

Relatório Descritivo de Patente de Invenção**SEQUÊNCIA DE DNA, CONSTRUÇÃO GÊNICA, SEQUÊNCIA DE
AMINOÁCIDOS E MÉTODO DE AUMENTO DE VALOR NUTRICIONAL DE
PLANTA****Campo da Invenção**

[0001] A presente invenção descreve sequências de DNA e construções gênicas que podem ser utilizadas em métodos para aumentar o valor nutricional de plantas, e uma sequência de aminoácidos. A presente invenção situa-se nos campos da Biotecnologia e da Engenharia de Alimentos.

Antecedentes da Invenção

[0002] A soja, o feijão e outras leguminosas apresentam, normalmente, baixos teores de metionina no conjunto de proteínas presente em suas sementes. Além dos baixos teores deste aminoácido essencial, inibidores de proteases, considerados fatores antinutricionais para alimentação humana e animal, estão presentes.

[0003] Entre os principais fatores antinutricionais característicos da soja, e que estão descritos no documento Nº 25 da Série sobre segurança de novos alimentos e rações publicado pela OECD em 2012 denominado “REVISED CONSENSUS DOCUMENT ON COMPOSITIONAL CONSIDERATIONS FOR NEW VARIETIES OF SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.]: KEY FOOD AND FEED NUTRIENTS, ANTINUTRIENTS, TOXICANTS AND ALLERGENS”, destacam-se os inibidores proteicos de proteases do tipo Kunitz e Bowman-Birk. A atividade inibidora destes fatores antinutricionais é atualmente eliminada ou reduzida pelo aquecimento do farelo de soja, após a extração do óleo. Este procedimento é conhecido na indústria como tostagem do farelo.

[0004] O aumento do valor nutricional de plantas tem sido obtido principalmente como resultado do melhoramento genético por meio de cruzamento e seleção de variedades com as propriedades fenotípicas

desejadas como, por exemplo, soja com teores de proteína aumentados, especialmente das globulinas 7S e 11S (CARRÃO-PANIZZI *et al.*, 2008). Pelo uso de técnicas de engenharia genética, foi obtida soja com baixos teores de rafinose e outros oligossacarídeos responsáveis por problemas digestivos como a flatulência (JOHNSON, 1999). Um exemplo de sucesso na obtenção de melhorias nas propriedades nutricionais por transgenia é o *Golden Rice*, uma variedade de arroz enriquecida com precursores da vitamina A (YE *et al.*, 2000).

[0005] O aumento do teor de metionina, quando exigido pela aplicação do produto derivado da soja, é atualmente obtido das seguintes maneiras: formulação (mistura) com outros produtos ricos em metionina; e adição de metionina solúvel ao produto final.

[0006] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0007] O documento US 5,850,016 revela métodos para aumentar o teor de aminoácidos pré-selecionados em sementes de plantas por modificação genética, aumentando os teores de metionina, lisina e/ou cisteína. A presente invenção difere deste documento, entre outros fatores, por apresentar a redução de fatores antinutricionais simultaneamente ao aumento de valor nutricional.

[0008] O documento US 6,930,223 revela métodos para alterar a quantidade de metabólitos em órgãos de armazenamento de plantas pelo aumento da expressão de genes codificadores de proteínas ricas em aminoácidos que contêm enxofre.

[0009] Assim, do que se depreende das literaturas pesquisadas, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0010] Pela presente invenção, tem-se por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de sequências de DNA recombinantes ou de DNA nativo editado que podem ser utilizadas em métodos para aumentar o valor nutricional de plantas e, simultaneamente, reduzir a atividade de fatores antinutricionais.

[0011] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma sequência de DNA que compreende uma sequência de nucleotídeos com 90% de similaridade com a SEQ ID NO 2.

[0012] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma construção gênica que compreende:

- pelo menos uma sequência promotora da transcrição gênica (promotor);
- pelo menos a sequência de DNA codificadora de um peptídeo, conforme definida no primeiro objeto;
- pelo menos uma sequência terminadora da transcrição gênica (terminador).

[0013] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta uma sequência de aminoácidos que compreende uma sequência com 90% de similaridade com a SEQ ID NO 4.

