

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 255**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2005 E 09166833 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2169066**

54 Título: **Ácido nucleico promotor derivado de bacterias del género *Corynebacterium*, casete de expresión que comprende el promotor y vector que comprende el casete, célula huésped que comprende el vector y procedimiento para expresar un gen usando la célula**

30 Prioridad:

16.12.2004 KR 20040107215

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.06.2013

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
500, NAMDAEMUNRO 5-GA
JUNG-GU SEOUL 100-749, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, YOUNG-HOON;
KIM, HYUN-SOO;
CHOI, HYE-JIN;
LEE, JIN-HO;
HWANG, SOO-YOUN;
SIM, JAE-ICK;
KANG, TAE-SUN y
LEE, WON-SIK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 409 255 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ácido nucleico promotor derivado de bacterias del género *Corynebacterium*, casete de expresión que comprende el promotor y vector que comprende el casete, célula huésped que comprende el vector y procedimiento para expresar un gen usando la célula

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo ácido nucleico promotor derivado de bacterias del género *Corynebacterium*, a un casete de expresión que incluye el mismo, a un vector que incluye el casete de expresión, a una célula huésped que incluye el vector, y a un procedimiento para expresar un gen usando la célula huésped.

Técnica antecedente

10 Las bacterias corineformes son microorganismos usados para producir diversos materiales químicos usado en muchas aplicaciones, tales como pienso animal, medicinas, y alimentos que incluyen L-lisina, L-treonina, y diversos ácidos nucleicos. Una cepa de bacterias corineformes que muestre alta productividad puede desarrollarse a través de ingeniería genética e ingeniería metabólica. Para obtener dicha cepa de bacterias corineformes que muestren alta productividad, tiene que expresarse un gen relacionado con diversas vías metabólicas en las bacterias corineformes. Para este fin, debe desarrollarse un promotor adecuado.

En líneas generales, en bacterias corineformes, un gen se expresa bajo un promotor incluido de forma inherente en el mismo (véase, por ejemplo, Journal of Bacteriology, 181(19), 6188-6191, 1999). Sin embargo, la estructura de una secuencia promotora para expresar un gen en bacterias corineformes es desconocido, mientras que las estructuras de otros microorganismos industriales, tales como *E. coli* y *Bacillus subtilis*, son conocidas. Por lo tanto, se ha sugerido el siguiente procedimiento para producir promotores que posibiliten la expresión de un gen en bacterias corineformes. En primer lugar, se retira una región promotora de un gen que sea resistente a un antibiótico, tal como cloranfenicol. Por separado, se escinde un ADN cromosómico separado de bacterias corineformes usando una enzima de restricción adecuada, y el fragmento resultante se introduce en el gen a partir del cual se retiró la región promotora. Después, el gen obtenido se usa para transformar bacterias corineformes para producir una cepa transformada y se mide la resistencia a antibiótico de la cepa transformada (véase Gene, 102, 93-98, 1991; Microbiology, 142, 1297-1309, 1996.). En particular, se ha desarrollado una cantidad muy pequeña de promotores usados en *Corynebacterium ammoniagenes*, un microorganismo que produce ácido nucleico conocido. Por ejemplo, se usa un promotor que tiene una actividad aproximadamente un 10 % mayor que un promotor tac en *E. coli* (véase, Biotechnol. Lett. 25, 1311-1316, 2003.). Sin embargo, cuando se usa en una expresión masiva de genes, dicho promotor muestra baja eficacia. La patente de Estados Unidos N° 5.593.781 desvela un ADN promotor que se separa de una cepa de *Brevibacterium flavum* MJ-233 (FERM BP-1497) y tiene actividad mayor que un promotor tac. Sin embargo, dicho ADN promotor que se separa de un género *Brevibacterium* puede no ser funcional en otras bacterias. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una secuencia promotora que se obtenga de *Corynebacterium ammoniagenes* disponible en el mercado, y tenga elevada actividad en otras bacterias.

35 Por consiguiente, los inventores de la presente invención buscaron una secuencia promotora potente en *Corynebacterium ammoniagenes* y hallaron que un promotor de acuerdo con la presente invención puede expresar genes con elevada actividad en *Corynebacterium ammoniagenes*.

Descripción de los dibujos

40 La Figura 1 muestra los resultados de un ensayo de electroforesis bidimensional de una muestra extraída de una bacteria *Corynebacterium ammoniagenes*, en el que los resultados del ensayo se tiñeron de plata y se revelaron para la identificación;
la Figura 2 ilustra un procedimiento para producir un vector de exploración de p117-gfp de acuerdo con una realización de la presente invención;
la Figura 3 ilustra un procedimiento para producir un vector recombinante que incluya la secuencia promotora pcj1 a pcj7 de un vector de exploración p117-gfp de acuerdo con una realización de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

La presente invención proporciona un promotor que tiene elevada actividad en *Corynebacterium*.

50 La presente invención también proporciona un casete de expresión que incluye el promotor y un vector que incluye el casete de expresión.

La presente invención también proporciona una célula huésped que incluye el vector.

La presente invención también proporciona un procedimiento para expresar un gen usando la célula huésped.

Solución técnica

La presente invención proporciona un promotor que comprende un polinucleótido de la SEC ID N° 7.

