação, os gêneros a seguir: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*. Alternativamente, os organismos classificados como leveduras que são elaborados para fabricar mais de 25% do seu peso de células secas na forma de óleo são também "oleaginosos".

O termo "aminoácido" designará a unidade estrutural química básica de uma proteína ou polipeptídeo. Os aminoácidos são identificados pelo código de uma letra ou pelo código de três letras para aminoácidos, em conformidade com os padrões IUPAC-IYUB descritos em *Nucleic Acids Research*, 13: 3021-3030 (1985) e no *Biochemical Journal*, 219 (2): 345-373 (1984).

A expressão "substituição de aminoácidos conservadores"

designa a substituição de um resíduo de aminoácido em uma dada proteína por um outro aminoácido, sem alterar a natureza química ou funcional daquela proteína. Sabe-se bem na técnica, por exemplo, que alterações em um gene que resultam na produção de um aminoácido quimicamente equivalente em um dado local (mas não afetam as propriedades estruturais e funcionais da proteína dobrada codificada) são comuns. Para os propósitos do presente, "substituições de aminoácidos conservadores" são definidas como trocas dentro de um dos cinco grupos a seguir:

1. resíduos alifáticos, não polares ou levemente polares pequenos: Ala [A], Ser [S], Thr [T] (Pro [P], Gly [G]);
2. resíduos polares com carga negativa e suas amidas: Asp [D], Asn [N], Glu [E], Gln [Q];
3. resíduos polares com carga positiva: His [H], Arg [R], Lys [K];
4. resíduos não polares alifáticos grandes: Met [M], Leu [L], Ile [I], Val [V] (Cys [C]); e
5. resíduos aromáticos grandes: Phe [F], Tyr [Y], Trp [W].

Desta forma, Ala, um aminoácido levemente hidrofóbico, pode ser substituído por um outro resíduo menos hidrofóbico (tal como Gly). De forma similar, pode-se também esperar que alterações que resultem na substituição de um resíduo com carga negativa por outro (tal como Asp por Glu) ou um resíduo com carga positiva por outro (tal como Lys por Arg) gerem um produto funcionalmente equivalente. Desta forma, as substituições de aminoácidos conservadores geralmente mantêm: a estrutura da cadeia principal de polipeptídeo na área da substituição; a carga ou hidrofobicidade da molécula no local alvo; ou o volume da cadeia lateral. Além disso, em muitos casos, também não se esperaria que alterações das partes N-terminais e C-terminais da molécula de proteína alterassem a atividade da proteína.

A expressão “substituição de aminoácidos não conservadora” designa uma substituição de aminoácidos que geralmente se espera que produza a maior alteração das propriedades de proteína. Desta forma, por exemplo, uma substituição de aminoácidos não conservadora seria aquela por meio da qual: 1) um resíduo hidrofílico é substituído por um resíduo hidrofóbico (tal como Ser ou Thr por Leu, Ile, Val); 2) um Cys ou Pro é substituído por qualquer outro resíduo; 3) um resíduo que possui uma cadeia lateral eletropositiva é substituído por um resíduo eletronegativo (tal como Lys, Arg ou His por Asp ou Glu); ou 4) um resíduo que contém uma cadeia lateral volumosa é substituído por um que não possui uma cadeia lateral (tal como Phe por Gly). Às vezes, substituições de aminoácidos não conservadoras entre dois dos cinco grupos não afetarão a atividade da proteína codificada.

As expressões “polinucleotídeo”, “sequência de polinucleotídeos”, “sequência de ácido nucleico”, “fragmento de ácido nucleico” e “fragmento de ácido nucleico isolado” são utilizadas de forma intercambiável no presente. Essas expressões englobam sequências de nucleotídeos e similares. Um polinucleotídeo pode ser um polímero de RNA ou DNA que possua fita simples ou dupla, que contenha opcionalmente bases de nucleotídeos sintéticas, não naturais ou alteradas. Um polinucleotídeo na forma de polímero de DNA pode ser compreendido por um ou mais segmentos de cDNA, DNA genômico, DNA sintético ou suas misturas. Nucleotídeos (normalmente encontrados na sua forma de 5'-monofosfato) são indicados pela sua designação de letra única conforme segue: “A” para adenilato ou desoxiadenisilato (para RNA ou DNA, respectivamente), “C” para citidilato ou desoxicitidilato, “G” para guanilato ou desoxiguanilato, “U” para uridilato, “T” para desoxitimidilato, “R” para purinas (A ou G), “Y” para pirimidinas (C ou T), “K” para G ou T, “H” para A, C ou T, “I” para inosina e “N” para qualquer nucleotídeo.

Um fragmento de ácido nucleico é “hibridizável” em outro

fragmento de ácido nucleico, tal como cDNA, DNA genômico ou molécula de RNA, quando uma forma de fita única do fragmento de ácido nucleico puder combinar-se com o outro fragmento de ácido nucleico sob as condições apropriadas de temperatura e resistência iônica de solução. As condições de hibridização e lavagem são bem conhecidas e exemplificadas em Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor NY (1989), que é incorporado ao presente como referência, particularmente o Capítulo 11 e a Tabela 11.1. As condições de temperatura e resistência iônica determinam a "estringência" da hibridização. As condições de estringência podem ser ajustadas para selecionar fragmentos moderadamente similares (tais como sequências homólogas de organismos com relação distante) até fragmentos altamente similares (tais como genes que duplicam enzimas funcionais de organismos com relação próxima). Lavagens pós-hibridização determinam as condições de estringência. Um conjunto de condições preferidas utiliza uma série de lavagens a partir de 6X SSC, 0,5% SDS à temperatura ambiente por quinze minutos, repetida em seguida com 2X SSC, 0,5% SDS a 45 °C por trinta minutos e repetida em seguida por duas vezes com 0,2X SSC, 0,5% SDS a 50 °C por trinta minutos. Um conjunto de condições estringentes de maior preferência utiliza temperaturas mais altas nas quais as lavagens são idênticas às acima, exceto pela temperatura das duas lavagens finais de trinta minutos em 0,2X SSC, 0,5% SDS, que aumentou para 60 °C. Um outro conjunto preferido de condições altamente estringentes utiliza duas lavagens finais em 0,1X SSC, 0,1% SDS a 65 °C. Um conjunto adicional de condições estringentes inclui hibridização a 0,1X SSC, 0,1% SDS, 65 °C e lavagens com 2X SSC, 0,1% SDS seguidas, por exemplo, por 0,1X SSC, 0,1% SDS.

A hibridização necessita que os dois ácidos nucleicos contenham

sequências complementares e, embora dependentes da estringência da hibridização, são possíveis faltas de coincidência entre as bases. A estringência apropriada para a hibridização de ácidos nucleicos depende do comprimento dos ácidos nucleicos e do grau de complementação, variáveis bem conhecidas na técnica. Quanto maior o grau de similaridade ou homologia entre duas sequências de nucleotídeos, maior o valor do ponto de fusão térmica ("T<sub>m</sub>") para híbridos de ácidos nucleicos que contenham essas sequências. A estabilidade relativa, correspondente a T<sub>m</sub> mais alta, de hibridizações de ácidos nucleicos cai na ordem a seguir: RNA:RNA, DNA:RNA, 10 DNA:DNA. Para híbridos com mais de cem nucleotídeos de comprimento, foram derivadas equações para cálculo da T<sub>m</sub> (vide Sambrook et al, acima, 9.50-9.51). Para hibridizações com ácidos nucleicos mais curtos, ou seja, oligonucleotídeos, a posição de falta de coincidência torna-se mais importante e o comprimento do oligonucleotídeo determina a sua especificidade (vide 15 Sambrook et al, acima, 11.7-11.8). Em uma realização, o comprimento de um ácido nucleico hibridizável é de pelo menos cerca de dez nucleotídeos. Preferencialmente, um comprimento mínimo para um ácido nucleico hibridizável é de pelo menos cerca de quinze nucleotídeos; de maior preferência, pelo menos cerca de vinte nucleotídeos; e, de preferência superior, 20 o comprimento é de pelo menos cerca de trinta nucleotídeos. Além disso, os técnicos no assunto reconhecerão que a temperatura e a concentração de sal da solução de lavagem podem ser ajustadas conforme o necessário, de acordo com fatores tais como o comprimento da sonda.

Uma "parte substancial" de uma sequência de nucleotídeos ou de 25 aminoácidos é a parte que comprehende sequência de aminoácidos suficiente de um polipeptídeo ou a sequência de nucleotídeos de um gene para supostamente identificar aquele polipeptídeo ou gene, seja por meio de avaliação manual da sequência pelos técnicos no assunto ou por comparação

e identificação computadorizada de sequências utilizando algoritmos tais como Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (“BLAST”) (Altschul, S. F. et al, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1993)). Geralmente, uma sequência de dez ou mais aminoácidos contíguos ou trinta ou mais nucleotídeos é necessária para

5 identificar supostamente uma sequência de ácidos nucleicos ou polipeptídeos como homóloga a uma proteína ou gene conhecido. Além disso, com relação a sequências de nucleotídeos, sondas de oligonucleotídeos específicas de genes que compreendem de vinte a trinta nucleotídeos contíguos podem ser utilizadas em métodos dependentes de sequência de identificação (tal como

10 hibridização Southern) e isolamento (tal como hibridização *in situ* de colônias bacterianas ou placas de bacteriófagos) de genes. Além disso, oligonucleotídeos curtos com doze a quinze bases podem ser utilizados como *primers* de amplificação em PCR a fim de obter um fragmento de ácido nucleico específico que compreende os *primers*. Consequentemente, uma

15 “parte substancial” de uma sequência de nucleotídeos compreende sequência suficiente para identificar especificamente e/ou isolar um fragmento de ácido nucleico que compreende a sequência. O presente relatório descritivo ensina a sequência de nucleotídeos e aminoácidos completa que codifica proteínas microbianas específicas. Os técnicos no assunto, conhecendo o benefício das

20 sequências relatadas no presente, podem agora utilizar as sequências descritas, no todo ou em uma parte substancial, para os propósitos conhecidos dos técnicos no assunto. Consequentemente, as sequências completas conforme relatado na Listagem de Sequências anexa, bem como partes substanciais dessas sequências conforme definido acima, são englobadas no

25 presente relatório descritivo.

O termo “complementar” é utilizado para descrever o relacionamento entre bases de nucleotídeos que são capazes de hibridizar-se entre si. Com relação ao DNA, por exemplo, adenosa é complementar a

timina e citosina é complementar a guanina. Consequentemente, fragmentos de ácido nucleico isolados que são complementares às sequências completas relatadas na Listagem de Sequências anexa, bem como as sequências de ácidos nucleicos substancialmente similares, são englobados pelo presente 5 relatório descritivo.

Os termos "homologia" e "homólogo" são utilizados de forma intercambiável. Eles se referem a fragmentos de ácidos nucleicos em que as alterações em uma ou mais bases de nucleotídeos não afetam a capacidade do fragmento de ácido nucleico de mediar a expressão genética ou produzir um 10 certo fenótipo. Esses termos também designam modificações dos fragmentos de ácido nucleico tais como a exclusão ou inserção de um ou mais nucleotídeos que não alteram substancialmente as propriedades funcionais do fragmento de ácido nucleico resultante com relação ao fragmento inicial não modificado. Compreende-se, portanto, como apreciarão os técnicos no 15 assunto, que a presente invenção engloba mais que os exemplos de sequências específicos.

Além disso, os técnicos no assunto reconhecem que sequências de ácidos nucleicos homólogas também são definidas pela sua capacidade de hibridização, sob condições moderadamente estringentes, tais como 0,5X SSC, 20 0,1% SDS, 60 °C, com as sequências exemplificadas no presente ou em qualquer parte das sequências de nucleotídeos descritas no presente e que são funcionalmente equivalentes. As condições de estringência podem ser ajustadas para selecionar fragmentos moderadamente similares, tais como sequências homólogas de organismos com relação distante, até fragmentos 25 altamente similares, tais como genes que duplicam enzimas funcionais de organismos com relação próxima.

A expressão "hibridiza-se seletivamente" inclui referência à hibridização, sob condições de hibridização estringente, de uma sequência de

ácido nucleico em uma sequência alvo de ácido nucleico especificada até um grau detectavelmente maior (tal como pelo menos duas vezes sobre o fundo) que a sua hibridização em sequências de ácido nucleico não alvo e a exclusão substancial de ácidos nucleicos não alvo. Sequências de hibridização seletiva 5 possuem tipicamente pelo menos cerca de 80% de identidade de sequências, 90% de identidade de sequências ou até 100% de identidade de sequências, inclusive (ou seja, totalmente complementares) entre si.

A expressão "condições estringentes" ou "condições de hibridização estringente" inclui referência a condições nas quais uma sonda se 10 hibridizará seletivamente na sua sequência alvo. Condições estringentes são dependentes de sequências e serão diferentes em diferentes circunstâncias. Ao controlar a estringência das condições de hibridização e/ou lavagem, 15 podem ser identificadas sequências alvo que são 100% complementares à sonda (sondagem homóloga). Alternativamente, as condições de estringência podem ser ajustadas para permitir alguma falta de coincidência nas 20 sequências, de tal forma que sejam detectados alguns graus mais baixos de similaridade (sondagem heteróloga). Geralmente, uma sonda contém menos de cerca de mil nucleotídeos de comprimento, opcionalmente menos de quinhentos nucleotídeos de comprimento.

20 Tipicamente, condições estringentes serão aquelas em que a concentração de sais é de menos de cerca de 1,5 M de íons de Na, tipicamente concentração de cerca de 0,01 a 1,0 M de íons (ou outros sais) sob pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é de pelo menos cerca de 30 °C para sondas curtas (tais como dez a cinquenta nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60 °C para sondas 25 longas (tais como mais de cinquenta nucleotídeos). Podem também ser atingidas condições estringentes com a adição de agentes de desestabilização tais como formamida. Exemplos de condições de baixa estringência incluem hibridização com uma solução tampão de 30 a 35% de formamida, 1 M NaCl,

1% dodecil sulfato de sódio ("SDS") a 37 °C e lavagem em 1X a 2X SSC (20X SSC = 3,0 M NaCl/0,3 M citrato trissódico) a 50-55 °C. Exemplos de condições de estringência moderada incluem hibridização em 40 a 45% formamida, 1 M NaCl, 1% SDS a 37 °C e lavagem em 0,5X a 1X SSC a 55 até 60 °C. Exemplos 5 de condições de alta estringência incluem hibridização em 50% formamida, 1 M NaCl, 1% SDS a 37 °C e lavagem em 0,1X SSC a 60 até 65 °C. Um conjunto adicional de condições estringentes inclui, por exemplo, hibridização a 0,1X SSC, 0,1% SDS, 65 °C e lavagens com 2X SSC, 0,1% SDS seguidas por 0,1X SSC, 0,1% SDS.

10 A especificidade é tipicamente função de lavagens pós-hibridização, em que os fatores importantes são a resistência iônica e a temperatura da solução de lavagem final. Para híbridos de DNA-DNA, a  $T_m$  pode ser calculada de forma aproximada por meio da equação de Meinkoth et al, *Anal. Biochem.*, 138: 267-284 (1984):  $T_m = 81,5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$ ; em que M é a molaridade de cátions monovalentes; %GC é o percentual de nucleotídeos de guanosina e citosina no DNA, % form é o percentual de formamida na solução de hibridização e L é o comprimento do híbrido em pares de bases. A  $T_m$  é a temperatura (sob pH e resistência iônica definidos) em que 50% de uma sequência alvo complementar 15 hibridizam-se em uma sonda perfeitamente coincidente. A  $T_m$  é reduzida em cerca de 1 °C para cada 1% de falta de coincidência; desta forma,  $T_m$ , condições de hibridização e/ou lavagem podem ser ajustadas para hibridização em sequências com a identidade desejada. Caso sejam procuradas sequências com  $\geq 90\%$  de identidade, a  $T_m$  pode ser reduzida em 10 °C. Geralmente, são 20 selecionadas condições estringentes cerca de 5 °C mais baixas que a  $T_m$  para a sequência específica e seu complemento sob pH e resistência iônica definidos. Condições severamente estringentes podem utilizar, entretanto, hibridização e/ou lavagem a 1, 2, 3 ou 4 °C menos que a  $T_m$ ; condições 25

moderadamente estringentes podem utilizar hibridização e/ou lavagem a 6, 7, 8, 9 ou 10 °C menos que a  $T_m$ ; e condições de baixa estringência podem utilizar hibridização e/ou lavagem a 11, 12, 13, 14, 15 ou 20 °C menos que a  $T_m$ . Utilizando a equação, composições de lavagem e hibridização e  $T_m$  desejadas, os técnicos comuns no assunto compreenderão que são 5 inherentemente descritas variações na estringência de soluções de lavagem e/ou hibridização. Caso o grau desejado de falta de emparelhamento resulte em  $T_m$  de menos de 45 °C (solução aquosa) ou 32 °C (solução de formamida), é ideal aumentar a concentração de SSC de forma que possa ser utilizada 10 temperatura mais alta. Um extenso guia da hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2, *Overview of Principles of Hybridization and the Strategy of Nucleic Acid Probe Assays*, Elsevier, Nova Iorque (1993); e *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 15 2, Ausubel et al, Eds., Greene Publishing e Wiley-Interscience, Nova Iorque (1995). As condições de hibridização e/ou lavagem podem ser aplicadas por pelo menos dez, trinta, sessenta, noventa, 120 ou 240 minutos.

“Identidade de sequências” ou “identidade”, no contexto de 20 sequências de polipeptídeos ou ácidos nucleicos, designa os resíduos de aminoácidos ou bases de ácidos nucleicos em duas sequências que são idênticas quando alinhadas para correspondência máxima ao longo de uma janela de comparação especificada.

Desta forma, “percentual de identidade de sequências” ou “percentual de identidade” indica o valor determinado por meio da comparação 25 de duas sequências alinhadas idealmente ao longo de uma janela de comparação, em que a parte da sequência de polinucleotídeos ou polipeptídeos na janela de comparação pode compreender adições ou exclusões (ou seja, intervalos) em comparação com a sequência de referência

(que não compreende adições nem exclusões) para alinhamento ideal das duas sequências. O percentual é calculado por meio de determinação da quantidade de posições em que o resíduo de aminoácidos ou base de ácido nucleico idêntico ocorre nas duas sequências para gerar o número de posições coincidentes, dividindo o número de posições coincidentes pelo número total de posições na janela de comparação e multiplicando o resultado por cem para gerar o percentual de identidade de sequências.