[0014] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta um método de aumento de valor nutricional de planta compreendendo as etapas de:

- a) preparo de pelo menos uma construção gênica adequada compreendendo um promotor idêntico ou equivalente ao de um gene nativo de um fator antinutricional;
- b) transformação da dita planta utilizando a construção gênica da etapa a), a qual será integrada ao cromossomo vegetal;
- c) transcrição da sequência de DNA da etapa a) e tradução do mRNA transcrito, expressando uma proteína recombinante.

[0015] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta um método de aumento de valor nutricional de planta compreendendo as etapas de:

a) preparo de pelo menos uma sequência-alvo de nucleotídeos compreendendo uma região codificadora de um gene nativo de um fator antinutricional para substituição de parte dos nucleotídeos desta região;

b) Transformação da dita planta utilizando a construção gênica da etapa a), a qual substituirá a sequência do gene nativo;

c) Transcrição da sequência de DNA da etapa a) e tradução do mRNA transcrito, expressando uma proteína nativa modificada.

[0016] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados é uma sequência de DNA recombinante ou uma sequência de DNA nativo editado que pode ser utilizada em métodos para aumentar o valor nutricional de plantas e, simultaneamente, reduzir a atividade de fatores antinutricionais.

[0017] Esses e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0018] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras:

[0019] Na Figura 1 estão mostrados os nucleotídeos da sequência gênica dividida entre a região 1, que compreende um códon de iniciação de tradução (ATG); a região 2, que compreende uma região codificante de um peptídeo-sinal (SEQ ID NO 1); a região 3, que compreende a região codificante da proteína recombinante ou nativa modificada (SEQ ID NO 2); e a região 4, que compreende o códon de término da tradução (TGA).

[0020] Na Figura 2 estão representados os aminoácidos da proteína KTIMet que consiste de 4 regiões correspondentes às regiões da sequência

gênica, isto é, a região 1, com um aminoácido inicial (metionina); a região 2, com um peptídeo-sinal (SEQ ID NO 3); a região 3, que compreende a proteína madura (SEQ ID NO 4); e a região 4, que compreende o aminoácido final (ácido glutâmico).

Descrição Detalhada da Invenção

[0021] A invenção consiste em um conjunto de sequências reguladoras da transcrição e codificadoras de proteínas recombinantes ou nativas modificadas por edição gênica, que possui regiões promotoras e terminadoras nativas ou modificadas, que deverá ser inserido no genoma de variedades vegetais por métodos de transformação genética, em qualquer local do genoma, ou por tecnologia de edição gênica no mesmo locus do gene nativo. Como consequência, haverá aumento do valor nutricional da planta e, concomitante e preferencialmente, com redução ou eliminação da atividade de pelo menos um fator antinutricional.

[0022] A proteína recombinante ou modificada resultará no enriquecimento de aminoácidos específicos de uma proteína original, substituindo resíduos de outros aminoácidos presentes na cadeia polipeptídica original como, por exemplo, isoleucinas e leucinas, por metioninas.

[0023] A proteína recombinante ou modificada resultará na redução ou na diminuição de pelo menos um fator antinutricional, quando a sua expressão ocorrer em regime de competição (mesmo promotor) ou em substituição (promotor específico) à expressão do gene nativo do fator antinutricional.

[0024] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma sequência de DNA que compreende uma sequência de nucleotídeos com 90% de similaridade com a SEQ ID NO 2.

[0025] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma construção gênica que compreende:

- pelo menos um promotor;

- pelo menos a sequência de DNA conforme definida no primeiro objeto;

- pelo menos um terminador.

[0026] Em uma concretização, o promotor é idêntico ou equivalente ao de um gene nativo de um fator antinutricional.

[0027] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta uma sequência de aminoácidos que compreende uma sequência com 90% de similaridade com a SEQ ID NO 4.

[0028] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta um método de aumento de valor nutricional de planta compreendendo as etapas de:

a) preparo de pelo menos uma construção gênica adequada compreendendo um promotor idêntico ou equivalente ao de um gene nativo de um fator antinutricional;

b) transformação da dita planta utilizando a construção gênica da etapa a), a qual será integrada ao cromossomo vegetal;

c) transcrição da sequência de DNA da etapa a) e tradução do mRNA transcrito, expressando uma proteína recombinante.