El promotor de acuerdo con la presente invención es un ácido nucleico aislado y tiene actividad promotora. En el presente documento, el término "promotor" se refiere a una región de ADN a la cual se une una ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. El término "promotor tac" se refiere a un promotor obtenido fusionando una secuencia obtenida de la región - 35 de un promotor del operón de triptófano de *E. coli* y una secuencia obtenida de la región - 10 de un promotor del operón de lactosa de *E. coli*. Se sabe que el promotor tac tiene elevada actividad promotora. Un promotor que tenga al menos un ácido nucleico seleccionado entre las SEC ID N° 1, 4, 5, 6 y 7 tiene mayor actividad en bacterias del género *Corynebacterium* que el promotor tac. En particular, un promotor que tiene al menos un ácido nucleico seleccionado entre las SEC ID N° 1 y 4 tiene 10 veces mayor actividad que el promotor tac en bacterias del género *Corynebacterium*.

El promotor de acuerdo con una realización de la presente invención tiene actividad promotora en bacterias del género *Escherichia*, además de bacterias del género *Corynebacterium*.

La célula en la cual el promotor de la presente invención puede funcionar puede ser cualquier bacteria del género *Corynebacterium*. Ejemplos de bacterias del género *Corynebacterium* incluyen *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KC-CM-10330) y ATCC 6871, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 y ATCC 13060, y similares. Sin embargo, las bacterias del género *Corynebacterium* no se limitan a las mismas. Ejemplos de bacterias del género *Escherichia* en las cuales puede funcionar un promotor de acuerdo con una realización de la presente invención, incluyen *E. coli*.

La secuencia del promotor de acuerdo con una realización de la presente invención puede cambiarse fácilmente por un especialista en la técnica a través de un procedimiento de mutagénesis conocido, tal como evolución dirigida y mutagénesis dirigida al sitio. Por consiguiente, se incluye en el alcance de la presente invención un ácido nucleico que tiene, por ejemplo, un 70 % o más de homología, preferiblemente un 80 % o más de homología, y más preferiblemente, un 90 % o más de homología, con la secuencia promotora aislada que incluye al menos un ácido nucleico seleccionado entre la SEC ID N° 7, y puede actuar como promotor en bacterias del género *Corynebacterium*.

La presente invención también proporciona un casete de expresión que incluye el promotor que está unido de forma funcional a una secuencia codificante. La secuencia codificante puede ser, por ejemplo, el gen completo o una secuencia codificante que codifica una región predeterminada del gen. En el presente documento, el término "unido de forma funcional" indica que la secuencia codificante está funcionalmente conectada al promotor de modo que la secuencia promotora pueda iniciar o mediar la transcripción de la secuencia codificante. El casete de acuerdo con una realización de la presente invención puede incluir adicionalmente secuencias de control 5' y 3' unidas de forma funcional a la secuencia promotora. La secuencia codificante puede ser un gen asociado con un producto metabólico, tal como IMP, GMP, L-lisina y L-treonina.

La presente invención también proporciona un vector que incluye el casete de expresión de acuerdo con una realización de la presente invención. En el presente documento, el vector no está limitado, y puede ser cualquier vector conocido en la técnica. Ejemplos del vector de acuerdo con realizaciones de la presente invención incluyen un vector pCR2.1-TOPO (producido en Invitrogen Inc., USA) y pECCG 117 (KFCC-10673). Sin embargo, el vector no está limitado a los mismos. Ejemplos del vector que incluye el casete de expresión de acuerdo con una realización de la presente invención incluyen p117-cj1-gfp, p117-cj2-gfp, p117-cj3-gfp, p117-cj4-gfp, p117-cj5-gfp, p117-cj6-gfp y p117-cj7-gfp.

La presente invención también proporciona una célula huésped que incluye el vector de acuerdo con una realización de la presente invención. La célula huésped puede ser una bacteria del género *Corynebacterium* o una bacteria del género *Escherichia*, pero no se limita a las mismas. Por ejemplo, la célula huésped puede ser *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) o *E. coli*.

La presente invención también proporciona un procedimiento para expresar un gen exógeno cultivando la célula huésped. La célula huésped se cultiva en uno de los diversos medios de cultivo conocidos y en diversas condiciones de cultivo conocidas de acuerdo con la célula huésped seleccionada.

Efectos ventajosos

Un gen que está unido de forma funcional a un promotor de acuerdo con la presente invención se expresa de forma eficaz en *E. coli* y *Corynebacterium ammoniagenes*. El promotor es adecuado para desarrollar una cepa usando bacterias del género *Corynebacterium*.

Un casete de expresión que incluye al promotor de acuerdo con la presente invención y un vector que incluya el casete de expresión de acuerdo con la presente invención son adecuados para expresar de forma eficaz un gen exógeno en *E. coli* y *Corynebacterium ammoniagenes*.

Una célula huésped de acuerdo con la presente invención puede expresar de forma eficaz un gen exógeno.

Usando un procedimiento para expresar un gen de acuerdo con la presente invención, puede expresarse de forma eficaz un gen exógeno.

Mejor modo

- 5 La presente invención se describirá en mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solamente para propósitos ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

10 Se prepararon extractos bacterianos a partir de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) en diversas fases de cultivo. Se realizó electroforesis bidimensional sobre los extractos bacterianos para hallar proteínas sobre-expresadas en los mismos, que después se escindieron para analizar las secuencias peptídicas. Las secuencias peptídicas obtenidas se usaron para identificar los genes de las proteínas sobre-expresadas. Después, se aislaron las regiones promotoras, y se produjeron vectores usando las regiones promotoras. A continuación, se midieron las actividades del promotor en *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) y *E. coli*.