Métodos de determinação do “percentual de identidade” e “percentual de similaridade” são codificados em programas de computador disponíveis ao público. O percentual de identidade e o percentual de similaridade podem ser facilmente calculados por meio de métodos conhecidos, incluindo, mas sem limitações, os descritos em: 1) *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., ed.), Universidade de Oxford: Nova Iorque (1988); 2) *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., ed. 15 Academic: Nova Iorque (1993); 3) *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I (Griffin, A. M. e Griffin, H. G., Eds.), Humania: NJ (1994); 4) *Sequence Analysis in Molecular Biology* (von Heinje, G., Ed.), Academic (1987); e 5) *Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. e Devereux, J., Eds.), Stockton: Nova Iorque (1991).

20 Cálculos de percentual de identidade ou similaridade e alinhamentos de sequências podem ser determinados utilizando uma série de métodos de comparação projetados para detectar sequências homólogas, que incluem, mas sem limitações, o programa MegAlign® da suíte de computação bioinformática LASERGENE (DNASTAR® Inc., Madison WI). O alinhamento múltiplo das sequências é realizado utilizando o “método Clustal de alinhamento” que engloba diversas variedades do algoritmo, incluindo o “método Clustal V de alinhamento” e o “método Clustal W de alinhamento” (descritos por Higgins e Sharp, CABIOS, 5: 151-153 (1989); Higgins, D. G. et

al, *Comput. Appl. Biosci.*, 8: 189-191 (1992)) e encontrados no programa MegAlign® (versão 8.0.2) (acima). Após alinhamento das sequências utilizando qualquer programa Clustal, é possível obter um “percentual de identidade” observando a tabela “distâncias de sequências” no programa.

5 Para diversos alinhamentos utilizando o método Clustal V de alinhamento, os valores padrão correspondem a PENALIDADE DO INTERVALO = 10 e PENALIDADE DO COMPRIMENTO DO INTERVALO = 10. Os parâmetros padrão para alinhamentos em pares e cálculo do percentual de identidade de sequências de proteínas utilizando o método Clustal V são  
10 COMPRIMENTO DE PALAVRA = 1, PENALIDADE DO INTERVALO = 3, VISUALIZAÇÃO DO MELHOR RESULTADO = 5 e ESPAÇAMENTO EM DIAGONAIS = 5. Para ácidos nucleicos, esses parâmetros são COMPRIMENTO DE PALAVRA = 2, PENALIDADE DO INTERVALO = 5, VISUALIZAÇÃO DO MELHOR RESULTADO = 4 e ESPAÇAMENTO EM  
15 DIAGONAIS = 4.

Os parâmetros padrão de alinhamento múltiplo utilizando o método Clustal W de alinhamento correspondem a PENALIDADE DO INTERVALO = 10, PENALIDADE DO COMPRIMENTO DO INTERVALO = 0,2, Sequências Divergentes de Atraso (%) = 30, Peso de Transição de DNA = 0,5,  
20 Matriz em Peso de Proteína = Série Gonnet, Matriz em Peso de DNA = IUB.

O “método BLASTN de alinhamento” é um algoritmo fornecido pelo Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (“NCBI”) para comparar sequências de nucleotídeos utilizando parâmetros padrão, enquanto o “método BLASTP de alinhamento” é um algoritmo fornecido pelo NCBI para comparar  
25 sequências de proteína utilizando parâmetros padrão.

Os técnicos no assunto compreendem que muitos níveis de identidade de sequências são úteis na identificação de polipeptídeos de outras substâncias, em que esses polipeptídeos possuem função ou atividade idêntica

ou similar. Fragmentos de ácidos nucleicos apropriados, ou seja, polinucleotídeos isolados de acordo com o presente relatório descritivo, codificam polipeptídeos que são pelo menos cerca de 70 a 85% idênticos, enquanto fragmentos de ácidos nucleicos de maior preferência codificam 5 sequências de aminoácidos que são pelo menos cerca de 85 a 95% idênticas às sequências de aminoácidos relatadas no presente. Embora sejam descritas acima faixas preferidas, exemplos úteis de percentuais de identidade incluem qualquer percentual inteiro de 50% a 100%, tais como 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 10 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%. Também é de interesse qualquer complemento parcial ou de comprimento total desse fragmento de nucleotídeo isolado.

15 Os fragmentos de ácidos nucleicos apropriados não apenas possuem as homologias acima, mas tipicamente codificam um polipeptídeo que contém pelo menos cinquenta aminoácidos, preferencialmente pelo menos cem aminoácidos, de maior preferência pelo menos 150 aminoácidos, de preferência ainda maior pelo menos duzentos aminoácidos e, de preferência 20 superior, pelo menos 250 aminoácidos.

“Degeneração de códons” designa a natureza do código genético que permite a variação da sequência de nucleotídeos sem afetar a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo codificado. Consequentemente, é descrito no presente qualquer fragmento de ácido nucleico que codifica, no todo ou em 25 parte substancial, a sequência de aminoácidos que codifica os polipeptídeos do presente conforme descrito em SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 97, SEQ ID N° 139 e SEQ ID N° 179. Os técnicos no assunto conhecem bem a “orientação de códon” exibida por uma célula hospedeira específica no uso de códons de

nucleotídeos para especificar um dado aminoácido. Ao sintetizar um gene para aumento da expressão em uma célula hospedeira, portanto, é desejável projetar o gene de tal forma que a sua frequência de uso de códons aproxime-se da frequência de uso de códons preferida da célula hospedeira.

5 "Genes sintéticos" podem ser reunidos a partir de blocos de construção de oligonucleotídeos que são sintetizados quimicamente utilizando procedimentos conhecidos dos técnicos no assunto. Esses blocos de construção de oligonucleotídeos são combinados e ligados em seguida para formar segmentos de genes que são montados enzimaticamente em seguida  
10 para construir todo o gene. Consequentemente, os genes podem ser elaborados para expressão genética ideal com base na otimização de sequências de nucleotídeos para refletir a orientação de códons da célula hospedeira. Os técnicos no assunto apreciam a probabilidade de expressão genética bem sucedida caso o uso do códon seja orientado para os códons  
15 favorecidos pelo hospedeiro. A determinação de códons preferidos pode ser baseada em uma pesquisa de genes derivados da célula hospedeira, na qual as informações de sequências são disponíveis. O perfil de uso de códons para *Yarrowia lipolytica* é fornecido, por exemplo, na Patente Norte-Americana nº 7.125.672.

20 "Gene" indica um fragmento de ácido nucleico que expressa uma proteína específica e que pode designar a região de codificação isoladamente ou pode incluir sequências reguladoras anteriores (sequências não codificadoras 5') e posteriores (sequências não codificadoras 3') à sequência de codificação. "Gene nativo" designa um gene conforme encontrado na  
25 natureza com as suas próprias sequências reguladoras. "Gene quimérico" indica qualquer gene que não seja um gene nativo, que compreende sequências reguladoras e de codificação que não são encontradas juntas na natureza. Consequentemente, um gene quimérico pode compreender

sequências reguladoras e sequências de codificação que são derivadas de fontes diferentes ou sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas de uma forma diferente da encontrada na natureza. “Gene endógeno” indica um gene nativo no seu local natural no genoma de um organismo. Gene “exógeno” indica um gene que é introduzido no organismo hospedeiro por meio de transferência genética. Genes exógenos podem compreender genes nativos inseridos em um organismo não nativo, genes nativos introduzidos em um novo local no hospedeiro nativo ou genes quiméricos. “Transgene” é um gene que foi introduzido no genoma por meio de um procedimento de transformação. “Gene otimizado por códons” é um gene que possui a sua frequência de uso de códons projetada para imitar a frequência de uso de códons preferida da célula hospedeira.

“Sequência de codificação” designa uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminoácidos específica. “Sequências reguladoras” designam sequências de nucleotídeos localizadas acima no fluxo (sequências não codificadoras 5’), no interior ou abaixo no fluxo (sequências não codificadoras 3’) de uma sequência de codificação e que influenciam a transcrição, processamento ou estabilidade de RNA ou tradução da sequência de codificação associada. As sequências reguladoras podem incluir, mas sem limitações: promotores, amplificadores, silenciadores, sequências líderes não traduzidas 5’ (tais como entre o local de início de transcrição e o códon de início de tradução), introns, sequências de reconhecimento de poliadenilação, locais de processamento de RNA, locais de ligação de efetores e estruturas de circuito e haste.

“Promotor” designa uma sequência de DNA capaz de controlar a expressão de uma sequência de codificação ou RNA funcional. Geralmente, uma sequência de codificação está localizada a 3’ de uma sequência

promotora. Promotores podem ser completamente derivados de um gene nativo ou ser compostos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados na natureza, ou mesmo compreender segmentos de DNA sintéticos. Os técnicos no assunto compreendem que diferentes 5 promotores podem dirigir a expressão de um gene em diferentes tecidos ou tipos de células, ou em diferentes estágios de desenvolvimento, ou em resposta a diferentes condições ambientais. Promotores que causam a expressão de um gene na maior parte dos tipos de células na maior parte das vezes são comumente denominados "promotores constitutivos". Reconhece-se 10 ainda que, como na maior parte dos casos as fronteiras exatas de sequências reguladoras (especialmente na sua extremidade 5') não foram completamente definidas, fragmentos de DNA com alguma variação podem possuir atividade promotora idêntica.

As expressões "sequências não codificadoras 3'", "terminal de 15 transcrição" e "sequências de término" designam sequências de DNA localizadas abaixo no fluxo de uma sequência de codificação. Isso inclui sequências de reconhecimento de poliadenilação e outras sequências codificadoras de sinais reguladores capazes de afetar o processamento de mRNA ou expressão genética. O sinal de poliadenilação normalmente é 20 caracterizado por afetar a adição de características de ácido poliadenílico à extremidade 3' do precursor de mRNA. A região 3' pode influenciar a transcrição, processamento ou estabilidade de RNA ou a tradução da sequência de codificação associada.

"Transcrito de RNA" designa o produto resultante da transcrição 25 catalisada por RNA polimerase de uma sequência de DNA. Quando o transcrito de RNA for uma cópia complementar perfeita da sequência de DNA, ele é denominado transcrito primário. Um transcrito de RNA é denominado RNA maduro quando for uma sequência de RNA derivada do processamento pós-

tradução do transcrito primário. "RNA mensageiro" ou "mRNA" designa o RNA que não contém introns e que pode ser traduzido em proteína pela célula. "cDNA" designa um DNA que é complementar a um modelo de mRNA que utiliza a enzima transcriptase reversa e é sintetizado a partir dele. O cDNA 5 pode possuir fita única ou ser convertido na forma de fita dupla utilizando o fragmento *Klenow* de DNA polimerase I. RNA "com sentido" designa o transcrito de RNA que inclui o mRNA e pode ser traduzido em proteína dentro de uma célula ou *in vitro*. "RNA sem sentido" indica um transcrito de RNA que é complementar a um transcrito primário alvo ou mRNA, no todo ou em parte, e 10 que bloqueia a expressão de um gene alvo (Patente Norte-Americana nº 5.107.065).

A expressão "ligado operativamente" designa a associação de sequências de ácidos nucleicos sobre um único fragmento de ácido nucleico, de tal forma que a função de um seja afetada pelo outro. Um promotor é ligado 15 operativamente a uma sequência de codificação, por exemplo, quando for capaz de afetar a expressão daquela sequência de codificação, ou seja, aquela sequência de codificação encontra-se sob o controle transcripcional do promotor. Sequências de codificação podem ser ligadas operativamente a sequências reguladoras em orientação com ou sem sentido.

20 O termo "recombinante" designa uma combinação artificial de dois segmentos de sequências separados de outra forma, tal como por meio de síntese química ou da manipulação de segmentos isolados de ácidos nucleicos por meio de métodos de engenharia genética.

O termo "expressão", da forma utilizada no presente, indica a 25 transcrição e acúmulo estável de RNA com (mRNA) ou sem sentido. Expressão pode também designar a tradução de mRNA em uma proteína (seja ela precursora ou madura).

"Transformação" designa a transferência de uma molécula de

ácido nucleico para um organismo hospedeiro, o que resulta em herança geneticamente estável. A molécula de ácido nucleico pode ser um plasmídeo que se reproduz de forma autônoma, por exemplo, ou pode integrar-se ao genoma do organismo hospedeiro. Os organismos hospedeiros que contêm os 5 fragmentos de ácidos nucleicos transformados são denominados organismos "transgênicos", "recombinantes", "transformados" ou "transformadores".

Os termos "plasmídeo" e "vetor" designam um elemento cromossômico adicional que frequentemente conduz genes que não são parte do metabolismo central da célula e, normalmente, encontram-se na forma de 10 moléculas de DNA de fita dupla circulares. Esses elementos podem ser sequências reprodutoras autônomas, sequências integrantes de genomas, sequências de fagos ou nucleotídeos, lineares ou circulares, de um RNA ou DNA com fita simples ou dupla, derivados de qualquer fonte, em que uma série 15 de sequências de nucleotídeos uniu-se ou recombinou-se em uma única construção que é capaz de introduzir um ou mais conjuntos de expressão em uma célula.

A expressão "conjunto de expressão" designa um fragmento de DNA que contém um gene exógeno e possui elementos além do gene exógeno que permitem expressão aprimorada daquele gene em um hospedeiro 20 exógeno. Geralmente, um conjunto de expressão compreenderá a sequência de codificação de um gene selecionado e sequências reguladoras anteriores (sequências não codificadoras 5') e seguintes (sequências não codificadoras 3') que são necessárias para a expressão do produto genético selecionado. Desta forma, um conjunto de expressão é tipicamente composto de: 1) uma 25 sequência promotora; 2) uma sequência de codificação ("ORF"); e 3) uma região não traduzida 3' (ou seja, um terminal) que, em eucariotes, normalmente contém um local de poliadenilação. O(s) conjunto(s) de expressão normalmente é(são) incluído(s) em um vetor para facilitar a clonagem e

transformação. Diferentes conjuntos de expressão podem ser transformados em diferentes organismos que incluem bactérias, leveduras, plantas e células de mamíferos, desde que as sequências reguladoras corretas sejam utilizadas para cada hospedeiro.

5 As expressões "construção recombinante", "construção de expressão", "construção química", "construção" e "construção de DNA recombinante" são utilizadas de forma intercambiável no presente. Uma construção recombinante compreende uma combinação artificial de fragmentos de ácidos nucleicos, tais como sequências reguladoras e de codificação que 10 não são encontradas juntas na natureza. Uma construção de DNA recombinante pode compreender, por exemplo, sequências reguladoras e sequências de codificação que são derivadas de fontes diferentes ou sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas de uma forma diferente da encontrada na natureza. Essa 15 construção pode ser utilizada isoladamente ou pode ser empregada em conjunto com um vetor. Caso seja utilizado um vetor, a seleção do vetor depende do método que será empregado para transformar células hospedeiras como é bem conhecido dos técnicos no assunto. Pode ser utilizado, por exemplo, um vetor de plasmídeo.

20 Os técnicos no assunto conhecem bem os elementos genéticos que devem estar presentes sobre o vetor a fim de transformar, selecionar e propagar com sucesso células hospedeiras que compreendem qualquer um dos fragmentos de ácido nucleico isolados descritos no presente. Os técnicos no assunto também reconhecerão que diferentes eventos de transformação 25 independente resultarão em níveis e padrões de expressão diferentes (Jones et al, *EMBO J.*, 4: 2411-2418 (1985); De Almeida et al, *Mol. Gen. Genetics*, 218: 78-86 (1989)), de tal forma que diversos eventos devem ser selecionados a fim de obter linhagens que exibem o nível e padrão de expressão desejados. Essa

seleção pode ser realizada por meio de análise Southern de DNA, análise Northern da expressão de mRNA, análise Western da expressão de proteínas ou análise fenotípica, entre outras.

A expressão "software de análise de sequências" designa 5 qualquer algoritmo de computador ou programa de software que seja útil para análise de sequências de nucleotideos ou de aminoácidos. "Software de análise de sequências" pode ser disponível comercialmente ou desenvolvido independentemente. Software de análise de sequências típico incluirá, mas sem limitações: 1) a suíte GCG de programas (Pacote Wisconsin Versão 9.0, 10 Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); 2) BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990)); 3) DNASTAR (DNASTAR, Inc. Madison WI); 4) Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor MI); e 5) o programa FASTA que incorpora o algoritmo de Smith-Waterman (W. R. Pearson, *Comput. Methods Genome Res.*, (*Proc. Int. Symp.*) 15 (1994), data da reunião 1992, 111-20. Editor(es): Suhai, Sandor, Plenum: Nova Iorque, NY). Dentro dessa descrição, sempre que for utilizado software de análise de sequências para análise, os resultados analíticos são baseados nos "valores padrão" do programa indicado, a menos que especificado em contrário. Da forma utilizada no presente, "valores padrão" indicarão qualquer 20 conjunto de valores ou parâmetros que são originalmente carregados com o software quando inicializado em primeiro lugar.

Os métodos de clonagem molecular e DNA recombinante padrão utilizados no presente são bem conhecidos na técnica e descritos mais completamente em Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., *Molecular 25 Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989); Silhavy, T. J., Bennan, M. L. e Enquist, L. W., *Experiments with Gene Fusions*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1984); e Ausubel, F. M. et al, *Current Protocols in*

*Molecular Biology*, publicado pela Greene Publishing Assoc. e Wiley-Interscience, Hoboken NJ (1987).

Geralmente, o acúmulo de lipídios em micro-organismos oleaginosos é acionado em resposta à relação geral entre carbono e nitrogênio no meio de crescimento. Este processo, que gera a síntese original de palmitato livre (16:0) em micro-organismos oleaginosos, é descrito em detalhes na Patente Norte-Americana nº 7.238.482. Palmitato é o precursor de derivados de ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia mais longa.

O processo metabólico em que o ácido oleico é convertido em ácidos graxos  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 envolve o alongamento da cadeia de carbono por meio da adição de átomos de carbono e dessaturação da molécula por meio da adição de ligações duplas. Isso necessita de uma série de enzimas de alongamento e dessaturação especiais presentes na membrana do retículo endoplasmático. Conforme observado, entretanto, na Fig. 1 e conforme descrito abaixo, existem diversos processos alternativos de produção de um ácido graxo  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 específico.

