

Exemplo:

Pedido de Patente em Biotecnologia



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 9510411-9 A**

(22) Data de Depósito: 28/12/1995

(43) Data de Publicação: 19/05/98 (RPI 1430)

(51) Int. Cl.⁵.:
C12N 15/53
C12N 15/82
A01H 5/00

(54) Título: ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA, ORGANISMO TRANSGÊNICO, PLANTA OU PROGÊNIE DA CITADA PLANTA, E, PROCESSOS PARA PRODUIR UMA PLANTA COM CONTEÚDO AUMENTADO DE ÁCIDO GAMA-LINOLÊNICO, INDUZIR PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA-LINOLÊNICO E ÁCIDO OCTADECATETRAEÔNICO EM UM ORGANISMO E PARA PRODUÇÃO DE UMA PLANTA COM RESISTÊNCIA AO CONGELAMENTO MELHORADA

(30) Prioridade Unionista: 30/12/1994 US 08/368779

(71) Depositante(s): Rhon&Poulenc Agrochimie (FR)

(72) Inventor(es): Andrew N. Nunberg, Georges L. Freyssinet, Michael Nuccio, Terry L. Thomas, Avutu S. Reddy

(74) Procurador: Momen, Leonardos & Cia.

(86) Pedido Internacional: PCT IB 9501167 de 28/12/1995

(87) Publicação Internacional: WO 96/21022 de 11/07/1996

(57) Resumo: Patente de Invenção "ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADO, VETOR CÉLULA, ORGANISMO TRANSGÊNICO, PLANTA OU PROGÊNIE DA CITADA PLANTA, E, PROCESSOS PARA PRODUIR UMA PLANTA COM CONTEÚDO AUMENTADO DE ÁCIDO GAMA-LINOLÊNICO, INDUZIR PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA-LINOLÊNICO E ÁCIDO OCTADECATETRAEÔNICO EM UM ORGANISMO E PARA PRODUÇÃO DE UMA PLANTA COM RESISTÊNCIA AO CONGELAMENTO MELHORADA". Ácido linoleico é convertido em ácido γ -linolênico por meio da enzima $\Delta 6$ -dessaturase. A presente invenção refere-se aos ácidos nucleicos isolados compreendendo o gene codificador de $\Delta 6$ -dessaturase. Mais especificamente, o ácido nucleico isolado compreende o promotor, a região de codificação e as regiões de terminação do gene codificador de $\Delta 6$ -dessaturase. A presente invenção proporciona construções recombinantes compreendendo a região de codificação de $\Delta 6$ -dessaturase em combinação funcional com sequências reguladoras heterólogas. Os ácidos nucleicos e as construções recombinantes da presente invenção são úteis na produção de AGL (GLA, em inglês) em organismos transgênicos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção "ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADO, VETOR, CÉLULA, ORGANISMO TRANSGÊNICO, PLANTA OU PROGÊNIE DA CITADA PLANTA, E, PROCESSOS PARA PRODUZIR UMA PLANTA COM CONTEÚDO AUMENTADO DE ÁCIDO GAMA-LINOLÊNICO, INDUZIR PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA-LINOLÊNICO E ÁCIDO OCTADECATETRAEÔNICO EM UM ORGANISMO E PARA PRODUÇÃO DE UMA PLANTA COM RESISTÊNCIA AO CONGELAMENTO MELHORADA".

Ácido linoleico (18:2) (AL, LA em inglês) é transformado em ácido gama-linolênico (18:3) (AGL, GLA em inglês) por meio da enzima $\Delta 6$ -dessaturase. Quando esta enzima, ou o ácido nucleíco codificador dela, é transferida(o) para dentro de células produtoras de AL, é produzido AGL. A presente invenção proporciona ácidos nucleícos compreendendo o gene para $\Delta 6$ -dessaturase. De modo mais específico, os ácidos nucleícos compreendem os promotores, as regiões de codificação e regiões de terminação dos genes codificadores de $\Delta 6$ -dessaturase. A presente invenção refere-se em adição às construções recombinantes compreendendo uma região de codificação de $\Delta 6$ -dessaturase em combinação funcional com sequências reguladoras heterólogas. Os ácidos nucleícos e as construções recombinantes da presente invenção são úteis na produção de AGL em organismos transgênicos.