15 Ejemplo 1: Cultivo de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) y selección de la proteína de sobre-expresión de acuerdo con las fases de cultivo

(1) Cultivo de bacterias

20 Se cultivó *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) en un medio que tenía azúcar sin procesar de melazas (mezcla que contenía un 50 % de glucosa y un 50 % de fructosa). En este momento, se midió la concentración celular. Se recogieron muestras de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) cultivada a una fase estacionaria temprana y en fases estacionarias. Las muestras se centrifugaron y se retiró la solución superior resultante. El sedimento celular obtenido se lisó en un tampón disgregante para producir aproximadamente 100 µm de un extracto bacteriano.

(2) Ensayo de electroforesis bidimensional

25 El extracto bacteriano obtenido de la sección (1) se diluyó usando urea 6 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4 %, y DTT al 0,4 % para obtener una mezcla con un volumen total de 350 µl. Después, se añadieron a la misma 7 µl de un tampón IPG y 3 µl de azul de bromofenol (BPB) al 1 %. La solución resultante se cargó en una placa de rehidratación usando una tira seca de gradiente de pH de inmobilina. La muestra en la placa de rehidratación se cubrió con 2 ml de un líquido de cobertura para evitar la vaporización de la muestra y la cristalización de la urea, y después se rehidrató a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas.

30 La tira de gel rehidratado se sometió a enfoque isoeléctrico a 20 °C a 0-100 V durante 1 hora, a 300 V durante 1 hora, 600 V durante 1 hora, y a 8000 V durante un tiempo predeterminado, que se ajustó para realizar el enfoque para 43-97 kVh (pH 4-7: 43,4 kVh, pH 4,5-5,5, pH 5,5-6,7: 97 kVh) usando un dispositivo de enfoque isoeléctrico (Multiphor II: producido por Amersham Bioscience, EEUU).

35 Cuando se completó el enfoque isoeléctrico, las tiras de gel respectivas se equilibraron en una solución de pH 8,8 que contenía Tris-HCl 20 mM, urea 6 M, SDS al 2 %, glicerol al 20 %, acrilamida al 2,5 % y TBP 5 mM durante 15 minutos. Las tiras equilibradas respectivas se cargaron en un gel bidimensional (gradiente de concentración del 9-16 %) y después se selló con una solución de SDS que contenía agarosa al 0,5 % que tenía un bajo punto de ebullición y BPB al 0,001 %. La electroforesis se realizó a 100 V durante aproximadamente 19 horas.

40 Después de completarse la electroforesis, el gel se inmovilizó en una solución de metanol al 45 % y solución de ácido acético al 5 %. El ácido acético se lavó durante 1 hora usando agua destilada. El gel se sensibilizó con tiosulfato sódico al 0,02 % durante 2 minutos y se lavó con agua destilada. Después, el gel se hizo reaccionar con nitrato de plata al 0,1 % durante 20 minutos y se lavó con agua destilada. El producto de reacción se reveló con una solución que contenía carbonato sódico al 2 % (p/v) y formaldehído al 0,04 % (v/v). Cuando apareció una mancha que tenía la fuerza deseada, se detuvo la reacción usando ácido acético al 1 %. Se lavó el gel con agua destilada y se almacenó en una bolsa de plástico sellada a 4 °C.

45 Cuando se usa tinción de coomassie, después de completarse la electroforesis, el gel se fijó usando una solución de metanol al 30 % y una solución de ácido acético al 10 % durante 1 hora, se lavó con agua destilada, se tiñó con brillante de coomassie coloidal G-250 durante 24 horas, y después se blanqueó con una solución de metanol al 10 % y una solución de ácido acético al 7 % durante 4 horas.

(3) Preparación de la muestra peptídica usada para espectrometría de masas basada en manchas

50 Se separó el péptido de las manchas usando una versión modificada de un procedimiento conocido (Shevchenko y col., Anal. Chem., 68(5), 850-8, 1996).

En primer lugar, se escindió una mancha de proteína del gel preparado en la sección (2), se blanqueó en 120 µl de una solución mixta de ferricianuro de potasio 30 mM y tiosulfato sódico 100 mM a una proporción de 1:1, y se lavó con agua destilada y después con 120 µl de acetonitrilo al 50 %/bicarbonato amónico 25 mM (pH 7,8) durante 10 minutos. El producto resultante se hizo reaccionar con 50 µl de acetonitrilo al 100 % durante aproximadamente 5 minutos hasta que apareció un color blanco y después se secó al vacío.

Se añadieron 10 µl de tripsina de calidad de electroforesis bidimensional (0,02 µg/µl) a las manchas secas y después se hicieron reaccionar en hielo durante 45 minutos. Después, se añadió tampón bicarbonato amónico 50 mM (pH 7,8) al producto de reacción y se hizo reaccionar a 37 °C durante 12-14 horas. El producto resultante se trató tras veces con ondas ultrasónicas durante 10 minutos en 10 µl de TFA al 0,5 % y acetonitrilo al 50 % para extraer un péptido.