Especificamente, a Fig. 1 ilustra os processos descritos abaixo. Todos os processos necessitam da conversão inicial de ácido oleico em ácido linoleico ("LA"), o primeiro dos ácidos graxos  $\omega$ -6, por uma  $\Delta$ 12 dessaturase. Em seguida, utilizando o "processo de  $\Delta$ 9 elongase/ $\Delta$ 8 dessaturase" e LA como substrato, são formados ácidos graxos  $\omega$ -6 de cadeia longa conforme segue: 1) LA é convertido em ácido eicosadienoico ("EDA") por uma  $\Delta$ 9 elongase; 2) EDA é convertido em ácido di-homo- $\gamma$ -linolênico ("DGLA") por uma  $\Delta$ 8 dessaturase; 3) DGLA é convertido em ácido araquidônico ("ARA") por uma  $\Delta$ 5 dessaturase; 4) ARA é convertido em ácido docosatetraenoico ("DTA") por uma elongase C<sub>20-22</sub>; e 5) DTA é convertido em ácido docosapentaenoico ("DPA-6") por uma  $\Delta$ 4 dessaturase.

O "processo de  $\Delta$ 9 elongase/ $\Delta$ 8 dessaturase" pode também utilizar ácido  $\alpha$ -linolênico ("ALA") como substrato para produzir ácidos graxos

ω-3 de cadeia longa conforme segue: 1) LA é convertido em ALA, o primeiro dos ácidos graxos ω-3, por uma  $\Delta 15$  dessaturase; 2) ALA é convertido em ácido eicosatrienoico ("ETrA") por uma  $\Delta 9$  elongase; 3) ETrA é convertido em ácido eicosatetraenoico ("ETA") por uma  $\Delta 8$  dessaturase; 4) ETA é convertido em ácido eicosapentaenoico ("EPA") por uma  $\Delta 5$  dessaturase; 5) EPA é convertido em ácido docosapentaenoico ("DPA") por uma elongase  $C_{20-22}$ ; e 6) DPA é convertido em ácido docosa-hexaenoico ("DHA") por uma  $\Delta 4$  dessaturase. Opcionalmente, ácidos graxos ω-6 podem ser convertidos em ácidos graxos ω-3. ETA e EPA são produzidos, por exemplo, a partir de DGLA 10 e ARA, respectivamente, por meio da atividade de  $\Delta 17$  dessaturase.

Processos alternados de biossíntese de ácidos graxos ω-3/ω-6 utilizam uma  $\Delta 6$  dessaturase e elongase  $C_{18-20}$ , ou seja, o "processo de  $\Delta 6$  dessaturase/ $\Delta 6$  elongase". Mais especificamente, LA e ALA podem ser convertidos em GLA e ácido estearidônico ("STA"), respectivamente, por uma 15  $\Delta 6$  dessaturase; em seguida, uma elongase  $C_{18-20}$  converte GLA em DGLA e/ou STA em ETA. PUFA's abaixo no fluxo são formados em seguida conforme descrito acima.

Contempla-se que as funcionalidades específicas que necessitam ser introduzidas em um organismo hospedeiro específico para a produção de 20 ácidos graxos ω-3/ω-6 dependerão da célula hospedeira (e seu perfil de dessaturase/elongase e/ou perfil de PUFA nativo), disponibilidade do substrato e produto(s) final(is) desejado(s). Pode-se preferir, por exemplo, a expressão do processo de  $\Delta 9$  elongase/ $\Delta 8$  dessaturase em algumas realizações, ao contrário da expressão do processo de  $\Delta 6$  dessaturase/ $\Delta 6$  elongase, pois 25 PUFA's produzidos por meio do processo anterior são isentos de GLA e/ou STA.

Os técnicos no assunto serão capazes de identificar diversos genes possíveis que codificam cada uma das enzimas desejadas para a

biossíntese de ácidos graxos  $\omega$ -3/ $\omega$ -6. Sequências de elongase e dessaturase úteis podem ser derivadas de qualquer fonte, tal como isoladas de uma fonte natural (de bactérias, algas, fungos, plantas, animais etc.), produzidas por meio de um processo semissintético ou completamente sintetizadas. Embora a fonte 5 específica dos genes dessaturase e elongase introduzidos no hospedeiro não seja crítica, considerações para escolha de um polipeptídeo específico que possui atividade de dessaturase ou elongase incluem: 1) a especificidade de substrato do polipeptídeo; 2) se o polipeptídeo ou um de seus componentes é uma enzima limitadora da velocidade; 3) se a dessaturase ou elongase é 10 essencial para a síntese de um PUFA desejado; 4) cofatores exigidos pelo polipeptídeo; e/ou 5) se o polipeptídeo foi modificado após a sua produção (tal como por uma quinase ou preniltransferase). O polipeptídeo expresso possui preferencialmente parâmetros compatíveis com o ambiente bioquímico da sua localização na célula hospedeira (vide a Patente Norte-Americana nº 7.238.482 15 para detalhes adicionais).

Também será útil considerar a eficiência de conversão de cada dessaturase e/ou elongase específica. Mais especificamente, como cada enzima raramente funciona com 100% de eficiência para converter substrato em produto, o perfil final de lipídios de óleos não purificados produzidos em 20 uma célula hospedeira será tipicamente uma mistura de diversos PUFAs que consistem no ácido graxo  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 desejado, bem como diversos PUFAs intermediários acima no fluxo. Desta forma, a eficiência de conversão de cada enzima também é uma variável a ser considerada ao otimizar-se a biossíntese de um ácido graxo desejado.

25 Com cada uma das considerações acima em mente, possíveis genes que possuem as atividades de dessaturase e elongase apropriadas (tais como  $\Delta$ 6 dessaturases, elongases C<sub>18-20</sub>,  $\Delta$ 5 dessaturases,  $\Delta$ 17 dessaturases,  $\Delta$ 15 dessaturases,  $\Delta$ 9 dessaturases,  $\Delta$ 12 dessaturases, elongases C<sub>14-16</sub>,

elongases C<sub>16-18</sub>, Δ9 elongases, Δ8 dessaturases, Δ4 dessaturases e elongases C<sub>20-22</sub>) podem ser identificados de acordo com a literatura disponível ao público (tal como GenBank), a literatura de patentes e análise experimental de organismos que possuem a capacidade de produzir PUFA. Esses genes 5 serão apropriados para introdução em um organismo hospedeiro específico, para permitir ou aumentar a síntese de PUFA pelo organismo.

Quando ácidos graxos forem sintetizados em um organismo (incluindo ácidos graxos saturados e insaturados e ácidos graxos de cadeia curta e cadeia longa), eles podem ser incorporados a triacilglicérides ("TAGs"). 10 TAGs, a unidade de armazenagem primária para ácidos graxos, são formados por uma série de reações que envolvem: 1) a esterificação de uma molécula de acil-CoA em 3-fosfato de glicerol por meio de uma aciltransferase para produzir ácido lisofosfatídico; 2) a esterificação de uma segunda molécula de acil-CoA por meio de uma aciltransferase para gerar fosfato de 1,2-diacilglicerol 15 (comumente identificado como ácido fosfatídico); 3) remoção de um fosfato por fosfatase de ácido fosfatídico para gerar 1,2-diacilglicerol; e 4) adição de um terceiro ácido graxo por meio da ação de uma aciltransferase para formar TAG.

Embora Δ5 dessaturases contenham diversas sequências conservadas (ou seja, as três caixas de histidina H(X)<sub>3-4</sub>H (SEQ ID N° 1 e 2), 20 H(X)<sub>2-3</sub>HH (SEQ ID N° 3 e 4) e H/Q(X)<sub>2-3</sub>HH (SEQ ID N° 5 e 6)) e o domínio citocromo *b*<sub>5</sub>, apenas o motivo de ligação heme (ou seja, His-Pro-Gly-Gly ou HPGG (SEQ ID N° 180)) não possui variação na sequência. Foi este motivo que foi selecionado em primeiro lugar como alvo de mutagênese. A literatura sugere que o resíduo de histidina no motivo HPGG é importante para função 25 (Sayanova, O. et al, *Plant Physiol.*, 121: 641 (1999); Guillou, H. et al, *J. Lipid Res.*, 45: 32-40 (2004); Hongsthong, A. et al, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72: 1192-1201 (2006)). Consequentemente, evitam-se substituições para o resíduo de histidina em favor de substituições para os resíduos de prolina e glicina.

Mutagênese dirigida à local foi realizada independentemente sobre a prolina e a segunda glicina no motivo HPGG de diversas  $\Delta 5$  dessaturases, seguida pela expressão dos polipeptídeos mutantes resultantes e determinação das suas atividades com relação à da enzima do tipo 5 selvagem. Surpreendentemente, foram criadas diversas  $\Delta 5$  dessaturases mutantes que compreendem motivos mutantes de aminoácidos que incluem HXGG (SEQ ID N° 181) e HPGX (SEQ ID N° 182), em que a atividade de  $\Delta 5$  dessaturase da  $\Delta 5$  dessaturase mutante foi funcionalmente equivalente à atividade de  $\Delta 5$  dessaturase da  $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem 10 correspondente.

Utilizou-se mutagênese dirigida à local mediada por oligonucleotídeos para criar mutações pontuais específicas no motivo HPGG de diversas  $\Delta 5$  dessaturases alvo. Existem diversos protocolos de mutagênese dirigida a local (tais como Ishii, T. M. et al, *Methods Enzymol.*, 293: 53–71 15 (1998); Ling, M. M. e B. H. Robinson, *Anal. Biochem.*, 254: 157–178 (1997); Braman, J. (Ed.), *In Vitro Mutagenesis Protocols*, segunda edição, Humania: Totowa, NJ (2002); Kunkel, T. A. et al, *Methods Enzymol.*, 154: 367–382 (1987); Sawano, A. e Miyawaki, A., *Nucleic Acids Res.*, 28: e78 (2000)); foi selecionado para uso, entretanto, o kit de mutagênese dirigida a local 20 *QuikChange®* (Stratagene, La Jolla, CA) com base na sua fácil implementação e alta eficiência. O procedimento básico utiliza um vetor de DNA de fita dupla superbobinado com um inserto de interesse e dois *primers* de oligonucleotídeos sintéticos que contêm a mutação desejada. Os *primers* de oligonucleotídeos, cada qual complementar a fitas opostas do vetor, são 25 estendidos durante a ciclização da temperatura por uma DNA polimerase. A incorporação dos *primers* de oligonucleotídeos gera um plasmídeo que sofreu mutação e contém incisões oscilantes. Após a ciclização da temperatura, o produto é tratado com *Dpn I* endonuclease (específica para DNA metilado e

semimetilado) como meio de digestão do modelo de DNA parental e seleção de DNA mutante recém-sintetizado. O DNA de vetor incrustado que contém as mutações desejadas é transformado em seguida e propagado em um hospedeiro *Escherichia coli*.

5 Utilizando os métodos descritos acima, todas as substituições de aminoácidos possíveis foram introduzidas por meio de mutagênese dirigida a local em uma  $\Delta 5$  dessaturase sintética, otimizada por códons para expressão em *Yarrowia lipolytica* e derivada de *Euglena gracilis* (ou seja, EgD5S; SEQ ID N° 10; Pedido de Patente Norte-Americano publicado n° 2007-0277266-A1) 10 dentro de uma construção de plasmídeo que compreende um gene FBAIN::EgD5S::Pex20 quimérico. Os mutantes foram transformados em *E. coli*, sequenciados e transformados em seguida em uma linhagem apropriada de *Y. lipolytica* elaborada anteriormente para produzir cerca de 18% de DGLA. Isso permitiu a seleção de atividade de  $\Delta 5$  dessaturase com base em análises GC e 15 a produção de ARA.

Foram identificadas muitas mutações que resultaram em uma  $\Delta 5$  dessaturase mutante completamente não funcional (ou seja, que não possui atividade de  $\Delta 5$  dessaturase detectável) ou uma  $\Delta 5$  dessaturase mutante que possui atividade de  $\Delta 5$  dessaturase substancialmente reduzida com relação à 20 enzima do tipo selvagem não mutante. Surpreendentemente, entretanto, a seleção preliminar identificou três resíduos de aminoácidos que poderão ser substituídos pela prolina no motivo HPGG e que resultaram em atividade de  $\Delta 5$  dessaturase aproximadamente equivalente ou mais alta no mutante, em comparação com a atividade de  $\Delta 5$  dessaturase na enzima do tipo selvagem 25 correspondente (ou seja, EgD5S). Desta forma, essa experimentação preliminar sugeriu que o resíduo de prolina no motivo de HPGG poderá ser substituído com diversos aminoácidos sem afetar significativamente a atividade de  $\Delta 5$  dessaturase de EgD5S.

Realizou-se experimentação similar utilizando EgD5S como modelo em reações de mutagênese dirigida a local, em que o segundo resíduo de glicina do motivo HPGG sofreu mutação. Conforme descrito acima, análises das enzimas mutantes determinaram que dois resíduos de aminoácidos foram suficientes para substituir o aminoácido do tipo selvagem (ou seja, glicina) e resultaram em uma enzima EgD5S mutante que possui atividade de  $\Delta 5$  dessaturase equivalente ou aprimorada.

Após o término das análises preliminares de substituições de aminoácidos no motivo HPGG de EgD5S conforme descrito acima, foi conduzida uma análise quantitativa dos mutantes que apresentaram desempenho igual ou superior à taxa de conversão de EgD5S do tipo selvagem por meio de retransformação de cada plasmídeo que contém EgD5S mutante na linhagem hospedeira de *Yarrowia lipolytica*. Análise de GC dos metil ésteres de ácidos graxos ("FAMEs") produzidos confirmou que a atividade de  $\Delta 5$  dessaturase de três dos cinco mutantes iniciais apresentou aumento da atividade em comparação com o EgD5S do tipo selvagem controle correspondente.

O protocolo experimental acima foi repetido utilizando uma  $\Delta 5$  dessaturase sintética, otimizado por códons para expressão em *Yarrowia lipolytica* e derivado de *Euglena anabaena* (ou seja, EaD5S; SEQ ID N° 14; Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2008-0274521-A1) e uma  $\Delta 5$  dessaturase sintética, otimizada por códons para expressão em *Y. lipolytica* e derivada de *Peridinium* sp CCMP626 (ou seja, RD5S; SEQ ID N° 18; Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2007-0271632-A1). Os resultados de toda a mutagênese dirigida a local que causaram atividade de  $\Delta 5$  dessaturase equivalente ou mais alta no mutante em comparação com a enzima do tipo selvagem correspondente (ou seja, EgD5S, EaD5S ou RD5S) encontram-se resumidos abaixo na Tabela 3 (vide Exemplos para detalhes adicionais). Os

mutantes são designados utilizando a nomenclatura em detalhes a seguir: 1) enzima do tipo selvagem; 2) hifen (-); 3) motivo HPGG mutante. Desta forma, por exemplo, a enzima mutante criada com o EgD5S otimizado por códons sintético (ou seja, SEQ ID N° 10) que contém uma substituição de histidina por 5 prolina no aminoácido 2 (ou seja, uma substituição de P2 por H) do motivo HPGG é identificada como EgD5S-HHGG.

**TABELA 3**

**MUTANTES COM MOTIVO HPGG QUE RESULTAM EM AUMENTO DA ATIVIDADE DE  $\Delta 5$**

<b>DESSATURASE</b>		
$\Delta 5$ Dessaturase Mutante	SEQ ID N° de $\Delta 5$ Dessaturase Mutante	Atividade de $\Delta 5$ Dessaturase
EgD5S-HGGG	SEQ ID N° 58	104,6%
EgD5S-HHGG	SEQ ID N° 58	103,6%
EgD5S-HPGS	SEQ ID N° 97	106,9%
EaD5S-HCGG	SEQ ID N° 139	107,9%
RD5S-HCGG	SEQ ID N° 179	138,6% *
RD5S-HWGG	SEQ ID N° 179	113,5% *

10 \* O percentual de aumento da atividade de  $\Delta 5$  dessaturase da enzima mutante com relação à enzima não mutante do tipo selvagem correspondente é relatado com base em resultados de teste iniciais e não em análise quantitativa.

15 Os dados acima não sugerem um consenso com relação a qual substituição de aminoácido específica é suficiente para produzir um polipeptídeo mutante que possua atividade de  $\Delta 5$  dessaturase mais alta. Ao

contrário dos relatórios mencionados acima na técnica, entretanto, os dados são surpreendentes ao demonstrarem que substituições para os resíduos de prolina ou glicina podem resultar em uma enzima que possui atividade de  $\Delta 5$  dessaturase mais alta que o seu pai do tipo selvagem. Consequentemente,

5 encontra-se dentro do escopo da presente invenção fornecer um polipeptídeo mutante que possui atividade  $\Delta 5$  dessaturase que compreende um motivo de aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID N° 183 (HGGG), SEQ ID N° 184 (HHGG), SEQ ID N° 186 (HCGG), SEQ ID N° 187 (HWGG) e SEQ ID N° 185 (HPGS). Preferencialmente, o polipeptídeo contém a

10 sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em: SEQ ID N° 58 (EgD5S-HGGG e EgD5S-HHGG), SEQ ID N° 97 (EgD5S-HPGS), SEQ ID N° 139 (EaD5S-HCGG) e SEQ ID N° 179 (RD5S-HCGG e RD5S-HWGG). De maior preferência, a  $\Delta 5$  dessaturase mutante: 1) compreende um motivo de aminoácido mutante selecionado a partir do grupo que consiste em:

15 SEQ ID N° 183 (HGGG), SEQ ID N° 184 (HHGG), SEQ ID N° 186 (HCGG), SEQ ID N° 187 (HWGG) e SEQ ID N° 185 (HPGS); e 2) a atividade de  $\Delta 5$  dessaturase mutante é maior com relação à  $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem correspondente que contém um motivo de aminoácido HPGG (SEQ ID N° 180).

Os técnicos no assunto apreciarão que  $\Delta 5$  dessaturases mutantes úteis não se limitam às mutações descritas acima. Na verdade, os resultados sugerem que poderá ser realizada experimentação similar utilizando qualquer enzima  $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem que contenha um motivo HPGG (SEQ ID N° 180) no domínio de citocromo  $b_5$ , de forma a elaborar uma  $\Delta 5$  dessaturase mutante que possui atividade de  $\Delta 5$  dessaturase mais alta, em que a mutação resultaria em um motivo HXGG mutante (SEQ ID N° 181) ou um motivo HPGX (SEQ ID N° 182). Uma enzima mutante que possui atividade de  $\Delta 5$  dessaturase mais alta pode ser útil para permitir aumento da produção de ácidos graxos  $\omega$ -3/ $\omega$ -6.