[0029] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta um método de aumento de valor nutricional de planta compreendendo as etapas de:

a) preparo de pelo menos uma sequência-alvo de nucleotídeos compreendendo uma região codificadora de um gene nativo de um fator antinutricional para substituição de parte dos nucleotídeos desta região;

b) Transformação da dita planta utilizando a construção gênica da etapa a), a qual será integrada ao gene nativo;

c) Transcrição da sequência de DNA da etapa a) e tradução do mRNA transcrito, expressando uma proteína nativa modificada.

[0030] Em uma concretização, a construção gênica compreende uma sequência de DNA modificada em que pelo menos um códon codificante de leucina ou isoleucina é substituído por um códon codificante de metionina.

[0031] Em uma concretização, a construção gênica da etapa a) do método de aumento de valor nutricional de planta compreende:

- pelo menos um promotor;
- pelo menos a sequência de DNA conforme definida no primeiro objeto;
- pelo menos um terminador.

[0032] Em uma concretização, a construção gênica da etapa a) do método de aumento de valor nutricional de planta compreende:

- pelo menos um promotor idêntico ou equivalente ao de um gene nativo de um fator antinutricional;
- pelo menos a sequência de DNA conforme definida no primeiro objeto;
- pelo menos um terminador.

[0033] Em uma concretização, a proteína recombinante ou nativa modificada que a planta expressa na etapa c) do método de aumento de valor nutricional de planta é a sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO 4.

[0034] Em uma concretização, no método de aumento de valor nutricional de planta, a planta é uma leguminosa, preferencialmente soja.

[0035] Em uma concretização, a expressão de uma proteína recombinante ou nativa modificada da etapa c) do método de aumento de valor nutricional de planta ocorre nas sementes da planta. Em uma concretização, o aumento da produção da proteína é encontrado principalmente em sementes.

[0036] A presente invenção apresenta duas principais vantagens na indústria de processamento de soja. A primeira seria o incremento no valor nutricional da soja, aumentando o teor de metioninas no conjunto das proteínas da soja, dispensando a adição ou reduzindo a quantidade a ser adicionada deste aminoácido nos produtos derivados desta leguminosa para correção da deficiência nutricional característica. A segunda seria a redução de um fator antinutricional endógeno como o inibidor de tripsina Kunitz, por competição em

nível da expressão gênica que decorre das alterações moleculares introduzidas no gene recombinante, implicando na redução do consumo de energia (calor) durante o processamento industrial, método atualmente utilizado na indústria para a desativação deste inibidor de proteases.

[0037] Em uma concretização, a planta transformada é cultivada com suplementos. Um exemplo seria o uso de suplementos de sulfato para plantas com incremento de teor de metionina uma vez que, com o aumento de proteínas ricas em metionina, são necessárias mais fontes de enxofre, no caso, o sulfato.

[0038] Em uma concretização, o método consiste na substituição de códons frequentes de genes codificadores de proteínas endógenas de sementes por códons raros, como o da metionina, enriquecendo em aminoácidos essenciais raros o conteúdo proteico de grãos utilizados na alimentação, concomitantemente com a redução da atividade inibidora de proteínas antinutricionais endógenas destes mesmos grãos como, por exemplo, inibidores de proteases do tipo Kunitz.

[0039] Os genes codificadores e as respectivas moléculas de proteínas recombinantes ou nativa modificada, objeto deste pedido de patente, não existem na natureza, pois se tratam de genes sintéticos ou nativos editados e proteínas derivadas, projetadas para se localizar preferencialmente nas sementes, aumentando o valor nutricional e mantendo todas as demais propriedades bioquímicas e agrônômicas relevantes, reduzindo a atividade total de fatores antinutricionais desta planta.

[0040] O método de transformação de plantas pode ser por infecção por agrobactérias (*Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*), choque osmótico, edição de DNA por CRISPR, sistema IL-60, aceleração de partículas ou biobalística, ou qualquer outra metodologia de transformação genética de plantas.

Exemplos - Concretizações

[0041] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção sem, contudo, limitar o escopo da mesma.