(4) Espectrometría de masas

El péptido extraído como se ha descrito anteriormente se ensayó a través de HPLC-EM/EM. La HPLC-EM/EM se realizó con el sistema HPLC 1100 series (producido en Agilent Inc, EEUU) y un dispositivo de espectrometría de masas de retención de iones Finnigan LCQ DECA (producido en ThermoQuest, EEUU) sobre el cual se instaló una fuente de ionización por nanonebulización. La HPLC se realizó con una columna de fase inversa C18 microprobe, se proporcionó ácido fórmico al 0,1 % (disolvente A) y solución (disolvente B) de acetonitrilo al 90 % (v/v) y ácido fórmico al 0,1 % en un gradiente lineal (caudal=1 ml/min) para aislar un péptido.

La detección del péptido se realizó 3 veces usando ionización por nanonebulización (INN) (voltaje de nebulización: 1,8 kV; temperatura del capilar: 200 °C; voltaje del capilar: 34 V; compensación de la lente de conducción: 40 V; y multiplicador electrónico: -60 V). Las mediciones se obtuvieron en un modo centroide. Después de obtenerse la exploración EM completa de 400-2000 Da, se estableció un valor umbral a 1×10^5 recuentos y los iones más fuertes se separaron a través de una exploración de zoom de alta resolución. Después, se realizó EM/EM por disociación inducida por colisión (DIC). La secuencia de un espectro DIC que no estuviera codificado se identificó usando el software TurboQuest (producido por Thermo Finnigan Inc, EEUU). Los resultados de una búsqueda SEQUEST se identificaron a través de correlación cruzada y ΔC_n (correlación normalizada delta).

La secuencia de aminoácidos del péptido se confirmó e identificó usando EMCL/EM Q-star Pulsar (producida por Applied Biosystems Inc, EEUU).

Como resultado, se hallaron 50 proteínas, y se seleccionaron siete proteínas sobre-expresadas de las 50 proteínas. La FIG. 1 muestra los resultados del ensayo de electroforesis bidimensional de una muestra extraída de *Corynebacterium ammoniagenes*, en que los resultados de ensayo se tiñeron con plata y se revelaron para su identificación. En la FIG. 1, se identificaron siete manchas sobre-expresadas indicadas por CJ1 a CJ7. Las funciones de estas siete proteínas sobre-expresadas se indicaron en la Tabla 1. Las funciones de estas proteínas se identificaron comparando la secuencia del péptido con una secuencia de aminoácidos contenida en la base de datos del banco genético NCBI.

Tabla 1

Nombre de la mancha	Proteína	Nº de acceso al banco genético
	Proteína de choque térmico hsp60	AE008903.1
	5-Carboxi metil-2-hidroxi muconato semialdehído deshidrogenasa	NC-006461.1
	Homoprotocateculato 2,3-dioxigenasa	NC-005835.1
	Factor de extensión de traducción temporal EF-Tu	YP-145957
	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	AAA69094
	Cisteína sintasa	AAV89445
	Manganeso superóxido dismutasa	NP-940564

Se asumió una secuencia génica a partir de las siete proteínas sobre-expresadas y se analizó para seleccionar una región promotora. Como resultado, se supuso que los oligonucleótidos de las SEC ID Nº 1 a 7 separados de la secuencia génica correspondiente a las proteínas indicadas por CJ1 a CJ7 tienen actividad promotora.

Ejemplo 2: Fabricación del vector recombinante p117-ci1-7-gfp que tiene secuencia promotora y confirmación de la actividad promotora en *Corynebacterium ammoniagenes*

(1) Amplificación de la secuencia promotora del genoma de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

Se separaron 500 µg del ADN cromosómico a partir de 25 ml de cultivo de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 incubado durante un día, usando un procedimiento sugerido por Eikmann y col. (Gene, 102, 93-98, 1991).

El ADN cromosómico separado se usó como molde. Se realizaron PCR usando series de cebadores (SEC ID N° 10 y 11, 12 y 13, 14 y 15, 16 y 17, 18 y 19, 20 y 21, y 22 y 23) para amplificar los promotores de CJ1 a CJ7 durante 30 segundos a 94 °C, a 55 °C, y a 72 °C, repetido 30 veces, respectivamente. Como resultado, se amplificaron las secuencias promotoras respectivas pcj1 a pcj7.

5 (2) Fabricación del vector de exploración

En primer lugar, se realizaron PCR usando un vector pGFuv (producido por Clontech Inc, EEUU) como molde y usando las SEC ID N° 8 y 9 como cebador a 94 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 30 segundos, y a 72 °C durante un minuto, respectivamente. La PCR se realizó 30 veces a cada temperatura. Como resultado, se amplificó un gen de proteína verde fluorescente (GFP) que no incluía una región promotora. Después, el gen de GFP obtenido que no incluía una región promotora se clonó en vectores pCR2.1-TOPO (producidos en Invitrogen, EEUU), que después se escindieron por *Pst*I y *Eco*RI y se introdujeron en el sitio *Pst*I y *Eco*RI de pECCG117 (KFCC-10673/KFCC-10674), que se un vector lanzadera y puede expresarse en *E. coli* y bacterias corineformes. El resultado se usó como vector de exploración (p117-gfp) para separar el promotor. La FIG. 2 ilustra un procedimiento para producir el vector de exploración de p117-gfp de acuerdo con una realización de la presente invención.