Seleção e mutagênese *in vitro* ou PCR à prova de erros (Leung et al, *Techniques*, 1: 11-15 (1989); Zhou et al, *Nucleic Acids Res.*, 19: 6052-6052 (1991); Spee et al, *Nucleic Acids Res.*, 21: 777-778 (1993); Melnikov et al, *Nucleic Acids Res.*, 27 (4): 1056-1062 (quinze de fevereiro de 5 1999)), por exemplo, poderão também ser empregadas como meio de obtenção de mutações de genes Δ5 dessaturase de ocorrência natural, tais como EgD5S, EaD5S ou RD5S, em que as mutações podem incluir exclusões, inserções e mutações pontuais ou suas combinações. A principal vantagem de 10 PCR à prova de erros é que todas as mutações introduzidas por meio desse método estarão dentro do gene dessaturase desejado e qualquer alteração pode ser facilmente controlada por meio de alteração das condições de PCR. Alternativamente, pode-se empregar mutagênese *in vivo* utilizando materiais disponíveis comercialmente tais como a linhagem XL1-Vermelha de *E. coli* e linhagem de mutação XL1-Vermelha de *Epicurian coli* da Stratagene (La Jolla 15 CA, Greener e Callahn, *Strategies*, 7: 32-34 (1994)). Esta linhagem apresenta deficiência em três dos processos de reparo de DNA primários (*mutS*, *mutD* e *mutT*), resultando em velocidade de mutação 5000 vezes mais alta que a do tipo selvagem. A mutagênese *in vivo* não depende da eficiência de ligação (como ocorre com PCR à prova de erros); pode ocorrer, entretanto, mutação 20 em qualquer região do vetor e as velocidades de mutação geralmente são muito mais baixas.

Também se contempla que uma enzima Δ5 dessaturase mutante com atividade de Δ5 dessaturase alterada ou amplificada pode ser construída utilizando o método de “comutação genética” (Patente Norte-Americana nº 25 5,605,793; Patente Norte-Americana nº 5.811.238; Patente Norte-Americana nº 5.830.721; Patente Norte-Americana nº 5.837.458). O método de comutação genética é particularmente atraente devido à sua fácil implementação e alta velocidade de mutagênese. O processo de comutação genética envolve a

restrição de um gene de interesse em fragmentos com tamanho específico na presença de populações adicionais de regiões de DNA com similaridade (ou diferença) com o gene de interesse. Este conjunto de fragmentos desnaturar-se-á e recombinar-se-á em seguida para criar um gene que sofreu mutação. O 5 gene que sofreu mutação é selecionado em seguida para determinar alteração da atividade. Qualquer desses métodos pode ser utilizado para criar enzimas mutantes  $\Delta 5$  dessaturase que contêm os motivos substituídos HXGG (SEQ ID N° 181) e HPGX (SEQ ID N° 182), que podem ser selecionados em seguida para aumento da atividade utilizando os métodos descritos no presente.

10 Espera-se que a introdução de genes quiméricos que codifiquem as  $\Delta 5$  dessaturases mutantes descritas no presente (ou seja, em que a mencionada  $\Delta 5$  dessaturase mutante compreende pelo menos uma mutação em uma região que codifica um motivo de aminoácido HPGG e em que a mencionada  $\Delta 5$  dessaturase mutante aumentou a atividade de  $\Delta 5$  dessaturase com relação à 15 da  $\Delta 5$  dessaturase do tipo selvagem correspondente) sob o controle dos promotores apropriados resulte em aumento da produção de ARA e/ou EPA no organismo hospedeiro transformado, respectivamente. Desta forma, são descritos no presente métodos de produção direta de PUFAs que compreendem a exposição de um substrato ácido graxo (ou seja, DGLA e/ou 20 ETA) a uma enzima dessaturase mutante descrita no presente (tal como SEQ ID N° 58 (EgD5S-HGGG e EgD5S-HHGG), SEQ ID N° 97 (EgD5S-HPGS), SEQ ID N° 139 (EaD5S-HCGG), SEQ ID N° 179 (RD5S-HCGG e RD5S-HWGG)), de tal forma que o substrato seja convertido no produto ácido graxo desejado (ou seja, ARA e/ou EPA, respectivamente).

25 Mais especificamente, é descrito no presente um método de produção de ARA em uma célula hospedeira microbiana (tal como bactéria, levedura, algas, euglenoides, estramenópilos, oomicetes e fungos), em que a célula hospedeira microbiana compreende:

a. um polipeptídeo que possui atividade de  $\Delta 5$  dessaturase que compreende um motivo de aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID N° 183 (HGGG), SEQ ID N° 184 (HHGG), SEQ ID N° 186 (HCGG), SEQ ID N° 187 (HWGG) e SEQ ID N° 185 (HPGS); e

5 b. uma fonte de DGLA;

em que a célula hospedeira é cultivada sob condições tais que a  $\Delta 5$  dessaturase mutante é expressa e o DGLA é convertido em ARA, em que o ARA é opcionalmente recuperado.

Em outro método descrito no presente, a  $\Delta 5$  dessaturase mutante 10 pode ser utilizada para conversão de ETA em EPA. Consequentemente é descrito um método de produção de EPA, em que a célula hospedeira compreende:

a. um polipeptídeo que possui atividade de  $\Delta 5$  dessaturase que compreende um motivo de aminoácido selecionado a partir do grupo que 15 consiste em: SEQ ID N° 183 (HGGG), SEQ ID N° 184 (HHGG), SEQ ID N° 186 (HCGG), SEQ ID N° 187 (HWGG) e SEQ ID N° 185 (HPGS); e

b. uma fonte de ETA;

em que a célula hospedeira é cultivada sob condições tais que a  $\Delta 5$  dessaturase mutante é expressa e o ETA é convertido em EPA, em que o 20 EPA é opcionalmente recuperado.

Alternativamente, cada gene  $\Delta 5$  dessaturase mutante e seu produto de enzima correspondente descrito no presente podem ser utilizados indiretamente para a produção de diversos PUFAs  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 (vide a Fig. 1; Patente Norte-Americana n° 7.238.482; Pedido de Patente Internacional 25 publicado n° WO 2007/136671 e Pedido de Patente Internacional publicado n° WO 2007/136646). Ocorre a produção indireta de PUFAs  $\omega$ -3/ $\omega$ -6, em que o substrato de ácido graxo é convertido indiretamente no produto ácido graxo desejado, por meio de uma ou mais etapas intermediárias ou intermediário(s)

de processo. Desta forma, contempla-se que as Δ5 dessaturases mutantes descritas no presente possam ser expressas em conjunto com genes adicionais que codificam enzimas do processo biossintético de PUFA (tais como Δ6 dessaturases, elongases C<sub>18/20</sub>, Δ17 dessaturases, Δ8 dessaturases, Δ15 dessaturases, Δ9 dessaturases, Δ12 dessaturases, elongases C<sub>14/16</sub>, elongases C<sub>16/18</sub>, Δ9 elongases, Δ5 dessaturases, Δ4 dessaturases, elongases C<sub>20/22</sub>) para resultar em níveis mais altos de produção de ácidos graxos ω-3/ω-6 de cadeia mais longa, tais como ARA, EPA, DTA, DPAn-6, DPA e/ou DHA.

Preferencialmente, as Δ5 dessaturases descritas no presente serão expressas minimamente em conjunto com uma Δ9 elongase e uma Δ8 dessaturase. As Δ5 dessaturases poderão também ser expressas minimamente em conjunto com uma Δ6 dessaturase e uma Δ6 elongase. Os genes específicos incluídos em um conjunto de expressão específico dependerão, entretanto, da célula hospedeira (e seu perfil de PUFA e/ou perfil de dessaturase/elongase), da disponibilidade de substrato e do(s) produto(s) final(is) desejado(s).

É necessário criar e introduzir uma construção recombinante que compreende um ORF que codifica uma Δ5 dessaturase mutante (ou seja, em que o mencionado mutante compreende um motivo de aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID N° 183 (HGGG), SEQ ID N° 184 (HHGG), SEQ ID N° 186 (HCGG), SEQ ID N° 187 (HWGG) e SEQ ID N° 185 (HPGS)) em uma célula hospedeira apropriada. Os técnicos no assunto conhecem materiais de recurso padrão que descrevem: 1) condições e procedimentos específicos de construção, manipulação e isolamento de macromoléculas, tais como moléculas de DNA, plasmídeos etc.; 2) geração de fragmentos de DNA recombinantes e construções de expressão recombinantes; e 3) seleção e isolamento de clones. Vide Sambrook, J.,

Fritsch, E. F. e Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989) (a seguir, "Maniatis"); Silhavy, T. J., Bennan, M. L. e Enquist, L. W., *Experiments with Gene Fusions*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1984); e Ausubel, F. M. et al, *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado pela Greene Publishing Assoc. e Wiley-Interscience, Hoboken NJ (1987).

Geralmente, a seleção de sequências incluídas na construção depende dos produtos de expressão desejados, da natureza da célula hospedeira e dos meios propostos de separação de células transformadas contra células não transformadas. Os técnicos no assunto conhecem os elementos genéticos que necessitam estarem presentes sobre o vetor de plasmídeo para transformar, selecionar e propagar com sucesso células hospedeiras que contêm o gene quimérico. Tipicamente, entretanto, o vetor ou conjunto contém sequências que dirigem a transcrição e a tradução do(s) gene(s) relevante(s), um marcador selecionável e sequências que permitem a reprodução autônoma ou integração cromossômica. Vetores apropriados compreendem uma região 5' do gene que controla o início de transcrição, ou seja, um promotor, a sequência codificadora de genes e uma região 3' do fragmento de DNA que controla o término de transcrição, ou seja, um terminal. É de preferência superior quando as duas regiões de controle são derivadas de genes da célula hospedeira transformada, embora elas não necessitem ser derivadas dos genes nativos para o hospedeiro de produção.

Regiões de controle de início de transcrição (também promotores ou regiões de controle de início) úteis para dirigir a expressão dos ORFs de Δ5 dessaturase do presente na célula hospedeira microbiana desejada são bem conhecidas. Essas regiões de controle podem compreender um promotor, amplificador, silenciador, sequências de intron, regiões 3' UTR e/ou 5' UTR e

elementos de estabilização de RNA e/ou proteína. Esses elementos podem variar de resistência e especificidade. Virtualmente qualquer promotor, ou seja, nativo, sintético ou quimérico, capaz de dirigir a expressão desses genes na célula hospedeira selecionada é apropriado, embora as regiões de transcrição e tradução da espécie hospedeira sejam particularmente úteis. A expressão em uma célula hospedeira pode ser realizada de forma induzida ou constitutiva. A expressão induzida ocorre por meio de indução da atividade de um promotor regulável ligado operativamente ao gene de interesse, enquanto a expressão constitutiva ocorre por meio do uso de um promotor constitutivo.

Quando a célula hospedeira for levedura, são fornecidas regiões de transcrição e tradução funcionais em células de levedura, particularmente da espécie hospedeira. Vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2006-0115881-A1, correspondente ao Pedido Internacional publicado nº WO 2006/052870 para regiões reguladoras de início de transcrição preferidas para uso em *Yarrowia lipolytica*. Pode ser utilizada qualquer uma dentre uma série de sequências reguladoras, dependendo se é desejada transcrição constitutiva ou induzida, da eficiência do promotor na expressão do ORF de interesse, da facilidade de construção e similares.

Descobriu-se que sequências de nucleotídeos que envolvem o códon de início de tradução "ATG" afetam a expressão em células de leveduras. Caso o polipeptídeo desejado seja mal expresso em levedura, as sequências de nucleotídeos de genes exógenos podem ser modificadas para que incluam uma sequência de início de tradução de levedura eficiente para obter expressão genética ideal. Para expressão em levedura, isso pode ser realizado por meio de mutagênese dirigida a local de um gene expresso inefficientemente por meio da sua fusão em quadro a um gene de levedura endógeno, preferencialmente um gene de alta expressão. Alternativamente, pode-se determinar a sequência de início de tradução de consenso no

hospedeiro e elaborar essa sequência na forma de genes heterólogos para sua expressão ideal no hospedeiro de interesse.

Podem ser fornecidas sequências não codificadoras 3' que codificam regiões de término de transcrição em uma construção recombinante 5 ou elas podem ser da região 3' do gene do qual foi obtida a região de início ou de um gene diferente. Um grande número de regiões de término é conhecido e funciona satisfatoriamente em uma série de hospedeiros, quando utilizadas em gêneros e espécies idênticos e diferentes dos quais foram derivadas. As regiões de término podem também ser derivadas de diversos genes nativos 10 dos hospedeiros preferidos. A região de término normalmente é selecionada mais por questão de conveniência que devido a qualquer propriedade específica. A região 3' pode também ser sintética, pois os técnicos no assunto podem utilizar as informações disponíveis para projetar e sintetizar uma 15 sequência de região 3' que funcione como um término de transcrição. Um local de término pode ser desnecessário, mas é altamente preferido.

A mera inserção de um gene em um vetor de clonagem não garante a sua expressão na velocidade, concentração, quantidade desejada etc. Em resposta à necessidade de alta velocidade de expressão, muitos 20 vetores de expressão especializados foram criados por meio de ajuste de certas propriedades que regem a transcrição, estabilidade de RNA, tradução, estabilidade de proteína e localização, limitação de oxigênio e secreção da célula hospedeira microbiana. Estas propriedades incluem: a natureza das 25 sequências promotora e de término de transcrição relevantes; o número de cópias do gene clonado (no qual cópias adicionais podem ser clonadas em uma única construção de expressão e/ou cópias adicionais podem ser introduzidas na célula hospedeira por meio de aumento do número de cópias de plasmídeo ou de integração múltipla do gene clonado no genoma); se o gene é baseado em plasmídeo ou integrado ao genoma da célula hospedeira;

o local celular final da proteína exógena sintetizada; a eficiência de tradução e a dobra correta da proteína no organismo hospedeiro; a estabilidade intrínseca do mRNA e proteína do gene clonado na célula hospedeira; e o uso de códons no gene clonado, de tal forma que a sua frequência aproxime-se da frequência 5 de uso de códons preferido da célula hospedeira. Cada um destes pode ser utilizado nos métodos e células hospedeiras descritas no presente, para otimizar ainda mais a expressão das Δ5 dessaturases mutantes.

Após a criação de uma construção recombinante que compreende pelo menos um gene quimérico que compreende um promotor, um ORF de Δ5 10 dessaturase e um terminal, ela é colocada em um vetor de plasmídeo capaz de reprodução autônoma em uma célula hospedeira ou é integrado diretamente ao genoma da célula hospedeira. A integração de conjuntos de expressão pode ocorrer aleatoriamente no interior do genoma hospedeiro ou pode ser dirigida 15 utilizando construções que contêm regiões de homologia com o genoma hospedeiro suficientes para dirigir a recombinação no interior do local hospedeiro. Quando as construções forem dirigidas para um local endógeno, as regiões reguladoras da transcrição e tradução podem ser fornecidas, no todo ou em parte, pelo local endógeno.

Quando dois ou mais genes forem expressos a partir de vetores 20 de reprodução separados, é desejável que cada vetor possua um meio diferente de seleção e não possua homologia com a(s) outra(s) construção(ões) para manter expressão estável e evitar a redisposição de elementos entre as construções. A seleção criteriosa de regiões reguladoras, 25 meios de seleção e método de propagação da(s) construção(ões) introduzida(s) pode ser determinada experimentalmente de forma que todos os genes introduzidos sejam expressos nos níveis necessários para fornecer a síntese dos produtos desejados.

As construções que compreendem o(s) gene(s) de interesse

podem ser introduzidas em uma célula hospedeira microbiana por meio de qualquer método padrão. Estes métodos incluem a transformação, tal como transformação de acetato de lítio (*Methods in Enzymology*, 194: 186-187 (1991)), impacto bolístico, eletroporação, microinjeção ou qualquer outro 5 método que introduza o(s) gene(s) de interesse na célula hospedeira.

Por conveniência, uma célula hospedeira que foi manipulada por meio de qualquer método para absorver uma sequência de DNA, tal como em um conjunto de expressão, é denominada no presente "transformada", "transformante" ou "recombinante". O hospedeiro transformado conterá pelo 10 menos uma cópia da construção de expressão e pode conter duas ou mais, dependendo se o conjunto de expressão é integrado ao genoma, amplificado ou está presente sobre um elemento extracromossômico que contém diversos números de cópias. A célula hospedeira transformada pode ser identificada por meio de seleção em busca de um marcador contido sobre a construção 15 introduzida. Alternativamente, uma construção de marcador separado pode ser cotransformada com a construção desejada, pois diversos métodos de transformação introduzem muitas moléculas de DNA em células hospedeiras.

Tipicamente, os hospedeiros transformados são selecionados pela sua capacidade de crescimento sobre meios seletivos, que podem 20 incorporar um antibiótico ou não conter um fator necessário para o crescimento do hospedeiro não transformado, tal como um nutriente ou fator de crescimento. Um gene marcador introduzido pode conferir resistência a antibióticos ou codificar uma enzima ou fator de crescimento essencial, de forma a permitir o crescimento sobre meios seletivos quando expresso no 25 hospedeiro transformado. A seleção de um hospedeiro transformado pode também ocorrer quando a proteína marcadora expressa puder ser detectada, seja direta ou indiretamente. Métodos de seleção adicionais são descritos na Patente Norte-Americana nº 7.238.482, Patente Norte-Americana nº 7.259.255

e Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2006/052870.

Após a transformação, os substratos apropriados para as Δ5 dessaturases mutantes do presente (e, opcionalmente, outras enzimas de PUFA que são coexpressas no interior da célula hospedeira) podem ser 5 produzidos pelo hospedeiro de forma natural ou transgênica ou podem ser fornecidos de forma exógena.

Diversos organismos eucarióticos são apropriados como hospedeiros, de forma a gerar um transformante que compreende Δ5 dessaturases mutantes conforme descrito no presente, incluindo bactérias, 10 leveduras, algas, estramenópilos, oomicetes, euglenoides e/ou fungos. Isso é contemplado porque o aparelho biossintético de proteínas, transcrição e tradução é altamente conservado. Desta forma, os hospedeiros apropriados podem incluir aqueles que crescem sobre uma série de estoques de alimentação, incluindo carboidratos simples ou complexos, ácidos graxos, 15 ácidos orgânicos, óleos, gliceróis e alcoóis e/ou hidrocarbonetos ao longo de uma ampla variedade de valores de pH e temperatura.