[0042] A sequência gênica modificada da proteína KTI3, denominada KTIMet, foi obtida pela substituição da totalidade dos códons de isoleucina (Ile) e leucina (Leu) por códons de metionina (Met) presentes na região codificadora da proteína, exceto na região do peptídeo-sinal. O gene codificador da proteína KTI3 foi obtido no *GenBank* a partir da busca, por BLASTn, utilizando a sequência gênica com a mais alta expressão em grãos de soja apresentada por SEVERIN *et al.* (2010), isto é, Glyma08g45530. A busca resultou em duas sequências com 100% de identidade (*Query Coverage*), ambas com valor estimado máximo igual a zero (*E-value* = 0.0). Foram elas: *Glycine max Kunitz trypsin inhibitor* (KTI3), mRNA NCBI Ref.Seq.: NM_001251682.1 – 1.259 bp mRNA linear PLN 20-JUN-2012; e *Glycine max kunitz trypsin inhibitor 3 gene, complete cds* *GenBank*: AF233296.1 – 2.927 bp DNA linear PLN 24-APR-2000. O alinhamento das duas sequências nucleotídicas resultantes com aquela de Glyma08g45530 por Clustal O 1.2.1 resultou em total identidade. Assim, para os passos seguintes das análises, foi selecionada a sequência do gene NM-001251682 como alvo para as modificações.

[0043] A sequência gênica (Figura 1) consiste de 4 regiões importantes para a tradução, sendo elas a região 1, que compreende um códon de iniciação de tradução (ATG); a região 2, que compreende uma região codificante de um peptídeo sinal (SEQ ID NO 1); a região 3, que compreende a região codificante da proteína recombinante (SEQ ID 2); e a região 4, que compreende o códon de término da tradução (TGA). A sequência gênica final produzida é a SEQ ID NO 5.

[0044] A proteína (Figura 2) consiste de 4 regiões correspondentes às regiões da sequência gênica, isto é, a região 1, com um aminoácido inicial (metionina); a região 2, com um peptídeo-sinal (SEQ ID NO 3); a região 3, que

compreende a proteína madura (SEQ ID NO 4); e a região 4, que compreende o aminoácido final (ácido glutâmico).

[0045] Na construção do gene KTIMet, 100% dos códons para isoleucina e leucina foram alterados para códons de metionina. Outros percentuais de substituição, tais como 25, 50, 75%, ou qualquer outro valor intermediário entre 0 e 100%, também são aplicáveis na presente invenção. Em sementes de soja e de outras plantas, há outros genes codificadores de proteínas com alta similaridade à KTI3. Estes genes também são elegíveis como alvos de modificação pela estratégia aqui descrita.

[0046] Para a redução dos teores de inibidores de proteases de sementes da mesma classe da proteína recombinante ou nativa modificada KTIMet, o promotor nativo do gene KTI3 foi utilizado. Na presente invenção, espera-se que a proteína (KTIMet) possua baixa atividade de fator antinutricional. Entre outras possíveis causas está a substituição de um ou mais aminoácidos do sítio ativo da proteína inibidora. No caso de KTIMet, promoveu-se a substituição de uma isoleucina do sítio ativo por uma metionina. Esta substituição alterou a posição espacial da alça que contém o sítio ativo como resultado da interação modificada com a cauda N-terminal da proteína. A nova posição espacial do sítio ativo enfraquece a ligação entre o inibidor e a enzima tripsina, liberando esta endopeptidase para atuar no processo digestivo das proteínas presentes nos alimentos.

[0047] No caso da inserção do gene recombinante no genoma da planta, o mesmo não interfere com o gene nativo do fator antinutricional, o qual permanece ativo. Portanto, a inserção do gene recombinante e a presença de uma nova proteína recombinante não alteram a estrutura da proteína nativa. A redução da produção do fator antinutricional nativo resulta da competição pela expressão gênica com o gene recombinante, considerando que este está sob controle de região promotora igual ou equivalente ao do gene nativo. A quantidade da proteína antinutricional nativa é reduzida pela presença da proteína recombinante, por competição, admitindo-se a competição para a

síntese de KTIMet e KT13, entre outros inibidores. Outras sequências promotoras, mantendo-se a especificidade de expressão em sementes, podem ser utilizadas de forma a priorizar a produção da proteína recombinante.

[0048] No caso da edição do gene nativo, com a alteração dos códons, a proteína nativa deixa de ser produzida, passando a expressão do gene a produzir uma proteína modificada rica em metioninas e com atividade inibidora de proteases reduzida.

[0049] As proteínas de interesse selecionadas para a fase de testes quanto à estrutura e à atividade inibitória foram a SKTI, a ser produzida em *Escherichia coli* no laboratório (proteína recombinante) ou a proteína nativa comercialmente disponível; a KTIMet, a ser produzida em *E. coli* no laboratório ou em plantas. Deverão ser avaliadas as sequências nucleotídicas para adaptação a vetores e produção em *E. coli* e plantas.