15 (3) Introducción de la secuencia promotora en el vector de exploración e identificación de la actividad promotora en *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

El vector de exploración obtenido en la sección (2) se escindió con una enzima de restricción de *Kpn*I/*Eco*RV y después ligó a las secuencias promotoras de pcj1 a pcj7 que se habían escindido por la misma enzima de restricción para producir vectores recombinantes de p117-cj1-7-gfp en los que los oligonucleótidos de pcj1 a pcj7, que se separaron de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 y se les había supuesto actividad promotora, se ligaron con la GFP. La FIG. 3 ilustra un procedimiento para producir un vector recombinante que incluye las SEC ID N° pcj1 a pcj7 del vector de exploración p117-gfp de acuerdo con una realización de la presente invención.

El vector recombinante obtenido se introdujo en *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) lista para transformación a través de un procedimiento introducido por van der Rest y col. (Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 541-545, 1999). La cepa transformada resultante se extendió en un medio CM (peptona al 1 %, caldo al 1 %, cloruro sódico al 0,25 %, extracto de levadura al 1 %, 100 mg/ml de adenina, 100 mg/ml de guanina, agar al 2 % (pH 7,2)) que contenía 10 µg/ml de kanamicina y se cultivó a 32 °C durante 3 días. Se exploró una cepa viable que mostró crecimiento a partir de las colonias. Después, se irradió con luz ultravioleta la cepa explorada y se seleccionaron las cepas que irradiaban fluorescencia.

30 La exploración de las cepas que irradiaban fluorescencia indica que los promotores de pcj1 a pcj7 muestran actividad promotora en una bacteria corineforme.

Mientras tanto, se midió cuantitativamente la actividad promotora. El vector recombinante de p117-cj1-7-gfp se introdujo en *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) y se cultivó del mismo modo al descrito anteriormente. El cultivo se centrifugó para obtener el sedimento bacteriano. Después, se suspendió el sedimento bacteriano en un tampón de extracto de proteína (EDTA 1 mM de PBS, glicerol al 3 %, solución triton-X-100 al 1 %, pH-7,5) y se lisó por ultrasonificación. El lisado se centrifugó y se separó la solución superior resultante que contenía un extracto bacteriano. La cantidad de la proteína contenida en el extracto bacteriano se midió a través de un procedimiento de ensayo de Bradford. Posteriormente, se irradió con luz de 488 nm un extracto bacteriano igual en cantidad al extracto bacteriano descrito anteriormente usando un procedimiento introducido por Laure Gory y col. (FEMS Microbiology Letters 194, 127-133, 2001) y se midió la luz emitida usando un espectrofotómetro LS-50B (Perkin-Elmer) para hallar el grado de expresión del gen GFP y se descubrió que tenía una longitud de onda de 511 nm.

45 Los resultados se muestran en la Tabla 2. Como se muestra en la Tabla 2, el promotor de acuerdo con una realización de la presente invención dirige la expresión eficaz de un gen GFP. Más particularmente, los promotores de pcj1 y pcj4 mostraron la mayor eficacia en comparación con los otros promotores.

Tabla 2

Promotor	pcj1	pcj2	pcj3	pcj4	pcj5	pcj6	pcj7
	12309	437	479	11790	1363	5651	2493

Ejemplo 3: Comparación de las actividades del promotor tac y el promotor de acuerdo con una realización de la presente invención en *Corynebacterium ammoniagenes*

50 En el presente experimento, se compararon las actividades de un promotor de acuerdo con una realización de la presente invención y un promotor tac que se usa convencionalmente en *Corynebacterium ammoniagenes*.

(1) Fabricación del vector que contiene la secuencia del promotor tac y el gen GFP combinado

En primer lugar, se realizó una PCR usando un vector pKK223-2 (producido por Pharmacia Biotech, EEUU) como molde y usando las SEC ID N° 24 y 25 como dejador del mismo modo que en el Ejemplo 1 para amplificar la secuencia promotora tac. El producto amplificado se clonó en un vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, EEUU). Después, la secuencia promotora tac obtenida se escindió con las enzimas de restricción KpnI y EcoRV y se ligó a p117-gfp que se había escindido con las mismas enzimas de restricción para obtener un vector de expresión recombinante (p117-tac-gfp).

El vector recombinante se usó para transformar *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 del mismo modo que en el Ejemplo 1, y se midió la actividad del gen GFP. Se comparó la actividad del gen GFP debida al promotor tac con la actividad del gen GFP debida al promotor seleccionado de acuerdo con el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Promotor	pcj1	pcj2	pcj3	pcj4	pcj5	pcj6	pcj7 Ptac
	1140 %	40 %	44 %	1092 %	126 %	523 %	231 % 100 %

Como se muestra en la Tabla 3, se descubrió que un promotor de acuerdo con una realización de la presente invención expresaba de forma eficaz un gen GFP. Además, cuando se compara la actividad de los promotores de acuerdo con una realización de la presente invención en *Corynebacterium ammoniagenes* con la actividad del promotor tac en *Corynebacterium ammoniagenes*, los promotores pcj1, pcj4, pcj5, pcj6 y pcj7 mostraban intensidades mayores que el promotor tac. En particular, los promotores de pcj1 y pcj4 mostraron 10 veces la actividad del promotor tac.

Ejemplo 4: Confirmación de la actividad del promotor de acuerdo con la presente invención en *E. coli*

Se confirmó que el promotor de acuerdo con una realización de la presente invención mostraba actividad en *E. coli* además de en bacterias corineformes. Se transformó *E. coli* con el vector de expresión recombinante usado en los Ejemplos 1 y 2.