Os hospedeiros microbianos preferidos são organismos oleaginosos. Esses organismos oleaginosos são naturalmente capazes de síntese e acúmulo de óleos, em que o teor total de óleo pode compreender 20 mais de cerca de 25% do peso de células secas, de maior preferência mais de cerca de 30% do peso de células secas e, de preferência superior, mais de cerca de 40% do peso de células secas. Diversas bactérias, algas, euglenoides, musgos, fungos, leveduras e estramenópilos são naturalmente classificados como oleaginosos. Em realizações alternativas, um organismo 25 não oleaginoso pode ser geneticamente modificado para tornar-se oleaginoso, tal como uma levedura como *Saccharomyces cerevisiae*.

Em realizações de maior preferência, as células de hospedeiro microbiano são de levedura oleaginosa. Os gêneros tipicamente identificados

como levedura oleaginosa incluem, mas sem limitações: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*. Mais especificamente, ilustrações de leveduras de síntese de óleo incluem: *Rhodosporidium toruloides*, *Lipomyces starkeyii*, *L. lipoferus*, *Candida revkaufi*, 5 *C. pulcherrima*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *Trichosporon pullans*, *T. cutaneum*, *Rhodotorula glutinus*, *R. graminis*, and *Yarrowia lipolytica* (anteriormente classificada como *Candida lipolytica*). Alternativamente, a biossíntese de óleo pode ser geneticamente elaborada de tal forma que a célula hospedeira microbiana (tal como uma levedura) possa produzir mais de 25% do peso seco 10 celular em óleo e, portanto, ser considerada oleaginosa.

É de preferência superior a levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica*. Em uma realização adicional, são de preferência superior as linhagens de *Y. lipolytica* denominadas ATCC n° 20362, ATCC n° 8862, ATCC n° 18944, ATCC n° 76982 e/ou LGAM S(7) 1 (Papanikolaou, S. e Aggelis, G., 15 *Bioresour. Technol.*, 82 (1): 43-9 (2002)).

Ensinamentos específicos aplicáveis para transformação de leveduras oleaginosas (ou seja, *Yarrowia lipolytica*) incluem a Patente Norte-Americana n° 4.880.741, Patente Norte-Americana n° 5.071.764 e Chen, D. C. et al, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48 (2): 232-235 (1997). Ensinamentos específicos aplicáveis à elaboração da produção de ARA, EPA e DHA em *Y. lipolytica* são fornecidos no Pedido de Patente Norte-Americano n° 11/264784 (Pedido de Patente Internacional publicado n° WO 2006/055322), Pedido de Patente Norte-Americano n° 11/265761 (Pedido de Patente Internacional publicado n° 2006/266.641) e Pedido de Patente Norte-Americano n° 25 11/264737 (Pedido de Patente Internacional publicado n° WO 2006/052871), respectivamente.

O método preferido de expressão de genes nessa levedura é a integração de DNA linear ao genoma do hospedeiro. Integração em diversos

locais no interior do genoma pode ser particularmente útil ao desejar-se expressão de genes em alto nível, tal como no local *Ura3* (Acesso GenBank nº AJ306421), o local genético *Leu2* (acesso Genbank nº AF260230), o local genético *Lys5* (acesso Genbank nº M34929), o local genético *Aco2* (acesso Genbank nº AJ001300), o local genético *Pox3* (Pox3: acesso Genbank nº XP\_503244; ou *Aco3*: acesso Genbank nº AJ001301), o local de gene Δ12 dessaturase (Patente Norte-Americana nº 7.214.491), o local genético *Lip1* (acesso Genbank nº Z50020), o local genético *Lip2* (acesso Genbank nº AJ012632), o local genético *SCP2* (acesso Genbank nº AJ431362), o local genético *Pex3* (acesso Genbank nº CAG78565), o local genético *Pex16* (acesso Genbank nº CAG79622) e/ou o local genético *Pex10* (acesso Genbank nº CAG81606).

Métodos de seleção preferidos para uso em *Yarrowia lipolytica* são a resistência a canamicina, higromicina e o amino glicosídeo G418, bem como a capacidade de crescimento sobre meios sem uracil, leucina, lisina, triptofano ou histidina. Ácido 5-fluoro-orótico (mono-hidrato de ácido 5-fluorouracil-6-carboxílico; "5-FOA") pode também ser especialmente útil para a seleção de levedura de mutantes de *Ura*<sup>-</sup> de levedura (Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2009-0093543-A1) ou uma sintase acetohidroxiácida nativa (ou acetolactato sintase; E. C. 4.1.3.18) que confere resistência ao herbicida sulfonil ureia (Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2006/052870) é utilizada para a seleção de transformantes. Um método exclusivo de "reciclagem" de um par de marcadores de seleção preferidos para seu uso em diversas transformações sequenciais, utilizando sistemas de recombinase específicos de local, também é ensinado no Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2009-0093543-A1.

Com base no acima, é descrito no presente um método de produção de ARA ou EPA, respectivamente, que compreende:

(a) fornecimento de uma levedura oleaginosa (tal como *Yarrowia lipolytica*) que compreende:

(i) uma primeira molécula de nucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo  $\Delta 5$  dessaturase mutante, ligada operativamente a pelo

5 menos uma sequência reguladora; e

(ii) uma fonte de substrato de dessaturase que consiste em DGLA e/ou ETA, respectivamente; e

(b) cultivo da levedura da etapa (a) na presença de uma fonte de carbono fermentável apropriada em que o gene que codifica o polipeptídeo

10  $\Delta 5$  dessaturase mutante é expresso e DGLA é convertido em ARA e/ou ETA é convertido em EPA, respectivamente; e

(c) recuperação opcional do ARA e/ou EPA, respectivamente, da etapa (b).

Pode ser necessário alimentação do substrato. Em realizações preferidas, o polipeptídeo  $\Delta 5$  dessaturase mutante é selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 97, SEQ ID N° 139 e SEQ ID N° 179. Desta forma, por exemplo, a sequência de nucleotídeos do gene que codifica o polipeptídeo  $\Delta 5$  dessaturase mutante pode ser selecionada, por exemplo, a partir do grupo que consiste em SEQ ID N° 191, SEQ ID N° 192,

20 SEQ ID N° 193, SEQ ID N° 194 e SEQ ID N° 195.

Como PUFAs produzidos naturalmente em levedura oleaginosa são limitados a ácidos graxos 18:2 (ou seja, LA) e, menos comumente, ácidos graxos 18:3 (ou seja, ALA), a levedura oleaginosa pode ser geneticamente elaborada para expressar diversas enzimas necessárias para a biossíntese de PUFAs de cadeia longa (de forma a permitir a produção, por exemplo, de DPA-6, DPA e DHA), além das  $\Delta 5$  dessaturases mutantes descritas no presente.

Especificamente, é contemplada no presente uma levedura

oleaginosa, em que a mencionada levedura compreende:

a) uma primeira construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo  $\Delta 5$  dessaturase mutante, ligado operativamente a pelo menos uma sequência 5 reguladora; e

b) pelo menos uma construção de DNA recombinante adicional que compreende um polinucleotídeo isolado, ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, que codifica um polipeptídeo selecionado a partir do grupo que consiste em:  $\Delta 4$  dessaturase,  $\Delta 6$  10 dessaturase,  $\Delta 9$  dessaturase,  $\Delta 12$  dessaturase,  $\Delta 15$  dessaturase,  $\Delta 17$  dessaturase,  $\Delta 8$  dessaturase,  $\Delta 9$  dessaturase, elongase  $C_{14-16}$ , elongase  $C_{16-18}$ , 15 elongase  $C_{18-20}$  e elongase  $C_{20-22}$ .

Outros hospedeiros microbianos apropriados incluem bactérias oleaginosas, algas, euglenoides, estremenópilos, oomicetes e fungos. Dentro 15 desse amplo grupo de hospedeiros microbianos, são de interesse específico micro-organismos que sintetizam ácidos graxos  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 ou aqueles que podem ser geneticamente elaborados com esse propósito (tais como outras leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*). Desta forma, por exemplo, a transformação de *Mortierella alpina* (que é utilizada comercialmente para a 20 produção de ARA) com qualquer dos genes  $\Delta 5$  dessaturase do presente sob o controle de promotores indutíveis ou regulados poderá gerar um organismo transformador capaz de síntese de quantidades mais altas de ARA. O método de transformação de *M. alpina* é descrito por Mackenzie et al (*Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 4655 (2000)). De forma similar, métodos de transformação de 25 micro-organismos *Thraustochytriales* (tais como *Thraustochytrium* e *Schizochytrium*) são descritos na Patente Norte-Americana nº 7.001.772.

Independentemente do hospedeiro selecionado para expressão das  $\Delta 5$  dessaturases mutantes descritas no presente, diversos transformadores

devem ser selecionados a fim de obter uma linhagem que exibe o nível e o padrão de expressão desejados. Juretzek et al (*Yeast*, 18: 97-113 (2001), por exemplo, observam que a estabilidade de um fragmento de DNA integrado em *Yarrowia lipolytica* depende dos transformadores individuais, da linhagem 5 receptora e da plataforma de direcionamento utilizada. Essa seleção pode ser realizada por meio de análise Southern Blot de DNA (Southern, *J. Mol. Biol.*, 98: 503 (1975)), análise Northern da expressão de mRNA (Kroczek, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 618 (1-2): 133-145 (1993)), análises Western e/ou 10 Elisa da expressão de proteínas, análise fenotípica ou análise GC dos produtos de PUFA.

O conhecimento das sequências das  $\Delta 5$  dessaturases mutantes do presente será útil para manipular a biossíntese de ácidos graxos  $\omega$ -3 e/ou  $\omega$ -6 em diversas células hospedeiras. Métodos de manipulação de processos bioquímicos são bem conhecidos dos técnicos no assunto e espera-se que 15 sejam possíveis diversas manipulações para maximizar a biossíntese de ácidos graxos  $\omega$ -3 e/ou  $\omega$ -6 em leveduras oleaginosas e, particularmente, em *Yarrowia lipolytica*. Esta manipulação pode necessitar de engenharia metabólica diretamente com o processo biossintético de PUFA ou manipulação 20 adicional de processos que agregam carbono ao processo biossintético de PUFA. Os métodos úteis para a regulagem para cima dos processos bioquímicos desejáveis e regulagem para baixo dos processos bioquímicos indesejáveis são bem conhecidos dos técnicos no assunto.

Processos bioquímicos que concorrem com os processos biossintéticos de ácidos graxos  $\omega$ -3 e/ou  $\omega$ -6 para energia ou carbono ou 25 enzimas do processo biossintético de PUFA nativo que interferem com a geração de um produto final de PUFA específico, por exemplo, podem ser eliminados por meio de rompimento genético ou regulados para baixo por outros meios, tais como mRNA com sentido contrário.

Discussão detalhada de manipulações no processo bioassintético de PUFA como meio de aumento de ARA, EPA ou DHA e seus métodos associados são apresentados no Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2006/055322 (Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2006-5 0094092-A1), Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2006/052870 (Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2006-0115881-A1) e Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2006/052871 (Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2006-0110806-A1), respectivamente, e também 10 são desejáveis manipulações do processo bioassintético de TAG e do processo de degradação de TAG (e seus métodos associados).

Pode ser útil modular a expressão do processo bioassintético de ácido graxo por meio de qualquer uma das estratégias descritas acima. São fornecidos no presente, por exemplo, métodos por meio dos quais genes que codificam enzimas fundamentais no processo bioassintético de Δ9 elongase/Δ8 15 dessaturase e processo bioassintético de Δ6 dessaturase/Δ6 elongase são introduzidos em leveduras oleaginosas para a produção de ácidos graxos ω-3 e/ou ω-6. Será particularmente útil expressar os genes Δ5 dessaturase mutantes do presente em leveduras oleaginosas que naturalmente não possuem processos bioassintéticos de ácido graxo ω-3 e/ou ω-6 e coordenam a 20 expressão desses genes, para maximizar a geração de produtos de PUFA preferidos utilizando diversos meios de engenharia metabólica do organismo hospedeiro.

A célula hospedeira microbiana transformada é cultivada sob condições que otimizam a expressão de genes quiméricos (tais como 25 dessaturase e elongase) e produzem o rendimento maior e mais econômico de PUFA desejados. Geralmente, condições de meios que podem ser otimizadas incluem o tipo e a quantidade de fonte de carbono, tipo e quantidade de fonte de nitrogênio, razão entre carbono e nitrogênio, quantidade de diferentes íons

minerais, nível de oxigênio, temperatura de crescimento, pH, duração da fase de produção de biomassa, duração da fase de acúmulo de óleo e tempo e método de colheita celular. Os micro-organismos de interesse, tais como levedura oleaginosa (por exemplo, *Yarrowia lipolytica*), são geralmente 5 cultivados em um meio complexo tal como caldo de extrato de levedura, peptona e dextrose ("YPD") ou um meio mínimo definido que não contém um componente necessário para o crescimento e, desta forma, força a seleção dos conjuntos de expressão desejados (tais como Base de Nitrogênio de Levedura (DIFCO Laboratories, Detroit MI)).

10 Os meios de fermentação para os métodos e células hospedeiras descritos no presente devem conter uma fonte de carbono apropriada conforme ensinado na Patente Norte-Americana nº 7.238.482. Embora se contemple que a fonte de carbono utilizada nos métodos do presente pode englobar uma ampla variedade de fontes que contêm carbono, as fontes de carbono 15 preferidas são açúcares (tais como glicose), gliceróis e/ou ácidos graxos.

Nitrogênio pode ser fornecido a partir de uma fonte inorgânica (tal como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) ou orgânica(tal como ureia ou glutamato). Além das fontes de carbono e nitrogênio apropriadas, o meio de fermentação deve conter também 20 minerais apropriados, sais, cofatores, tampões, vitaminas e outros componentes conhecidos dos técnicos no assunto, apropriados para o crescimento do hospedeiro oleaginoso e promoção dos processos enzimáticos necessários para a produção de PUFA. Dedica-se atenção específica a diversos íons metálicos, tais como  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ , que promovem a síntese de lipídios e PUFA (Nakahara, T. et al, *Ind. Appl. Single 25 Cell Oils*, D. J. Kyle e R. Colin, Eds., págs. 61-97 (1992)).

Meios de crescimento preferidos para os métodos e células hospedeiras descritas no presente são meios comuns preparados comercialmente, tais como Base de Nitrogênio de Levedura (DIFCO

Laboratories, Detroit MI). Outros meios de crescimento sintéticos ou definidos podem também ser utilizados e o meio apropriado de crescimento das células hospedeiras transformantes será conhecido dos técnicos no assunto de microbiologia ou ciências da fermentação. Uma faixa de pH apropriada para a fermentação é tipicamente de cerca de pH 4,0 a pH 8,0, em que pH 5,5 a pH 5. 7,5 é preferido como faixa para as condições de crescimento inicial. A fermentação pode ser conduzida sob condições aeróbicas ou anaeróbicas, sendo preferidas condições microaeróbicas.

Tipicamente, o acúmulo de altos níveis de PUFA em células de leveduras oleaginosas requer um processo em duas etapas, pois o estado metabólico deve ser "equilibrado" entre o crescimento e a síntese/armazenagem de gorduras. Desta forma, de maior preferência, um processo de fermentação em duas etapas é necessário para a produção de PUFA em levedura oleaginosa (tal como *Yarrowia lipolytica*). Esta abordagem 10 é descrita na Patente Norte-Americana nº 7.238.482, bem como diversos projetos de processo de fermentação apropriados (ou seja, bateladas, 15 bateladas alimentadas e contínua) e considerações durante crescimento.

PUFA podem ser encontrados nos micro-organismos hospedeiros na forma de ácidos graxos livres ou em formas esterificadas, tais 20 como acilgliceróis, fosfolipídios, sulfolipídios ou glicolipídios, e podem ser extraídos das células hospedeiras por uma série de meios bem conhecidos na técnica. Uma análise de métodos de extração, análise de quantidade e padrões de aceitabilidade para lipídios de levedura é a de Z. Jacobs (*Critical Reviews in Biotechnology*, 12 (5/6): 463-491 (1992)). Uma breve análise do processamento 25 abaixo no fluxo também é disponível por meio de A. Singh e O. Ward (*Adv. Appl. Microbiol.*, 45: 271-312 (1997)).

Geralmente, os meios de purificação de PUFA podem incluir extração (tal como na Patente Norte-Americana nº 6.797.303 e na Patente

Norte-Americana nº 5.648.564) com solventes orgânicos, sonicação, extração de fluidos supercrítica (utilizando, por exemplo, dióxido de carbono), saponificação e meios físicos tais como prensas ou suas combinações. Vide a Patente Norte-Americana nº 7.238.482 para detalhes adicionais.

5 Existe uma série de alimentos e produtos alimentícios que incorporam ácidos graxos  $\omega$ -3 e/ou  $\omega$ -6, particularmente, por exemplo, ALA, GLA, ARA, EPA, DPA e DHA. Contempla-se que a biomassa microbiana que compreende PUFAs de cadeia longa, biomassa microbiana parcialmente purificada que compreende PUFAs, óleo microbiano purificado que  
10 compreende PUFAs e/ou PUFAs purificados funcionará em alimentos e produtos alimentícios para proporcionar os benefícios à saúde das formulações atuais. Mais especificamente, óleos que contêm ácidos graxos  $\omega$ -3 e/ou  $\omega$ -6 serão apropriados para uso em uma série de alimentos e produtos alimentícios, incluindo, mas sem limitações: análogos de alimentos, produtos de carne,  
15 produtos de cereal, alimentos cozidos, salgadinhos e derivados do leite (vide o Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2006-0094092 para detalhes).

As composições do presente podem ser utilizadas em formulações para fornecer benefícios à saúde em alimentos médicos, incluindo nutricionais médicos, suplementos alimentares, fórmulas para bebês e produtos  
20 farmacêuticos. Os técnicos no assunto de processamento e formulação de alimentos compreenderão como a quantidade e a composição dos óleos do presente podem ser adicionados ao alimento ou produto alimentício. Essa quantidade será indicada no presente como quantidade "eficaz" e dependerá do alimento ou produto alimentício, da dieta que o produto destina-se a  
25 suplementar ou da condição médica que o alimento médico ou nutricional médico destina-se a corrigir ou tratar.

#### EXEMPLOS

A presente invenção é adicionalmente descrita nos Exemplos a

seguir, que ilustram reduções para a prática da presente invenção, mas não definem completamente todas as suas variações possíveis.