[0050] Os estudos para expressão dos genes recombinantes ou nativos editados dividem-se em otimização da expressão gênica e otimização do processo de purificação das proteínas de interesse, em que as proteínas recombinantes estão fusionadas à glutationa-S-transferase (GST). O domínio de GST é removível pela protease TEV na versão recombinante codificada pelo vetor plasmidial pGEX-TEV. Nas proteínas recombinantes com cauda de histidinas, a cauda de histidinas é removível por trombina na versão codificada pelos vetores pET28a/pET15b. As linhagens de *E. coli* selecionadas para a produção da proteína são principalmente BL21 Rosetta-gami 2(DE3) e 10 outras linhagens distintas. As proteínas são analisadas por dupla espectrometria de massas (MS/MS) para confirmação de suas identidades.

[0051] A caracterização enzimática das proteínas recombinantes ou nativas modificadas por edição resulta da análise da especificidade da inibição da tripsina, do TSA (*tissue plasminogen activator*) e de outras proteases; e o perfil inibitório da tripsina com atividade padrão (BAPNA, pH 8,0 a 37 °C).

[0052] Os teores totais proteicos são determinados em tecidos vegetais pelo Método de Kjeldahl e por espectrometria por absorção de UV. O teor de

KTIMet em tecidos vegetais são analisados por cromatografia de afinidade e *Western blot* ou ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*).

[0053] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Sequência de DNA **caracterizada por** compreender uma sequência de nucleotídeos com 90% de similaridade com a SEQ ID NO 2.
2. Construção gênica **caracterizada por** compreender:
 - pelo menos um promotor;
 - pelo menos uma sequência de DNA conforme definida na reivindicação 1;
 - pelo menos um terminador.
3. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo promotor ser idêntico ou equivalente ao de um gene nativo de um fator antinutricional.
4. Sequência de aminoácidos **caracterizada por** compreender uma sequência com 90% de similaridade com a SEQ ID NO 4.
5. Método de aumento de valor nutricional de planta **caracterizado por** compreender as etapas de:
 - a) preparo de pelo menos uma construção gênica adequada compreendendo um promotor idêntico ou equivalente ao de um gene nativo de um fator antinutricional;
 - b) transformação da dita planta utilizando a construção gênica da etapa a), a qual será integrada ao cromossomo vegetal;
 - c) transcrição da sequência de DNA da etapa a) e tradução do mRNA transcrito, expressando uma proteína recombinante.
6. Método de aumento de valor nutricional de planta caracterizado por compreender as etapas de:
 - a) preparo de pelo menos uma sequência-alvo de nucleotídeos compreendendo uma região codificadora de um gene nativo de um fator antinutricional para substituição de parte dos nucleotídeos desta região;
 - b) Transformação da dita planta utilizando a construção gênica da etapa a), a qual substituirá a sequência do gene nativo;

c) Transcrição da sequência de DNA da etapa a) e tradução do mRNA transcrito, expressando uma proteína nativa modificada.

7. Método de aumento de valor nutricional de planta, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pela construção gênica compreender uma sequência de DNA modificada, em que pelo menos um códon codificante de leucina ou isoleucina é substituído por um códon codificante de metionina.

8. Método de aumento de valor nutricional de planta, de acordo com a reivindicação 5, 6 ou 7, **caracterizado** pela construção gênica da etapa a) ser conforme aquela definida na reivindicação 2 ou 3.

9. Método de aumento de valor nutricional de planta, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, **caracterizado** pela proteína recombinante ou nativa modificada que a planta expressa na etapa c) ser uma sequência de aminoácidos conforme definida na reivindicação 4.

10. Método de aumento de valor nutricional de planta, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 9, **caracterizado** pela planta ser uma leguminosa, preferencialmente soja.

11. Método de aumento de valor nutricional de planta, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 10, **caracterizado** pela expressão da proteína recombinante ou nativa modificada da etapa c) ser nas sementes da planta.