Se determinó si el promotor de acuerdo con una realización de la presente invención posibilita la expresión eficaz del gen GFP en *E. coli* midiendo la actividad del gen GFP del mismo modo que en el Ejemplo 1. Un vector de referencia fue un vector recombinante de p117-tac-gfp que contenía el promotor tac. La Tabla 4 muestra la actividad promotora de promotores de acuerdo con realizaciones de la presente invención en *E. coli*.

Tabla 4

Promotor	pcj1	pcj2	pcj3	pcj4	pcj5	pcj6	pcj7	ptac
	296 %	15 %	20 %	17 %	19 %	24 %	24 %	100 %

Como se muestra en la Tabla 4, se descubrió que el promotor de acuerdo con una realización de la presente invención expresaba de forma eficaz el gen GFP en *E. coli*. Más particularmente, el promotor pcj1 mostraba elevada actividad tanto en bacterias corineformes como en *E. coli*.

Ejemplo 5: Efectos de IPTG sobre la actividad del promotor de acuerdo con la presente invención

Es bien sabido que un promotor tac es un promotor representativo mediante el cual la expresión génica es inducible por IPTG (isopropiltio-13-D-galactósido) en *E. coli*. En otras palabras, en *E. coli*, la cantidad de un gen expresado por el promotor tac varía de acuerdo con la presencia o ausencia de IPTG.

En el presente experimento, se midieron los efectos de IPTG sobre la expresión de un gen GFP por un promotor de acuerdo con una realización de la presente invención. Para este fin, se introdujo un vector recombinante que contenía el promotor pcj1 que tenía mayor actividad que los otros promotores de p117-cj1-gfp en *E. coli* y *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) del mismo modo que en los Ejemplos 1 y 2, y se midió la cantidad del gen GFP expresado mediante el mismo. La referencia fue un vector recombinante de p117-tac-gfp que contenía el promotor tac.

Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Célula huésped	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> CJHB100				<i>E. coli</i>			
Inducción	Inducción con IPTG		Sin inducción		Inducción con IPTG		Sin inducción	
Promotor	ptac	pcj1	ptac	pcj1	ptac	pcj1	ptac	
Intensidad de fluorescencia	2089	5530	1959	5048	6480	7165	2314	

Como se muestra en la Tabla 5, un promotor de acuerdo con una realización de la presente invención expresaba de forma más eficaz un gen GFP en *E. coli* y *Corynebacterium ammoniagenes* que un promotor tac, independientemente de la presencia de IPTG.

5 Los promotores de pCJ1, pCJ2, pCJ3, pCJ4, pCJ5, pCJ6 y pCJ7 obtenidos en los Ejemplos descritos anteriormente se insertaron en pECCG117. Los vectores obtenidos se usaron para transformar *E. coli* DH5. Los transformantes resultantes se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM), que es una organización de depósito internacional según el Tratado de Budapest, el 11 de junio de 2004 (número de depósito: KCCM-10611, KCCM-10612, KCCM-10613, KCCM-10614, KCCM-10615, KCCM-10616, y KCCM-10617).

10 <110> CJ Corporation

<120> Ácido nucleico promotor derivado de bacterias del género *Corynebacterium*, casete de expresión que comprende el promotor y vector que comprende el casete, célula huésped que comprende el vector y procedimiento para expresar un gen usando la célula

15 <130> PN05941

<160> 24

20 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 301

<212> ADN

25 <213> *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

<400> 1

```

caccgcgggc ttattccatt acatggaatg accaggaatg gcagggaatg cgacgaaatt      60
gactgtgtcg ggagcttctg atccgatgct gcccaaccagg agagaaaata atgacatgtg      120
caggcacgct ggtgagctgg agatttatga tctcaagtac cttttttctt gcaactcgagg      180
gggctgagtg ccagaatggg tgctgacacc agggtgaggt tggtacacac tcaccaatcc      240
tgccgtcgcg ggcgcctgcg tggaacataa accttgagtg aaaccaatc taggagatta      300
a                                                                              301
    
```

30 <210> 2

<211> 285

<212> ADN

<213> *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

35 <400> 2

```

aattccacca gacgttgttt agtaagtgcc cgaattctcg gttggtgcag ttgctttctg      60
atgaatggga gaacctcgaa tacttccgcg tctctacttt ccggtacgtg ccacacagag      120
cagagcaatc ggtggaagag cacgacagat tagtagcgct tatcgaagcc caggcagaag      180
atctctacat cgaatcccaa gcccgcaacc accgcctgac aaccgcaacg acctaccgcc      240
aacgtttaa tccgaaaat catcacgaag aacaaggagt gcaca                          285
    
```