#### MÉTODOS GERAIS

Os métodos de clonagem molecular e DNA recombinante padrão 5 utilizados nos Exemplos são bem conhecidos na técnica e descritos por: 1) Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989) (Maniatis); 2) T. J. Silhavy, M. L. Bennan e L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nova 10 Iorque (1984); e 3) Ausubel, F. M. et al, *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado pela Greene Publishing Assoc. e Wiley-Interscience, Hoboken NJ (1987).

Os materiais e métodos apropriados para a manutenção e crescimento de cultivos microbianos são bem conhecidos na técnica. Os 15 métodos apropriados para uso nos exemplos a seguir podem ser encontrados conforme descrito em *Manual of Methods for General Bacteriology* (Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg e G. Briggs Phillips, Eds), Sociedade Norte-Americana de Microbiologia: Washington DC (1994)); ou por Thomas D. Brock em 20 *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, segunda edição, Sinauer Associates: Sunderland, MA (1989). Todos os reagentes, enzimas de restrição e materiais utilizados para o crescimento e manutenção de células microbianas foram obtidos por meio da Aldrich Chemicals (Milwaukee WI), DIFCO Laboratories (Detroit MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg MD) ou Sigma Chemical 25 company (St. Louis MO), a menos que especificado em contrário. Linhagens de *E. coli* foram tipicamente cultivadas a 37 °C sobre placas Luria Bertani ("LB").

Clonagem molecular geral foi realizada de acordo com métodos padrão (Sambrook et al, acima). A sequência de DNA foi gerada em um

sequenciador automático ABI utilizando tecnologia de término de tintura (Patente Norte-Americana nº 5.366.860; EP 272.007) utilizando uma combinação de vetor e primers específicos de inserto. A edição de sequências foi realizada em Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor MI). Todas as sequências representam cobertura de pelo menos duas vezes nas duas direções. Foram realizadas comparações de sequências genéticas utilizando software DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison WI).

O significado das abreviações é o seguinte: "seg" indica segundo(s), "min" indica minuto(s), "h" indica hora(s), "d" indica dia(s), "μl" indica microlitro(s), "ml" indica mililitro(s), "l" indica litro(s), "μM" indica micromolar, "mM" indica milimolar, "M" indica molar, "mmol" indica milimol(es), "μmol" indica micromol(es), "g" indica grama(s), "μg" indica micrograma(s), "ng" indica nanograma(s), "U" indica unidade(s), "bp" indica par(es) de bases e "kB" indica quilobase(s).

#### 15 NOMENCLATURA DE CONJUNTOS DE EXPRESSÃO

A estrutura de um conjunto de expressão será representada por um sistema de notação simples "X::Y::Z", em que X descreve o fragmento promotor, Y descreve o fragmento de gene e Z descreve o fragmento terminal, que são todos ligados operativamente entre si.

#### 20 TRANSFORMAÇÃO E CULTIVO DE YARROWIA LIPOLYTICA

Linhagens de *Yarrowia lipolytica* com Acesso ATCC nº 20362, 76982 e 90812 foram adquiridas da Coleção Norte-Americana de Cultivos de Tipos (Rockville MD). Linhagens de *Y. lipolytica* foram tipicamente cultivadas a 28-30 °C em diversos meios, de acordo com as receitas exibidas abaixo.

25 Foram preparadas placas Agar conforme o necessário por meio da adição de 20 g/l de Ágar para cada meio líquido, de acordo com a metodologia padrão.

Meio Ágar YPD (por litro): 10 g de extrato de levedura (Difco), 20 g de bactopeptona (Difco); e 20 g de glicose.

Meio Mínimo Básico (MM) (por litro): 20 g de glicose; 1,7 g de base de nitrogênio de levedura sem aminoácidos; 1,0 g de prolina; e pH 6,1 (não ajustado).

Meios mínimos + leucina (MM + leucina ou MMLeu) (por litro):

5 Preparar meios MM conforme acima e adicionar 0,1 g de leucina.

Meio de Alta Glicose (HGM) (por litro) 80 g de glicose, 2,58 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 5,36 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5 (não necessita de ajuste).

A transformação de *Y. lipolytica* foi realizada conforme descrito no Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2009-0093543-A1, 10 incorporado ao presente como referência.

#### ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS DE YARROWIA LIPOLYTICA

Para análise de ácidos graxos, células foram recolhidas por meio de centrifugação e lipídios foram extraídos conforme descrito em Bligh, E. G. e Dyer, W. J. (*Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917 (1959)).

15 Metil ésteres de ácido graxo ("FAMES") foram preparados por meio de transesterificação do extrato de lipídios com metóxido de sódio (Roughan, G. e Nishida, I., *Arch. Biochem. Biophys.*, 276 (1): 38-46 (1990)) e analisados em seguida com um Hewlett-Packard 6890 GC equipado com uma coluna HP-INNOWAX (Hewlett-Packard) de 30 m x 0,25 mm (diâmetro 20 interno). A temperatura do forno foi de 170 °C (25 minutos de manutenção) a 185 °C a 3,5 °C/min.

Para transesterificação de bases direta, cultivo de *Yarrowia* (3 ml) foi colhido, lavado uma vez em água destilada e seco a vácuo em Speed-Vac por cinco a dez minutos. Adicionou-se metóxido de sódio (100  $\mu\text{l}$  de 1%) à amostra e a amostra foi turbilhonada em seguida e agitada por vinte minutos. 25 Após adição de três gotas de 1 M de NaCl e 400  $\mu\text{l}$  de hexano, a amostra foi turbilhonada e centrifugada. A camada superior foi removida e analisada por meio de GC conforme descrito acima.

**CONSTRUÇÃO DE LINHAGEM Y4036U DE YARROWIA LIPOLYTICA**

Linhagem Y4036U de *Y. lipolytica* (*Leu*-, *Ura*-) descrita no Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2008/073367 foi utilizada como hospedeiro nos Exemplos 2 a 4, 6 a 7 e 9 abaixo.

5 O desenvolvimento da linhagem Y4036U necessitou da construção de linhagem Y2224 (mutante resistente a FOA de uma mutação autônoma do gene *Ura3* de linhagem ATCC nº 20362 de *Yarrowia* do tipo selvagem), linhagem Y4001 (que produz 17% de EDA com um fenótipo de *Leu*), linhagem Y4001U1 (que produz 17% de EDA com um fenótipo de *Leu* e 10 *Ura*) e linhagem Y4036 (que produz 18% de DGLA com um fenótipo de *Leu*).

O genótipo final da linhagem Y4036U com relação a *Yarrowia lipolytica* ATCC nº 20362 do tipo selvagem foi o seguinte: GPD::FmD12::Pex20, YAT1::FmD12::Oct, YAT1::ME3S::Pex16, GPAT::EgD9e::Lip2, EXP1::EgD9eS::Lip, FBAINm::EgD9eS::Lip2, FBAINm::EgD8M::Pex20 (em que 15 FmD12 é um gene  $\Delta$ 12 dessaturase de *Fusarium moniliforme* (Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2005/047485); ME3S é um gene elongase C<sub>16-18</sub> otimizado por códons, derivado de *Mortierella alpina* (Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2007/046817); EgD9e é um gene  $\Delta$ 9 elongase de *Euglena gracilis* (Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 20 2007/061742); EgD9eS é um gene  $\Delta$  9 elongase otimizado por códons, derivado de *Euglena gracilis* (Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2007/061742); e EgD8M é uma  $\Delta$ 8 dessaturase mutante sintética (Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2008/073271), derivada de *Euglena gracilis* (Patente Norte-Americana nº 7.256.033)).

25

**EXEMPLO 1**

**CONSTRUÇÃO pDMW369 QUE COMPREENDE EgD5S**

O presente Exemplo descreve o plasmídeo pDMW369, que compreende um gene FBAIN::EgD5S::Pex20 quimérico (a construção de

plasmídeo é descrita no Pedido de Patente Internacional publicado n° WO 2007/136671). O plasmídeo pDMW369 (Fig. 2A; SEQ ID N° 19) continha os componentes a seguir:

**TABELA 7**

**COMPONENTES DO PLASMÍDEO PDMW369 (SEQ ID N° 19)**

Locais RE e nucleotídeos em SEQ ID N° 19	Descrição de fragmento e componentes de gene quimérico
<i>EcoR I/BsiWI</i> (6063-318)	<p>FBAIN::EgD5S::Pex20, que compreende:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• FBAIN: promotor FBAIN de <i>Yarrowia lipolytica</i> (Patente Norte-Americanan° 7.202.356)</li> <li>• EgD5S: Δ5 dessaturase otimizada por códons (SEQ ID N° 9), derivada de <i>Euglena gracilis</i></li> <li>• Pex20: sequência terminal de gene Pex20 de <i>Yarrowia</i> (acesso GenBank n° AF054613)</li> </ul>
1354-474	origem de reprodução de plasmídeo ColE1
2284-1424	gene de resistência a ampicilina (Amp <sup>R</sup> ) para seleção em <i>E. coli</i>
3183-4476	Sequência de reprodução autônoma de <i>Yarrowia</i> (ARS18; Acesso GenBank n° A17608)
6020-4533	Gene <i>Ura 3</i> de <i>Yarrowia</i> (Acesso GenBank n° AJ306421)

**EXEMPLO 2**

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES HXGG QUE RESULTAM EM AUMENTO DA ATIVIDADE DE Δ5 DESSATURASE EM EgD5S**

As mutações de aminoácidos isoladas foram conduzidas

10 utilizando pDMW369 (Exemplo 1) como modelo e dezenove pares de

oligonucleotídeos (SEQ ID N° 20-57; Tabela 8) como primers para mutação individual do resíduo de prolina do motivo HPGG de EgD5S (SEQ ID N° 10) por meio de mutagênese dirigida a local (Kit *QuickChange*, Stratagene CA), de forma a gerar todas as substituições de aminoácidos possíveis (ou seja, 5 mutantes His-Xaa-Gly-Gly (HXGG), em que Xaa pode ser qualquer aminoácido). Os plasmídeos que compreendem cada mutação foram transformados em células XL2 Azul de *E. coli* (Stratagene). Quatro colônias de cada uma das dezenove transformações foram tomadas e cultivadas individualmente em meios líquidos a 37 °C por uma noite. Plasmídeos (ou seja, 10 total de 76) foram isolados desses cultivos e sequenciados individualmente para confirmar as mutações.

O plasmídeo pDMW369 do tipo selvagem e os plasmídeos mutantes isolados foram transformados na linhagem Y4036U individualmente, conforme descrito nos Métodos Gerais. Os transformantes foram selecionados 15 sobre placas MMLeu. Após dois dias de crescimento a 30 °C, dois transformantes de cada reação de transformação foram riscados sobre placas de MMLeu novas e incubados por dois dias adicionais a 30 °C. As colônias foram utilizadas em seguida para inocular 3 ml de MMLeu em um bloco Qiagen 20 com 24 cavidades. Os blocos foram incubados em um incubador a 30 °C em agitação a 200 rpm. Após a incubação dos cultivos por dois dias, os blocos foram centrifugados, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 3 ml de HGM. Os blocos foram colocados de volta em um incubador a 30 °C em agitação a 200 rpm por cinco dias adicionais. As células foram recolhidas por meio de centrifugação, os lipídios foram extraídos, FAMEs foram preparados 25 por meio de transesterificação e analisados em seguida com GC Hewlett-Packard 6890.

A atividade de Δ5 dessaturase atribuída a cada mutação no motivo HPGG é resumida abaixo na Tabela 8. Os mutantes EgD5S são

designados de acordo com a sequência do motivo HXGG mutante (ou seja, o motivo HPGG no mutante EgD5S-HAGG continha uma substituição de P2 para A, de forma a gerar um motivo His-Ala-Gly-Gly (HAGG), enquanto EgD5S-HRGG possuía uma substituição de P2 para R etc.). A eficiência de conversão 5 foi medida de acordo com a fórmula a seguir:  $([\text{produto}]/[\text{substrato} + \text{produto}]) * 100$  Os resultados são comparados com os de EgD5S do tipo selvagem (SEQ ID N° 10) no plasmídeo pDMW369, em que a análise de GC determinou a produção de 8,8% de DGLA e 4,5% de ARA do total de lipídios pelos transformantes (ou seja, a eficiência média de conversão foi de 33,8%).

10

**TABELA 8****ATIVIDADE DE  $\Delta 5$  DESSATURASE EM MUTANTES DE MOTIVO EGDS E HXGG**

Transformante Y4036U *	Primers utilizados para construção de motivos mutantes	Eficiência média de conversão de DGLA em ARA (%)	Percentual de atividade com relação a EgD5S
EgD5S	--	33,8	100
EgD5S-HAGG	SEQ ID N° 20 e 21	31,4	92,9
EgD5S-HRGG	SEQ ID N° 22 e 23	29,7	87,9
EgD5S-HNGG	SEQ ID N° 24 e 25	30,6	88,8
EgD5S-HDGG	SEQ ID N° 26 e 27	ND**	--
EgD5S-HCGG	SEQ ID N° 28 e 29	ND**	--
EgD5S-HQGG	SEQ ID N° 30 e 31	31,2	92,3
EgD5S-HEGG	SEQ ID N° 32 e 33	ND**	--
EgD5S-HGGG	SEQ ID N° 34 e 35	33,6	99,4
EgD5S-HHGG	SEQ ID N° 36 e 37	32,8	97,0
EgD5S-HIGG	SEQ ID N° 38 e 39	28,0	82,8
EgD5S-HLGG	SEQ ID N° 40 e 41	27,4	81,1

Transformante Y4036U *	Primers utilizados para construção de motivos mutantes	Eficiência média de conversão de DGLA em ARA (%)	Percentual de atividade com relação a EgD5S
EgD5S-HKGG	SEQ ID N° 42 e 43	32,4	95,9
EgD5S-HMGG	SEQ ID N° 44 e 45	30,1	89,1
EgD5S-HFGG	SEQ ID N° 46 e 47	ND**	--
EgD5S-HSGG	SEQ ID N° 48 e 49	28,4	84,0
EgD5S-HTGG	SEQ ID N° 50 e 51	29,7	87,9
EgD5S-HWGG	SEQ ID N° 52 e 53	ND**	--
EgD5S-HYGG	SEQ ID N° 54 e 55	34,6	102
EgD5S-HVGG	SEQ ID N° 56 e 57	31,2	92,3

\* Cada gene EgD5S (mutante ou do tipo selvagem) foi expresso em pDMW369.

\*\* ND: não obteve mutante neste experimento.

Com base no acima, fica claro que o resíduo de prolina no motivo

5 HPGG pode ser substituído por diversos aminoácidos sem afetar substancialmente a atividade de  $\Delta 5$  dessaturase de EgD5S. As substituições de prolina preferidas, em que a atividade de  $\Delta 5$  dessaturase foi maior ou igual a EgD5S, estavam presentes em EgD5S-HGGG (conversão de 33,6%) e EgD5S-HYGG (conversão de 34,6%). EgD5S-HHGG (conversão de 32,8%) funcionou  
10 com 97% da atividade de  $\Delta 5$  dessaturase de EgD5S.

### EXEMPLO 3

#### IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES HPGX QUE RESULTAM EM AUMENTO DA ATIVIDADE DE

#### $\Delta 5$ DESSATURASE EM EgD5S

As mutações de aminoácidos isoladas foram conduzidas

15 utilizando pDMW369 (Exemplo 1) como modelo e dezenove pares de

oligonucleotídeos (SEQ ID N° 59 a 96; Tabela 9) como primers para mutação individual do segundo resíduo de glicina do motivo HPGG de EgD5S (SEQ ID N° 10) por meio de mutagênese dirigida a local (Kit QuickChange, Stratagene CA), de forma a gerar todas as substituições de aminoácidos possíveis (ou seja, mutantes His-Pro-Gly-Xaa (HPGX)). Após a mutagênese, os plasmídeos foram transformados em Y4036U, transformantes foram selecionados e cultivados em MMLeu e HGM e FAMEs foram preparados e analisados por meio de GC, conforme descrito no Exemplo 2.

A atividade de  $\Delta 5$  dessaturase atribuída a cada mutação no motivo HPGG é resumida abaixo na Tabela 9. Os mutantes EgD5S são designados de acordo com a sequência do motivo HPGX mutante (ou seja, o motivo HPGG no mutante EgD5S-HPGA continha uma substituição de G4 para A, de forma a gerar um motivo His-Pro-Gly-Ala (HPGA), enquanto EgD5S-HPGR possuía uma substituição de G4 para R etc.). A eficiência de conversão foi medida de acordo com a fórmula descrita no Exemplo 2. Os resultados são comparados com os de EgD5S do tipo selvagem (SEQ ID N° 10) no plasmídeo pDMW369, em que a análise de GC determinou a produção de 8,8% de DGLA e 4,5% de ARA do total de lipídios pelos transformantes (ou seja, a eficiência média de conversão foi de 33,8%).

**TABELA 9**

**ATIVIDADE DE  $\Delta 5$  DESSATURASE EM MUTANTES DE MOTIVO EGD5S E HPGX**

Transformante	Primers utilizados para construção de motivos mutantes	Eficiência média de conversão de DGLA em ARA (%)	Percentual de atividade com relação a EgD5S
Y4036U *	--	33,8	100
EgD5S-HPGA	SEQ ID N° 59 e 60	31,3	92,6

Transformante Y4036U *	Primers utilizados para construção de motivos mutantes	Eficiência média de conversão de DGLA em ARA (%)	Percentual de atividade com relação a EgD5S
EgD5S-HPGR	SEQ ID N° 61 e 62	26,9	79,6
EgD5S-HPGN	SEQ ID N° 63 e 64	31,5	93,2
EgD5S-HPGD	SEQ ID N° 65 e 66	ND**	--
EgD5S- HPGC	SEQ ID N° 67 e 68	ND**	--
EgD5S- HPGQ	SEQ ID N° 69 e 70	ND**	--
EgD5S- HPGE	SEQ ID N° 71 e 72	ND**	--
EgD5S- HPGH	SEQ ID N° 73 e 74	ND**	--
EgD5S- HPGI	SEQ ID N° 75 e 76	ND**	--
EgD5S- HPGL	SEQ ID N° 77 e 78	ND**	--
EgD5S- HPGK	SEQ ID N° 79 e 80	32,0	94,7
EgD5S- HPGM	SEQ ID N° 81 e 82	ND**	--
EgD5S- HPGF	SEQ ID N° 83 e 84	ND**	--
EgD5S- HPGP	SEQ ID N° 85 e 86	ND**	--
EgD5S- HPGS	SEQ ID N° 87 e 88	37,3	110,4
EgD5S- HPGT	SEQ ID N° 89 e 90	35,5	105,0
EgD5S- HPGW	SEQ ID N° 91 e 92	ND**	--
EgD5S- HPGY	SEQ ID N° 93 e 94	ND**	--
EgD5S- HPGV	SEQ ID N° 95 e 96	ND**	--

\* Cada gene EgD5S (mutante ou do tipo selvagem) foi expresso em pDMW369.