FIGURAS

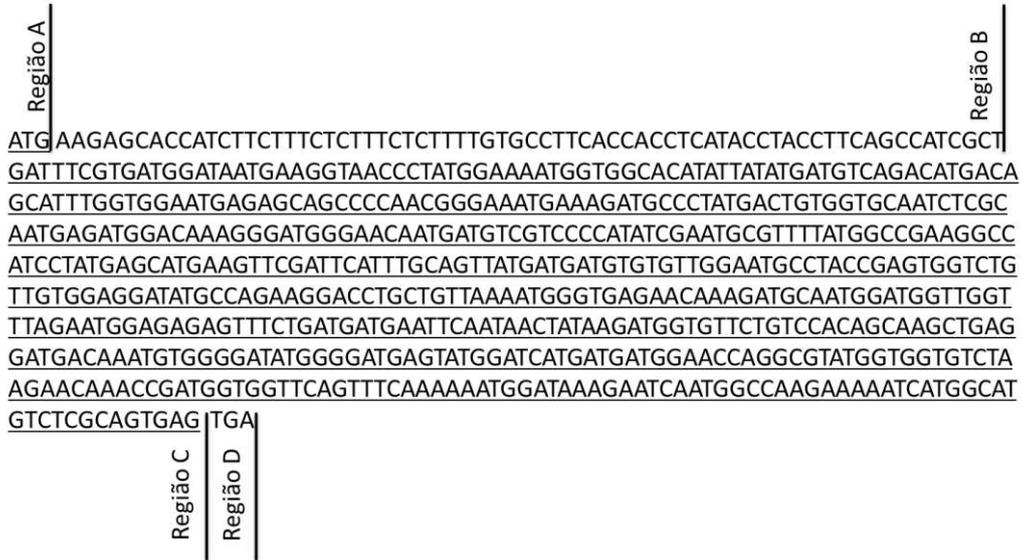


Figura 1

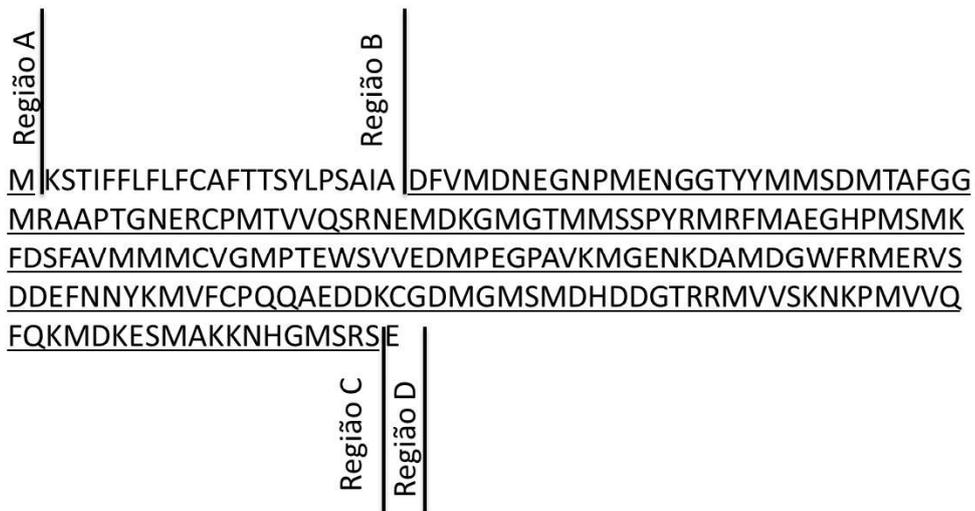


Figura 2

Resumo**SEQUÊNCIA DE DNA, CONSTRUÇÃO GÊNICA, SEQUÊNCIA DE
AMINOÁCIDOS E MÉTODO DE AUMENTO DE VALOR NUTRICIONAL DE
PLANTA**

A presente invenção descreve sequências de DNA e construções gênicas que podem ser utilizadas em métodos para aumentar o valor nutricional de plantas, e uma sequência de aminoácidos. Em uma concretização, o aumento do valor nutricional é realizado pelo incremento do teor de metioninas e pela redução da atividade de um fator antinutricional. A presente invenção situa-se nos campos da Biotecnologia e da Engenharia de Alimentos.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: UFRGS-metioninas listagem.txt
- Data de Geração do Código: 03/05/2018
- Hora de Geração do Código: 14:10:45
- Código de Controle:
 - Campo 1: 37D3AAEB276F3C92
 - Campo 2: 7A9A0626512A0ED9