40 <210> 3

<211> 291

<212> ADN

<213> *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

<400> 3

ES 2 409 255 T3

	gctgcctaca tctggacttc tgacctgaag cgctcccaca acttcgcgca aaacgttgaa	60
	gccggcatgg tctgggtgaa ctccaacaac gtccgtgacc tgcgcacccc attcgggtggc	120
	gtcaaggcat ccggtctggg gcatgagggc ggctaccgct ccattgactt ctacaccgac	180
	caacaggccg tacacatcaa cttaggcgaa gtccacaacc cagtcttcgg caagcaaacc	240
	aactaattct ccctcatcca cactcccctt ttaacctcac taggagtcac c	291
5	<210> 4 <211> 312 <212> ADN <213> <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> CJHB100	
	<400> 4	
	actgggaggg taggggtcac gctgaattag caggtcacat cctggtgctt gagctggccg	60
	ttaccctcct aggatccgag atgattcttg tagaggacta acgtccgcac aaatcttccg	120
	cgggatgctc aaatcacctt tagctggttt gaaaaatccg tggcataaat ctaggatcgt	180
	gtaactggca cgaaaagaaa gcgtcatcgg cgcttgggaa catcttttta agatattcct	240
	caagtgccgt gacatctgtc aaccccgtgg ctgcgagagt cgtagtcaca atgaagtcca	300
10	ggaggacata ca	312
15	<210> 5 <211> 249 <212> ADN <213> <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> CJHB100	
	<400> 5	
	tcggacatat acggatttac ctgctgcaat cgcgccggcc cttgctcgaa attgctgaa	60
	ttttagtctg attgtgttgg aatatccgca gaatgtgtgg gtttgctttt ataaatctgc	120
	gcagtgtagg gaacctcggc actatcggca gtgtcggaga aacttcctcg atataaatct	180
	ttgaagtaat tctcccagge aatagctttt gacgtactcc gttcccaac ttttaggag	240
20	acaactacc	249
25	<210> 6 <211> 332 <212> ADN <213> <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> CJHB100	

ES 2 409 255 T3

ggcttcacg tegtcttga tccgatgca gtccattaac ccaaactcct taaagcccg 60
 aaaacggggg tattccaaca cggttatcca cagttaacc gttattcggg ggtaatccta 120
 acccaaatca ttacggaaac tccaatctgg ctcaaatat cctccatgat tctagggaca 180
 cccaatcagg tgcaaccgct tcttgcgaca acgagtcaaa ctcggaag ccctcaacct 240
 gtcggtctag aatatatata ccgccgggc tagtggttg gtgtacacta acgataaacc 300
 aacaagtgtg tctattaaga ggaggccatt tc 332

5 <210> 7
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

<400> 7
 agaaacatcc cagcgctact aatagggagc gttgacctc ctccacgga cgggtaacg 60
 gagtgcctaa aaccgcatgc ggcttagget ccaagatagg ttctgcgagg ccgggtaatg 120
 catcttcttt agcaacaagt tgaggggtag gtgcaaataa gaacgacata gaaatcgtct 180
 cctttctggt ttaatacaac atacaccacc acctaaaaat tccccgacca gcaagttcac 240
 agtattcggg cacaatatcg ttgccaaaat attgtttcgg aatatcatgg gatacgtacc 300
 caacgaaagg aaacactc 318

10
 15 <210> 8
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

20 <400> 8
 acgcatatc atgagtaaag gagaagatct t 31

25 <210> 9
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

30 <400> 9
 aaaactgcag ttattgtag agctcatcca t 31

35 <210> 10
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador

<400> 10
 cggggtacca cggcggcctt atccattac at 32

ES 2 409 255 T3

5
<210> 11
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 11
10 acgcgatatc ttaatctcct agattgggtt tc 32

<210> 12
<211> 33
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 12
20 cggggtacca attccaccag acgtgttta gta 33

<210> 13
<211> 32
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador
30

<400> 13
acgcgatatc tgtgcactcc ttgttctcg tg 32

<210> 14
<211> 33
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador
40

<400> 14
cggggtaccg ctgcctacat ctggactct gac 33

<210> 15
<211> 31
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador
50

<400> 15
55 acgcgatatc gatgactcct agtgaggta a 31

<210> 16
<211> 29
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 16
65 cggggtacca ctgggagggt aggggtcac 29

ES 2 409 255 T3

<210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 17
 10 acgcgatatc tgtatgtcct cctggacttc 30
 <210> 18
 <211> 32
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 18
 cggggtacct cggacatata cggattacc tg 32
 <210> 19
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 19
 acgcgatatc gttgtctcct aaaaagttgg g 31
 <210> 20
 <211> 25
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 40 <400> 20
 cggggtaccg gcttcacgt cgtct 25
 <210> 21
 <211> 30
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 21
 acgcgatatc atggcctcct ctaatagac 30
 <210> 22
 <211> 33
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 60 <400> 22
 65 cggggtacca gaaacatccc agcgctacta ata 33

ES 2 409 255 T3

5
<210> 23
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

10 <400> 23
acgcgatatc agtgtttcct ttcgttggg 29

15 <210> 24
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

20 <400> 24
cggggyaccg ggagcttacc gactgcacg 29

REIVINDICACIONES

1. Un promotor que comprende un polinucleótido de la SEC ID N° 7.
2. Un casete de expresión, que comprende el promotor de la reivindicación 1 y está unido de forma funcional a una secuencia codificante.
- 5 3. Un vector que comprende el casete de expresión de la reivindicación 2.
4. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 3.
5. La célula huésped de la reivindicación 4 que es una célula bacteriana que pertenece a un género *Corynebacterium* o un género *Escherichia*.
- 10 6. Un procedimiento para expresar un gen exógeno que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 4 o reivindicación 5.