\*\* ND: não obteve mutante neste experimento.

Os resultados demonstraram que o segundo resíduo de glicina no motivo HPGG pode ser substituído por diversos aminoácidos sem afetar

substancialmente a atividade de  $\Delta 5$  dessaturase de EgD5S. As substituições de glicina preferidas, em que a atividade de  $\Delta 5$  dessaturase foi maior ou igual a EgD5S, estavam presentes em EgD5S-HPGS (conversão de 37,3%) e EgD5S-HPGT (conversão de 35,5%).

5

#### EXEMPLO 4

##### ANÁLISE QUANTITATIVA DE MUTANTES EGD5 COM DESEMPENHO MAIOR OU IGUAL AO NÍVEL DE EGD5S DO TIPO SELVAGEM

Ao término das análises preliminares das substituições de aminoácidos (Exemplos 2 e 3), realizou-se análise quantitativa das mutações que apresentaram desempenho aproximadamente equivalente ou acima da taxa de conversão de EgD5S (ou seja, EgD5S-HGGG, EgD5S-HHGG, EgD5S-HYGG, EgD5S-HPGS e EgD5S-HPGT). Os plasmídeos que contêm as mutações acima foram denominados HGGG pDMW369, HHGG pDMW369, HYGG pDMW369, HPGS pDMW369 e HPGT pDMW369, respectivamente. 10  
15  
20  
25  
Esses plasmídeos, junto com pDMW369, foram novamente transformados em Y4036U (Métodos Gerais) e colocados em placas sobre MMLeu. As placas foram incubadas a 30 °C por cerca de quatro dias. Doze transformantes de cada placa foram novamente riscados sobre placas MMLeu novas e incubadas a 30 °C. Os transformantes foram inoculados em 3 ml de MMLeu em um formato de blocos com 24 cavidades. Os blocos foram incubados a 30 °C a 200 rpm por dois dias. Após dois dias de crescimento, os blocos foram centrifugados, o sobrenadante foi decantado e as pelotas, novamente suspensas em HGM. Os blocos foram incubados a 30 °C por cinco dias adicionais. As células foram recolhidas por meio de centrifugação, os lipídios foram extraídos, FAMEs foram preparados por meio de transesterificação e analisados em seguida com GC Hewlett-Packard 6890.

A taxa de conversão média de DGLA em ARA de doze amostras é resumida abaixo na Tabela 10.

**TABELA 10****ATIVIDADE DE  $\Delta 5$  DESSATURASE EM MUTANTES DE MOTIVO HXGX EgD5S**

Transformante Y4036U *	Eficiência média de conversão de DGLA em ARA (%)	Percentual de atividade com relação a EgD5S
EgD5S	30,4	100
EgD5S- HGGG	31,8	104,6
EgD5S- HHGG	31,5	103,6
EgD5S- HYGG	26,0	85,5
EgD5S- HPGS	32,5	106,9
EgD5S- HPGT	30,1	99,0

\* Cada gene EgD5S (mutante ou do tipo selvagem) foi expresso em pDMW369.

5 Este experimento confirmou que as atividades de dessaturase  $\Delta 5$  de mutantes EgD5S-HGGG e EgD5S-HHGG (SEQ ID N° 58) e EgD5S-HPGS (SEQ ID N° 97) aumentaram com relação ao controle EgD5S do tipo selvagem. Uma sequência de nucleotídeos apropriada que codifica EgD5S-HGGG é descrita como SEQ ID N° 190, uma sequência apropriada que codifica EgD5S-HHGG é descrita como SEQ ID N° 191 e uma sequência de nucleotídeos apropriada que codifica EgD5S-HPGS é descrita como SEQ ID N° 192.

10

**EXEMPLO 5****GERAÇÃO DE CONSTRUÇÃO pZUFmEaD5S QUE COMPREENDE EaD5S**

O presente Exemplo descreve a construção do plasmídeo  
15 pZUFmEaD5S que comprehende um gene FBAINm::EaD5S::Pex20 quimérico. O plasmídeo pZUFmEaD5S (SEQ ID N° 98) foi construído por

meio de substituição do fragmento *Nco* I/*Not* I de pZUF17 (Fig. 2B, SEQ ID N° 99) com o fragmento EaD5S de *Nco* I/*Not* I de pEaD5S (SEQ ID N° 100) (em que o plasmídeo pEaD5S (SEQ ID N° 100) foi criado quando o gene EaD5S (SEQ ID N° 13) foi克lonado em pUC57 (Acesso GenBank n° 5 Y14837)). O produto dessa ligação foi pZUFmEaD5S, que continha, portanto, os componentes a seguir:

**TABELA 11**

**COMPONENTES DO PLASMÍDEO pZUFmEAD5S (SEQ ID N° 98)**

Locais RE e nucleotídeos em SEQ ID N° 98	Descrição de fragmento e componentes de gene quimérico
<i>Swa</i> I/ <i>Bsi</i> W I (7435-1686)	<p>FBAIN::EaD5S::Pex20, que compreende:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• FBAIN: promotor FBAIN de <i>Yarrowia lipolytica</i> (Patente Norte-Americana n° 7.202.356)</li> <li>• EaD5S: Δ5 dessaturase otimizada por códons (SEQ ID N° 13), derivada de <i>Euglena anabaena</i></li> <li>• Pex20: sequência terminal de gene Pex20 de <i>Yarrowia</i> (acesso GenBank n° AF054613)</li> </ul>
2722-1842	origem de reprodução de plasmídeo ColE1
3652-2792	gene de resistência a ampicilina (Amp <sup>R</sup> ) para seleção em <i>E. coli</i>
4554-5855	Sequência de reprodução autônoma de <i>Yarrowia</i> (ARS18; Acesso GenBank n° A17608)
7399-5898	Gene <i>Ura</i> 3 de <i>Yarrowia</i> (Acesso GenBank n° AJ306421)

**EXEMPLO 6**

10 **IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES HXGG QUE RESULTAM EM AUMENTO DA ATIVIDADE DE Δ5 DESSATURASE EM EAD5S**

As mutações de aminoácidos isoladas foram conduzidas utilizando pZUFmEaD5S (Exemplo 5) como modelo e dezenove pares de

oligonucleotídeos (SEQ ID N° 101 a 138; Tabela 12) como primers para mutação individual do resíduo de prolina do motivo HPGG de EaD5S (SEQ ID N° 14) por meio de mutagênese dirigida a local (Kit QuickChange, Stratagene CA), de forma a gerar todas as substituições de aminoácidos possíveis (ou seja, mutantes His-Xaa-Gly-Gly (HXGG)). Os plasmídeos de cada mutação foram transformados em células XL2 Azul de *E. coli*. Quatro colônias de cada uma das dezenove transformações foram tomadas e cultivadas individualmente em meios líquidos a 37 °C por uma noite. Plasmídeos (ou seja, total de 76) foram isolados desses cultivos e sequenciados individualmente para confirmar as mutações.

O plasmídeo pZUFmEaD5S do tipo selvagem e os plasmídeos mutantes isolados foram transformados na linhagem Y4036U individualmente, conforme descrito nos Métodos Gerais. Os transformantes foram selecionados sobre placas MMLeu e cultivados em seguida em meio HGM e MMLeu líquido, conforme descrito no Exemplo 2 (exceto pelo aumento da velocidade do incubador de 200 para 250 rpm). As células foram recolhidas por meio de centrifugação, os lipídios foram extraídos, FAMEs foram preparados por meio de transesterificação e analisados em seguida com GC Hewlett-Packard 6890.

As atividades de Δ5 dessaturase atribuídas a cada mutação no motivo HPGG encontram-se resumidas abaixo na Tabela 12. Os mutantes EaD5S são designados de acordo com a sequência do motivo HXGG mutante (ou seja, o motivo HPGG no mutante EaD5S-HAGG continha uma substituição de P2 para A, de forma a gerar um motivo His-Ala-Gly-Gly (HAGG), enquanto EaD5S-HRGG possuía uma substituição de P2 para R etc.). A eficiência de conversão foi medida de acordo com a fórmula a seguir:  $([\text{produto}]/[\text{substrato} + \text{produto}]) * 100$ . Os resultados são comparados com os de EaD5S do tipo selvagem (SEQ ID N° 14) no plasmídeo pZUFmEaD5S, em que análise de GC

determinou que a eficiência média de conversão de DGLA em ARA de dois transformantes foi de 25%.

**TABELA 12**

**ATIVIDADE DE  $\Delta 5$  DESSATURASE EM MUTANTES DE MOTIVO EAD5S E HXGG**

Transformante Y4036U *	Primers utilizados para construção de motivos mutantes	Eficiência média de conversão de DGLA em ARA (%)	Percentual de atividade com relação a EaD5S
EaD5S	--	25,0	100
EaD5S-HAGG	SEQ ID N° 101 e 102	26,4	105,6
EaD5S-HRGG	SEQ ID N° 103 e 104	24,9	99,0
EaD5S-HNGG	SEQ ID N° 105 e 106	23,2	92,8
EaD5S-HDGG	SEQ ID N° 107 e 108	8,3	33,2
EaD5S-HCGG	SEQ ID N° 109 e 110	26,2	104,8
EaD5S-HQGG	SEQ ID N° 111 e 112	20,7	82,8
EaD5S-HEGG	SEQ ID N° 113 e 114	8,8	35,2
EaD5S-HGGG	SEQ ID N° 115 e 116	18,9	75,6
EaD5S-HHGG	SEQ ID N° 117 e 118	20,4	81,6
EaD5S-HIGG	SEQ ID N° 119 e 120	ND**	--
EaD5S-HLGG	SEQ ID N° 121 e 122	21,1	84,4
EaD5S-HKGG	SEQ ID N° 123 e 124	25,2	100,8
EaD5S-HMGG	SEQ ID N° 125 e 126	23,6	94,4
EaD5S-HFGG	SEQ ID N° 127 e 128	21,2	84,8
EaD5S-HSGG	SEQ ID N° 129 e 130	23,0	95,6

Transformante	Primers utilizados para construção de motivos mutantes	Eficiência média de conversão de DGLA em ARA	Percentual de atividade com relação a EaD5S (%)
Y4036U *			
EaD5S-HTGG	SEQ ID N° 131 e 132	25,8	103,2
EaD5S-HWGG	SEQ ID N° 133 e 134	14,0	56,0
EaD5S-HYGG	SEQ ID N° 135 e 136	19,9	79,6
EaD5S-HVGG	SEQ ID N° 137 e 138	ND**	--

\* Cada gene EaD5S (mutante ou do tipo selvagem) foi expresso em pZuFmEaD5S.

\*\* ND: não obteve mutante neste experimento.

Com base no acima, fica claro que o resíduo de prolina no motivo HPGG pode ser substituído por diversos aminoácidos sem afetar substancialmente a atividade de Δ5 dessaturase de EaD5S. As substituições de prolina preferidas, em que a atividade de Δ5 dessaturase foi maior com relação a EaD5S, estavam presentes em EaD5S-HAGG (conversão de 26,3%), EaD5S-HCGG (conversão de 26,2%), EaD5S-HKGG (conversão de 25,2%) e EaD5S-HTGG (conversão de 25,8%).

#### ANÁLISE QUANTITATIVA DE MUTANTES EAD5 COM DESEMPENHO MAIOR OU IGUAL

##### AO NÍVEL DE EAD5S DO TIPO SELVAGEM

Foi realizada uma análise mais quantitativa dessas mutações que apresentaram atividade aproximadamente equivalente ou maior com relação à taxa de conversão de EaD5 do tipo selvagem (ou seja, EaD5S-HAGG, EaD5S-

HRGG, EaD5S-HNGG, EaD5S-HCGG, EaD5S-HHGG, EaD5S-HLGG, EaD5S-HKGG, EaD5S-HMGG, EaD5S-HFGG, EaD5S-HSGG e EaD5S-HTGG). Os plasmídeos que contêm as mutações acima foram denominados pZuFmEaD5S-HAGG, pZuFmEaD5S-HRGG, pZuFmEaD5S-5 HNGG, pZuFmEaD5S-HCGG, pZuFmEaD5S-HHGG pZuFmEaD5S-HLGG, pZuFmEaD5S-HKGG, pZuFmEaD5S-HMGG, pZuFmEaD5S-HFGG, pZuFmEaD5S-HSGG e pZuFmEaD5S-HTGG, respectivamente. Esses plasmídeos, junto com pZuFmEaD5S, foram novamente transformados em 10 Y4036U (Métodos Gerais) e colocados em placas sobre MMLeu. As placas são incubadas a 30 °C por cerca de quatro dias. Seis transformantes de cada placa foram novamente riscados sobre placas MMLeu novas e 15 incubadas a 30 °C. Os transformantes foram inoculados em 3 ml de MMLeu em um formato de blocos com 24 cavidades. Os blocos foram incubados a 30 °C a 200 rpm por dois dias. Após dois dias de crescimento, os blocos foram centrifugados, os sobrenadantes foram decantados e as pelotas foram novamente suspensas em HGM. Os blocos foram incubados a 30 °C 20 por cinco dias adicionais. As células foram recolhidas por meio de centrifugação, os lipídios foram extraídos, FAMEs foram preparados por meio de transesterificação e analisados em seguida com GC Hewlett-Packard 6890.

A taxa de conversão média de DGLA em ARA de seis amostras é resumida abaixo na Tabela 13.

TABELA 13

**ATIVIDADE DE Δ5 DESSATURASE EM MUTANTES DE MOTIVO HXGG EAD5S**

Transformante	Eficiência média de conversão de DGLA em ARA (%)	Percentual de atividade com relação a EaD5S
Y4036U *	24,0	100

EaD5S-HAGG	23,8	99,2
EaD5S-HRGG	23,0	95,8
EaD5S-HNGG	20,7	86,2
EaD5S-HCGG	25,9	107,9
EaD5S-HHGG	20,4	85,0
EaD5S-HLGG	16,7	69,6
EaD5S-HKGG	20,7	86,3
EaD5S-HMGG	23,4	97,5
EaD5S-HFGG	21,2	88,3
EaD5S-HSGG	23,8	99,2
EaD5S-HTGG	21,4	89,2

\* Cada gene EaD5S (mutante ou do tipo selvagem) foi expresso em pZuFmEaD5S.

Este experimento confirmou que a atividade de dessaturase Δ5 de mutante EaD5S-HCGG (SEQ ID N° 139) aumentou 5 com relação ao controle EaD5S do tipo selvagem. Uma sequência de nucleotídeos apropriada que codifica EaD5S-HCGG é descrita como SEQ ID N° 193.

#### EXEMPLO 7

#### GERAÇÃO DE CONSTRUÇÃO PZUFMRD5S QUE COMPREENDE RD5S

10 O presente Exemplo descreve o plasmídeo pZURD5S, que compreende um gene FBAIN::RD5S::Pex20 quimérico (a construção de plasmídeo é descrita no Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 2007/136646). O plasmídeo pZURD5S (SEQ ID N° 140) possui construção idêntica a pDMW369 (Exemplo 1, SEQ ID N° 19), com exceção da substituição de RD5S (SEQ ID N° 17) no lugar de EgD5S (SEQ ID N° 9).

EXEMPLO 8IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES HXGG QUE RESULTAM EM AUMENTO DA ATIVIDADE DE $\Delta 5$  DESSATURASE EM RD5S

As mutações de aminoácidos isoladas foram conduzidas 5 utilizando pZURD5S (Exemplo 7) como modelo e dezenove pares de oligonucleotídeos (SEQ ID N° 141 a 178; Tabela 14) como primers para mutação individual do resíduo de prolina do motivo HPGG de RD5S (SEQ ID N° 17) por meio de mutagênese dirigida a local (Kit QuickChange, Stratagene CA), de forma a gerar todas as substituições de aminoácidos possíveis (ou 10 seja, mutantes His-Xaa-Gly-Gly (HXGG)). Os plasmídeos de cada mutação foram transformados em células XL2 Azul de *E. coli*. Quatro colônias de cada uma das dezenove transformações foram tomadas e cultivadas individualmente em meios líquidos a 37 °C por uma noite. Plasmídeos (ou seja, total de 76) 15 foram isolados desses cultivos e sequenciados individualmente para confirmar as mutações.

O plasmídeo pZURD5S do tipo selvagem e os plasmídeos mutantes isolados foram transformados na linhagem Y4036U individualmente, conforme descrito nos Métodos Gerais. Os transformantes foram selecionados sobre placas MMLeu e cultivados em seguida em meio 20 HGM e MMLeu líquido, conforme descrito no Exemplo 2 (exceto pelo aumento da velocidade do incubador de 200 para 250 rpm). As células foram recolhidas por meio de centrifugação, os lipídios foram extraídos, FAMEs foram preparados por meio de transesterificação e analisados em seguida com GC Hewlett-Packard 6890.

25 As atividades de  $\Delta 5$  dessaturase atribuídas a cada mutação no motivo HPGG são resumidas abaixo na Tabela 14. Os mutantes RD5S são designados de acordo com a sequência do motivo HXGG mutante (ou seja, o motivo HPGG no mutante RD5S-HAGG continha uma substituição de P2 para

A, de forma a gerar um motivo His-Ala-Gly-Gly (HAGG), enquanto RD5S-HRGG possuía uma substituição de P2 para R etc.). A eficiência de conversão foi medida de acordo com a fórmula a seguir:  $([\text{produto}]/[\text{substrato} + \text{produto}]) * 100$  Os resultados são comparados com os de RD5S do tipo selvagem (SEQ ID N° 18) no plasmídeo pZURD5S, em que análise de GC determinou que a eficiência média de conversão de DGLA em ARA de dois transformantes foi de 5 25,1%.