Ácidos graxos insaturados tais como ácidos linoleico
 ($C_{18}\Delta^{9,12}$) e α -linolênico ($C_{18}\Delta^{9,12,15}$) são constituintes dietéticos
 essenciais que não podem ser sintetizados por vertebrados porque
 25 as células de vertebrados podem introduzir ligações duplas na
 posição Δ^9 dos ácidos graxos mas não podem introduzir ligações
 duplas adicionais entre a ligação dupla Δ^9 e a terminação de metila
 da cadeia de ácido graxo. Devido ao fato deles serem precursores
 de outros produtos, os ácidos linoleico e α -linolênico são ácidos
 30 graxos essenciais, e são normalmente obtidos de fontes vegetais.
 O ácido linoleico pode ser convertido por mamíferos em ácido γ -
linolênico (AGL, $C_{18}\Delta^{6,9,12}$) que pode por sua vez ser convertido em
 ácido araquidônico (20:4)

O ácido linoleico é convertido em AGL por meio da
 enzima $\Delta 6$ -dessaturase. A $\Delta 6$ -dessaturase, uma enzima compreendendo
 20 mais do que 350 amino-ácidos, apresenta um domínio ligado em
 membrana e um sítio ativo para a dessaturação de ácidos graxos.
 Quando esta enzima é transferida para dentro de células que
 produzem endogenamente ácido linoleico mas não AGL, AGL é
 produzido. A presente invenção, por meio do fornecimento do gene
 25 codificador de $\Delta 6$ -dessaturase, permite a produção de organismos
 transgênicos que contêm $\Delta 6$ -dessaturase funcional e que produzem
 AGL. Em adição à permissão para a produção de grandes quantidades
 de AGL, a presente invenção proporciona novas fontes dietéticas de
 AGL.

30 A presente invenção refere-se aos genes codificadores
 de $\Delta 6$ -dessaturase isolados. De modo específico, os genes isolados
 compreendem promotores, regiões de codificação, e regiões de
 terminação relacionados à $\Delta 6$ -dessaturase.

De acordo com a presente invenção, moléculas de DNA compreendendo genes codificadores de $\Delta 6$ -dessaturase foram isolados. Mais especificamente, um DNA de 3,588 quilobases (kb) compreendendo um gene codificador de $\Delta 6$ -dessaturase foi isolado de cianobactéria *Synechocystis*. A seqüência de nucleotídeos do DNA de 3,588 kb foi determinada e é mostrada na SEQ ID NO: 1.

Também de acordo com a presente invenção, um cDNA compreendendo um gene codificador de $\Delta 6$ -dessaturase proveniente de borragem (*Borago officinalis*) foi isolado. A seqüência de nucleotídeos do cDNA de 1,685 quilobases (kb) foi determinada e está mostrada na figura 5A (SEQ ID NO: 4). O códon de iniciação ATG e o códon de terminação estão sublinhados. A seqüência de aminoácidos correspondendo à fase de leitura aberta da $\Delta 6$ -dessaturase de borragem está mostrada na figura 5B (SEQ ID NO: 5).

Organismos transgênicos que ganham a função de produção de AGL por meio da introdução de DNA codificador de Δ -dessaturase ganham também a função de produção de ácido octadecatetraenoico (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$). O ácido octadecatetraenoico está presente normalmente nos óleos de peixe e em algumas espécies de planta da família Boraginaceae (Craig et al., [1964] *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 41, 209-211; Gross et al., [1976] *Can. J. Plant Sci.* 56, 659-664). Nos organismos transgênicos da presente invenção, o ácido octadecatetraenoico resulta da dessaturação adicional de ácido α -linolênico por meio de $\Delta 6$ -dessaturase ou da dessaturação de AGL pela Δ -15-dessaturase.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

P O U L E N C

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Rhone-Poulenc Agrochimie

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA-LINOLÊNICO POR
MEIO DE UMA DELTA-6-DESSATURASE

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 25

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) DESTINATÁRIO: Scully, Scott, Murphy & Presser

(B) RUA: 400 Garden City Plaza

(C) CIDADE: Garden City

(D) ESTADO: New York

(E) PAÍS: Estados Unidos da América

(F) CÓDIGO POSTAL [ZIP]: 11530

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: disco flexível

(B) COMPUTADOR: compatível com PC da IBM

(C) SISTEMA OPERACIONAL: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: Patent In Release no. 1.0, Versão no. 1.25

(vi) DADOS CORRENTES DO PEDIDO:

(A) NÚMERO DO PEDIDO:

(B) DATA DE DEPÓSITO: 30 de dezembro de 1994

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÕES SOBRE O PROCURADOR/AGENTE:

(A) NOME: Presser, Leopold

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 19.827

(C) REFERÊNCIA / NÚMERO DE REGISTRO: 8383ZYXW

(ix) INFORMAÇÕES SOBRE TELECOMUNICAÇÃO:

(A) TELEFONE: (516) 742-4343

(B) TELEFAX: (516) 742-4366

(C) TELEX: 230 901 SANS UR

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 3588 pares de base

(B) TIPO: ácido nucléico

(C) FILAMENTO: ambos

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico)

(ix) PARTE ESSENCIAL:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 2002..3081

CCTTAGGAAA ATCTCGCCCT ACGTGATCGA GTTATGCAAG AACAAATTT TGCCTTAA
TTATGCRCTT TTCTCCAAGG CCAATGAAAT GACACTCASA ACATTTAGGA ACAACSCMT
GCAGGCTAGG GATATAACCA AGCCGCTCCC GAAGAATTTG GTATGGGAAG CTCTTCACAC
TCATGGTTAA AATTACCCTT AGITCATGTA ATAATTTGAG ATTATGTATC TCCTATGTT
GTGCTTTGTC TTGGTTCTAC TTGTTGGAGT CATTGCAACT TGCTTTTTAT GGTTTATTAG
ATGTTTTTTA ATATATTTTA GAGGTTTTGC TTTTCATCTCC ATTATTGATG AATAAGGAGT
TGCATATTGT CAATTTGTTGT GCTCAATATC TGATATTTTG GAATGTACTT TGTACCCTG
TGTTTTAGT TGAAGCTCAT GTGTACTTCT ATAGACTTTG TTTAAATGGT TATGTCATG
TATTT

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 448 amino-ácidos

(B) TIPO: amino-ácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genômico) [sic]

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5:

Met Ala Ala Gln Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ser Asp Glu Leu Lys Asn
1 5 10 15
His Asp Lys Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ala Tyr
20 25 30
Asp Val Ser Asp Trp Val Lys Asp His Pro Gly Gly Ser Phe Pro Leu
35 40 45
Lys Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His
50 55 60
Pro Ala Ser Thr Trp Lys Asn Leu Asp Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr
65 70 75 80
Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu
85 90 95
Val Phe Glu Phe Ser Lys Met Gly Leu Tyr Asp Lys Lys Gly His Ile
100 105 110
Met Phe Ala Thr Leu Cys Phe Ile Ala Met Leu Phe Ala Met Ser Val
115 120 125
Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Phe Ser Gly
130 135 140

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucléico isolado, caracterizado pelo fato de que codifica uma $\Delta 6$ -dessaturase de borragem.

2. Ácido nucléico isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender a seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 4.

5 3. Ácido nucléico isolado, caracterizado pelo fato de que codifica a seqüência de amino-ácidos da SEQ ID NO: 5.

4. Vetor, caracterizado pelo fato de compreender o ácido nucléico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3.

10 5. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender o ácido nucléico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3 operacionalmente ligado em um promotor e opcionalmente um sinal de terminação capaz de efetuar expressão de produto de gene do citado ácido nucléico.

15 6. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o citado promotor é um promotor relacionado à $\Delta 6$ -dessaturase, um promotor relacionado à carboxilase de *Anabaena*, um promotor relacionado à heliantinina, um promotor relacionado à glicinina, um promotor relacionado à napina, o
20 promotor 35S de CaMV, ou um promotor tecido-específico relacionado à heliantinina.

7. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o citado promotor é constitutivo ou tecido-específico.
- 25 8. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o citado sinal de terminação é um sinal de terminação de *Synechocystis*, um sinal de terminação relativo à nopalina sintase, ou um sinal de terminação de semente.
- 30 9. Célula, caracterizada pelo fato de compreender o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações de 4 a 8.
10. Célula de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a citada célula é uma célula animal, uma célula bacteriana, uma célula de planta ou uma célula fúngica.
- 5 11. Organismo transgênico, caracterizado pelo fato de compreender o ácido nucléico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3.
12. Organismo transgênico, caracterizado pelo fato de compreender o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações de 4 a 8.
- 10 13. Organismo transgênico de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que o citado organismo é uma bactéria, um fungo, uma planta ou um animal.
14. Planta ou progênie da citada planta, caracterizada pelo fato de que foi regenerada a partir da célula de planta de acordo com a reivindicação 10.
- 15 15. Planta de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a citada planta é uma planta girassol, feijão-soja, milho, tabaco, amendoim, cenoura ou colza de semente oleosa.