FIG. 1

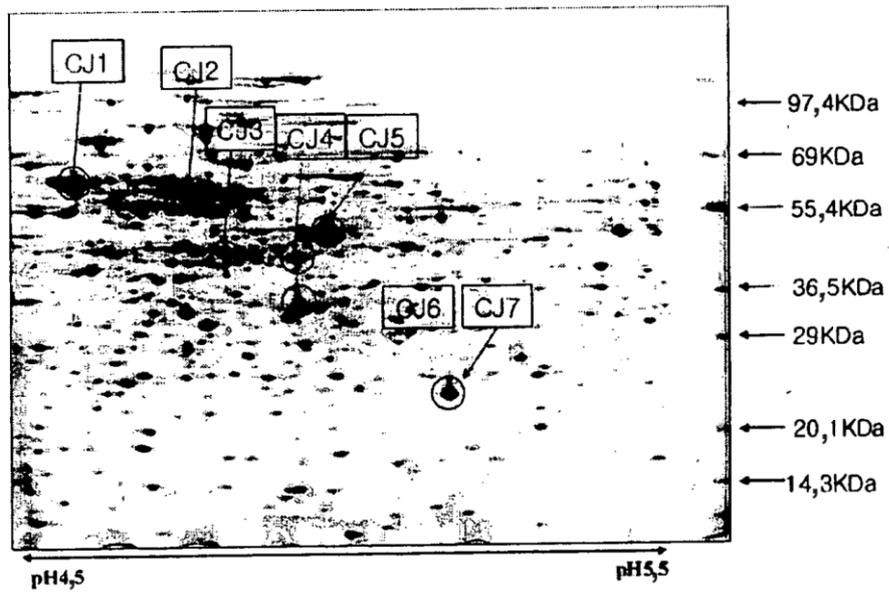


FIG. 2

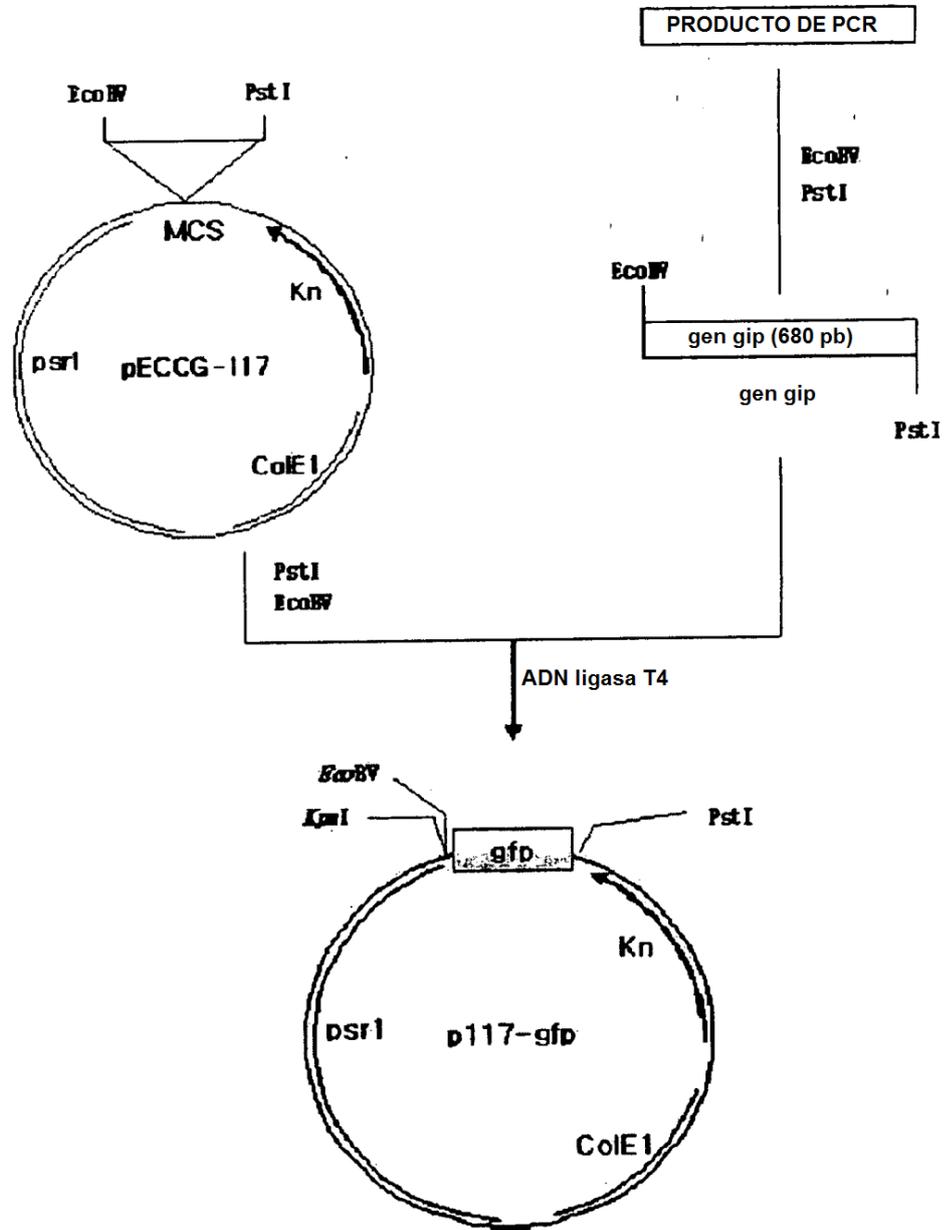


FIG. 3