**TABELA 14**

**ATIVIDADE DE  $\Delta 5$  DESSATURASE EM MUTANTES DE MOTIVO RD5S E HXGG**

Transformante Y4036U *	Primers utilizados para construção de motivos mutantes	Eficiência média de conversão de DGLA em ARA (%)	Percentual de atividade com relação a RD5S
RD5S	--	25,1	100
RD5S-HAGG	SEQ ID N° 141 e 142	23,2	92,4
RD5S-HRGG	SEQ ID N° 143 e 144	ND**	--
RD5S-HNGG	SEQ ID N° 145 e 146	ND**	--
RD5S-HDGG	SEQ ID N° 147 e 148	13,1	52,2
RD5S-HCGG	SEQ ID N° 149 e 150	34,8	138,6
RD5S-HQGG	SEQ ID N° 151 e 152	20,2	80,5
RD5S-HEGG	SEQ ID N° 153 e 154	18,6	74,1
RD5S-HGGG	SEQ ID N° 155 e 156	18,7	74,1
RD5S-HHGG	SEQ ID N° 157 e 158	ND**	--
RD5S-HIGG	SEQ ID N° 159 e 160	ND**	--
RD5S-HLGG	SEQ ID N° 161 e 162	ND**	--
RD5S-HKGG	SEQ ID N° 163 e 164	22,2	88,4
RD5S-HMGG	SEQ ID N° 165 e 166	21,2	84,1

Transformante	Primers utilizados para construção de motivos mutantes	Eficiência média de conversão de DGLA em ARA (%)	Percentual de atividade com relação a RD5S
Y4036U *			
RD5S-HFGG	SEQ ID N° 167 e 168	ND**	--
RD5S-HSGG	SEQ ID N° 169 e 170	ND**	--
RD5S-HTGG	SEQ ID N° 171 e 172	22,6	90,0
RD5S-HWGG	SEQ ID N° 173 e 174	28,5	113,5
RD5S-HYGG	SEQ ID N° 175 e 176	ND**	--
RD5S-HVGG	SEQ ID N° 177 e 178	20,6	82,0

\* Cada gene RD5S (mutante ou do tipo selvagem) foi expresso em pZURD5S.

\*\* ND: não obteve mutante neste experimento.

Com base no acima, fica claro que o resíduo de prolina no motivo HPGG pode ser substituído por diversos aminoácidos sem afetar substancialmente a atividade de Δ5 dessaturase de RD5S. As substituições de prolina preferidas, em que a atividade de Δ5 dessaturase foi maior ou igual a RD5S, estavam presentes em RD5S-HCGG (conversão de 34,8%) e RD5S-HWGG (conversão de 28,5%).

Será conduzida uma análise quantitativa das mutações que apresentaram desempenho maior ou igual à taxa de conversão de RD5S do tipo selvagem (ou seja, RD5S-HCGG e RD5S-HWGG (SEQ ID N° 179)), conforme descrito anteriormente para mutantes EgD5S e EaD5S. Uma sequência de nucleotídeos apropriada que codifica RD5S-HCGG é descrita como SEQ ID N° 194 e uma sequência apropriada que codifica RD5S-HWGG é descrita como SEQ ID N° 195.

REIVINDICAÇÕES

1. POLIPEPTÍDEO MUTANTE QUE POSSUI ATIVIDADE DE Δ5 DESSATURASE, caracterizado pelo fato de que compreende um motivo de aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID N° 183 (HGGG), SEQ ID N° 184 (HHGG), SEQ ID N° 186 (HCGG), SEQ ID N° 187 (HWGG) e SEQ ID N° 185 (HPGS).

5 2. POLIPEPTÍDEO MUTANTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que possui a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em: SEQ ID N° 10 58 (EgD5S-HGGG e EgD5S-HHGG), SEQ ID N° 97 (EgD5S-HPGS), SEQ ID N° 139 (EaD5S-HCGG) e SEQ ID N° 179 (RD5S-HCGG e RD5S-HWGG).

15 3. POLIPEPTÍDEO MUTANTE de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o polipeptídeo mutante possui uma eficiência de conversão de ácido di-homo-γ-linolênico em ácido 20 araquistônico que é maior que a eficiência conversão de ácido di-homo-γ-linolênico em ácido araquistônico do polipeptídeo original.

4. MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, caracterizada pelo fato de que codifica substancialmente o polipeptídeo 25 conforme definido na reivindicação 1.

5. MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que é selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID N° 190, SEQ ID N° 191, SEQ ID N° 192, SEQ ID N° 193, SEQ ID N° 194 e SEQ ID N° 195.

25 6. CÉLULA HOSPEDEIRA MICROBIANA, caracterizada pelo fato de que expressa o polipeptídeo conforme definido na reivindicação 1.

7. CÉLULA HOSPEDEIRA MICROBIANA, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que é selecionada a partir do grupo

que consiste em: bactérias, leveduras, algas, euglenoides, estramenópilos, oomicetes e fungos.

8. CÉLULA HOSPEDEIRA MICROBIANA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira microbiana é 5 uma levedura oleaginosa.

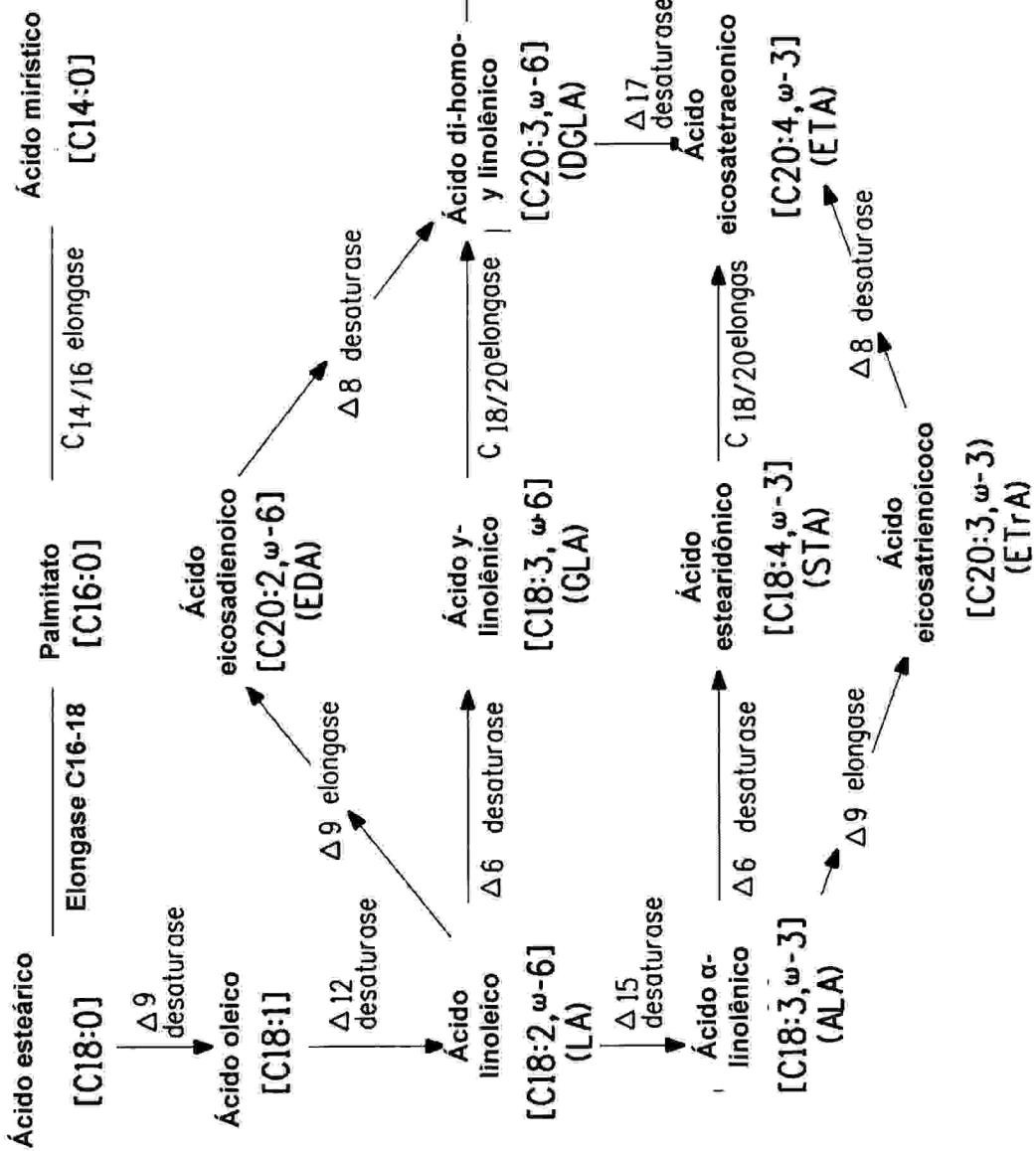
9. CÉLULA HOSPEDEIRA MICROBIANA de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a levedura oleaginosa é selecionada a partir do grupo que consiste em: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*.

10 10. CÉLULA HOSPEDEIRA MICROBIANA, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de em que a célula hospedeira produz um ácido graxo poli-insaturado selecionado a partir do grupo que consiste em ácidos graxos  $\omega$ -6 e ácidos graxos  $\omega$ -3.

11. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO, 15 caracterizado pelo fato de que compreende o cultivo de uma célula hospedeira microbiana que expressa o polipeptídeo conforme definido na reivindicação 1 na presença de ácido di-homo- $\gamma$ -linolênico, em que o ácido di-homo- $\gamma$ -linolênico é convertido em ácido araquidônico.

12. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO 20 EICOSAPENTAENOICO, caracterizado pelo fato de que compreende o cultivo de uma célula hospedeira microbiana que expressa o polipeptídeo conforme definido na reivindicação 1 na presença de ácido eicosatetraenoico, em que o ácido eicosatetraenoico é convertido em ácido eicosapentaenoico.

Fig. 1A

Continua  
na  
Fig. 1B

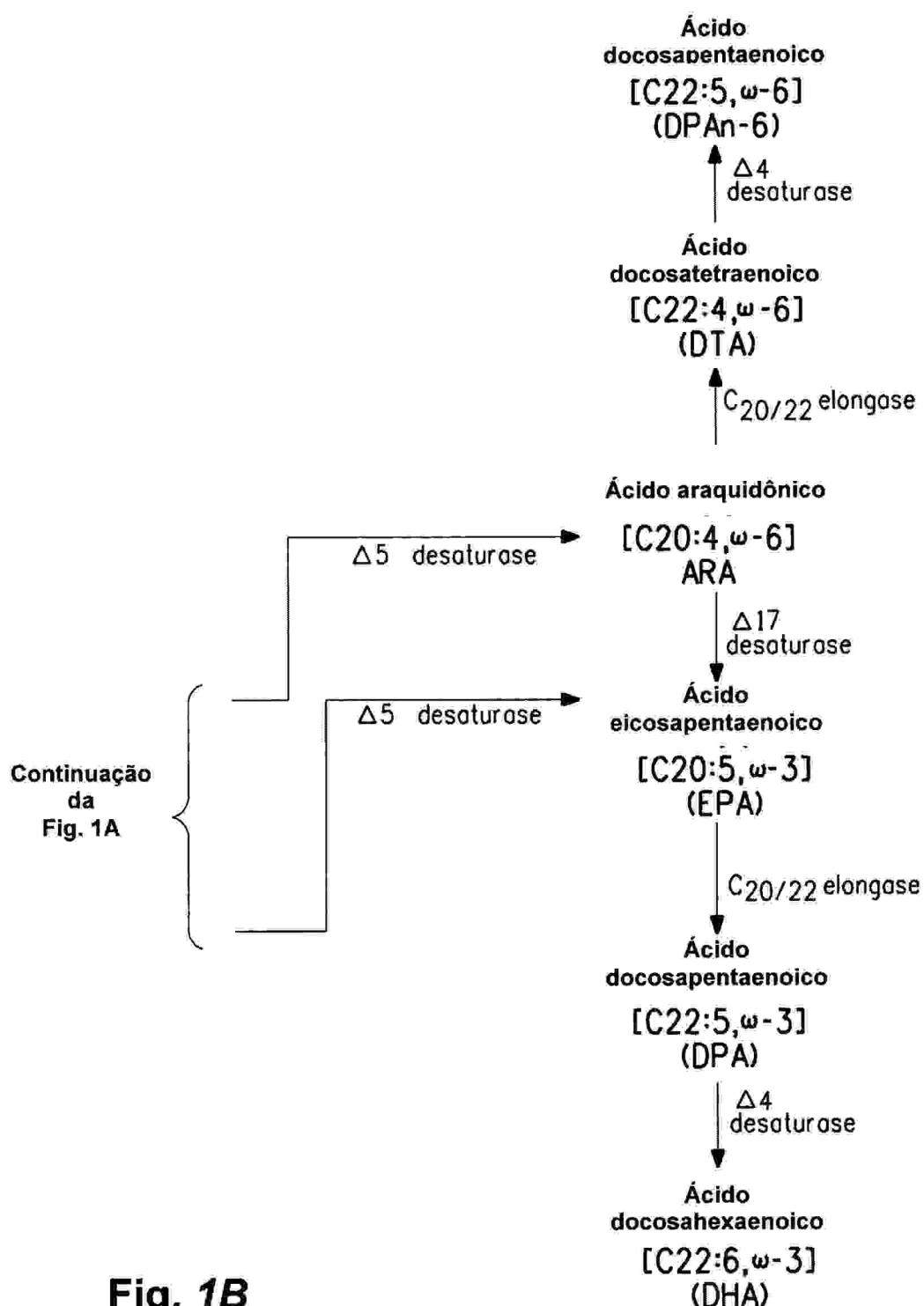


Fig. 1B

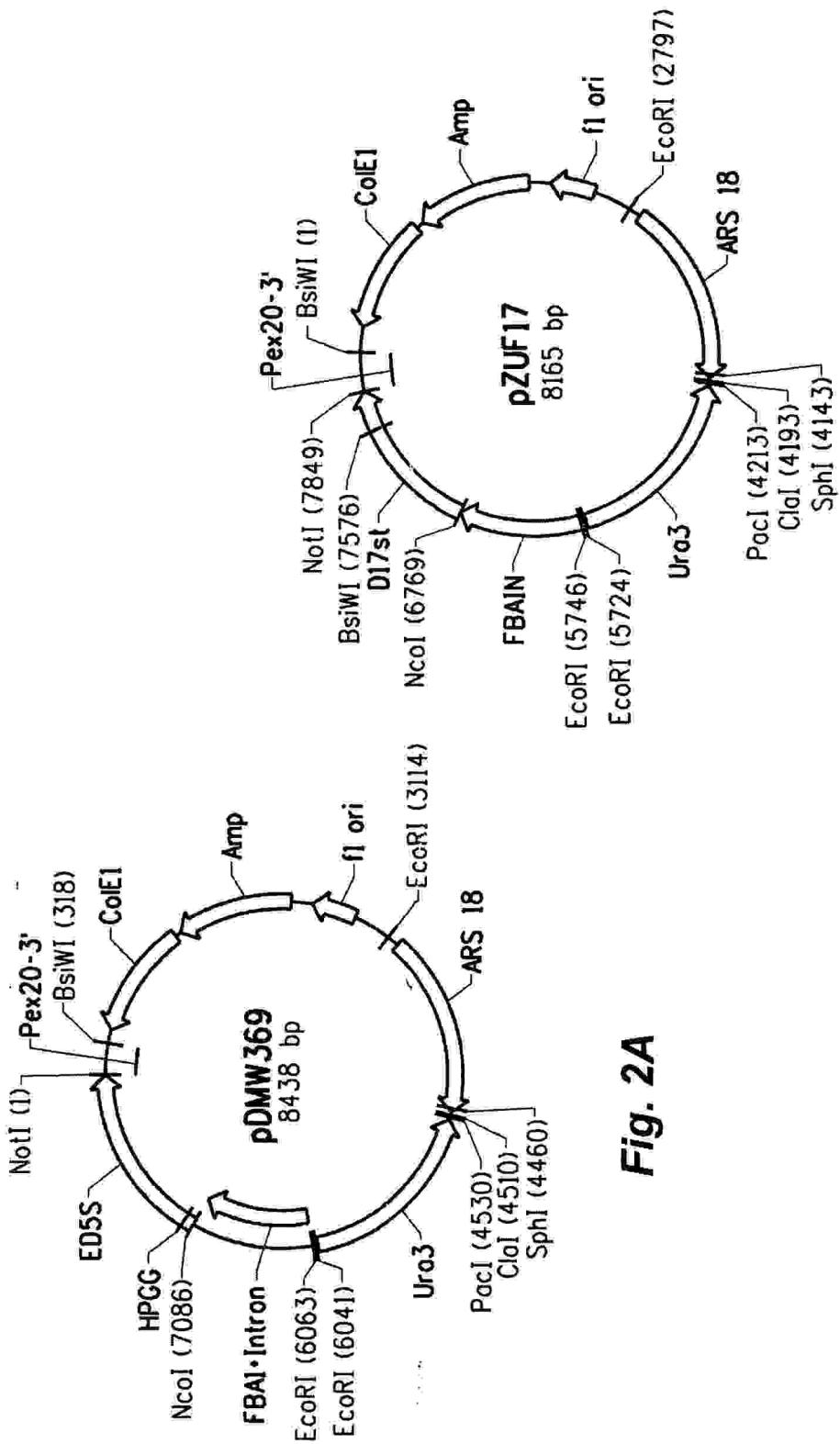


Fig. 2A

Fig. 2B

RESUMO

**“POLIPEPTÍDEO MUTANTE QUE POSSUI ATIVIDADE DE  $\Delta 5$  DESSATURASE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA MICROBIANA E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E DE ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO”**

A presente invenção refere-se a  $\Delta 5$  dessaturases mutantes, que possuem a capacidade de conversão de ácido di-homo- $\gamma$ -linolênico (DGLA; 20:3  $\omega$ -6) em ácido araquidônico (ARA; 20:4  $\omega$ -6) e/ou ácido eicosatetraenoico (ETA; 20:4  $\omega$ -3) em ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5  $\omega$ -3) e que contêm pelo menos uma mutação no motivo HPGG do domínio similar a citocromo  $b_5$ . São descritos fragmentos de ácido nucleico isolados e construções recombinantes que compreendem esses fragmentos que codificam  $\Delta 5$  dessaturases, junto com um método de elaboração de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (“PUFAs”) utilizando essas  $\Delta 5$  dessaturases mutantes em levedura oleaginosa.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

**Código de Controle**

Campo 1



31ECD566C3A87E7B

Campo 2



E595B9E412E34649

**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: 2011 03 14\_0153-2983\_Sequence Listing\_MLA\_HEM\_CAN.txt
- Data de Geração do Código: 16-03-2011
- Hora de Geração do Código: 16:24:34
- Código de Controle:
  - Campo 1: 31ECD566C3A87E7B
  - Campo 2: E595B9E412E34649