

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 753**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63	(2006.01)
C12N 15/70	(2006.01)
C12N 15/77	(2006.01)
C12N 15/113	(2010.01)
C12P 13/04	(2006.01)
C12P 13/08	(2006.01)
C12P 13/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2016 PCT/KR2016/000444**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16122146**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2016 E 16743624 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3250692**

54 Título: **Promotor y usos del mismo**

30 Prioridad:

29.01.2015 KR 20150014587

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

20.02.2020

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORP. (100.0%)
(Ssangnim-dong) 330, Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 04560 , KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SEUNG BIN;
BAE, HYUN AE;
LEE, JI HYE y
YANG, YOUNG LYEOL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 743 753 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

Promotor y usos del mismo

5 **Antecedentes de la técnica**

Para elaborar productos objetivo, por ejemplo, L-aminoácidos, ácidos orgánicos o materiales de ácido nucleico con un alto rendimiento mediante el uso de microorganismos, existe la necesidad de controlar selectivamente la expresión de los genes relacionados con diversos procesos metabólicos en los microorganismos. En particular, existe la necesidad de aumentar la expresión de genes objetivo involucrados en una vía biosintética de los productos objetivo, y por ejemplo, se puede realizar una modificación de una secuencia reguladora de la expresión. Esta modificación de la secuencia reguladora de la expresión puede incluir, por ejemplo, una sustitución de un promotor nativo por un promotor potente, una modificación de un promotor nativo, o una modificación de una secuencia de Shine-Dalgarno (SD). La sustitución de un promotor nativo por un promotor potente se ha utilizado en gran medida, y a este respecto, se considera esencial para el desarrollo de un promotor útil.

Sin embargo, los promotores potentes conocidos en la técnica están limitados y se pueden expresar únicamente en un microorganismo limitado. En algunos casos, los promotores potentes pueden no presentar efectos de expresión potente a diversos niveles de intensidad según se desee.

Un promotor tac derivado de *Escherichia coli* se conoce ampliamente como un promotor potente en la técnica. En el caso del género *Corynebacterium*, se ha desarrollado un promotor nuevo por modificación de un promotor nativo (véase Gene, 102, 93-98, 1991; Microbiology, 142, 1297-1309, 1996). Por ejemplo, se ha descrito que el promotor derivado de *Corynebacterium ammoniagenesis* tiene aproximadamente un 10 % más de actividad que el promotor tac derivado de *E. coli* (véase Biotechnol. Lett. 25, 1311-1316, 2003). Además, como un promotor potente derivado de *Corynebacterium ammoniagenesis*, se han desarrollado los promotores Pcj1 a Pej7 con diversos niveles de intensidad, los cuales tienen una potente actividad promotora que es por lo menos 10 veces la del promotor tac (véase KR 10-0620092). Además, se ha descrito que el promotor derivado de *Brevibacterium flavum* MJ-233 (FERM BP-1497) tiene una actividad más potente que la del promotor tac, pero tiene dificultades en expresarse en un microorganismo diferente de los microorganismos que pertenecen al género *Brevibacterium* (véase el documento US 5.593.781).

A este respecto, cuando los inventores exploraron una región que incluye una secuencia promotora que puede tener varios niveles de intensidad en una diversidad de microorganismos diferentes, se encontró que un promotor sintetizado se expresaba en una diversidad de microorganismos diferentes y presentaba efectos de expresión mucho más potentes que los de los promotores existentes conocidos en la técnica, y de esta manera completaron la presente invención.

El documento US2014/0147889 se refiere a un promotor de corinebacteria. Pátek et al. (2013; Microbial Biotechnology, 6(2), 103-117) se refiere a promotores de *Corynebacterium glutamicum*: un enfoque práctico. Yim et al. (Biotechnology and Bioengineering, 110, no. 11 (2013): 2959-2969) se refiere al aislamiento de promotores totalmente sintéticos para la expresión génica a alto nivel en *Corynebacterium glutamicum*. KR10-0620092 se refiere a un nuevo ácido nucleico promotor derivado del género *Corynebacterium*, un casete de expresión que comprende el promotor y el vector que comprende el casete, la célula hospedadora que comprende el vector y el método de expresión de un gen usando la células. El documento KR 10-2009-0082702 se refiere a un promotor intensificado y a un método para producir L-lisina usando el mismo. Busche et al. (BIOspektrum 20, no. 3 (2014): 284-287) se refiere a la identificación de promotores en *Corynebacterium glutamicum*. Woo et al. (Journal of Biotechnology 180 (2014): 43-51) se refiere al reciente progreso en el desarrollo de plataformas biológicas sintéticas e ingeniería metabólica de *Corynebacterium glutamicum*.

50 **Divulgación de la invención****Problema técnico**

55 Una o más de las realizaciones ilustrativas incluyen un promotor novedoso, una secuencia reguladora de la expresión que comprende el promotor novedoso, un vector que incluye el promotor novedoso, una célula hospedadora que incluye al vector y un método para producir el producto objetivo utilizando la célula hospedadora.

60 **Solución al problema**

Se proporciona un promotor que comprende una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1. En lo sucesivo, el promotor se denomina un "promotor o2 (en lo sucesivo denominado "Po2")".

65 El término "promotor", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una región de ADN con la cual se combina una ARN polimerasa para permitir el inicio de transcripción de un gen que está unido operativamente al promotor y que se puede situar en el extremo 5' de un sitio de inicio para la transcripción de un ARNm.

Un polinucleótido que tenga actividad promotora como se utiliza en la presente memoria se puede modificar en cierta medida de acuerdo con estudios recientes de varias técnicas, como por ejemplo una técnica de evolución dirigida o una técnica de mutagénesis dirigida al sitio. Por ejemplo, un promotor que tenga una homología de 70 % o mayor, 80 % o mayor, 90 % o mayor o 95 % o mayor con la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1 también se divulga en la presente memoria.

El término "homología", como se utiliza en la presente memoria, se refiere al grado (representado en porcentaje) de identidad de secuencia entre secuencias de polinucleótidos. En la presente memoria descriptiva, una homología de una secuencia idéntica a una secuencia de polinucleótidos dada o una secuencia que tiene una actividad similar con la de una secuencia de polinucleótidos dada se representa en términos de "% de homología". Por ejemplo, la homología de secuencias de polinucleótidos se puede determinar mediante la utilización de un software convencional, por ejemplo, BLAST 2.0, para calcular parámetros como por ejemplo puntuación, identidad y similitud. De manera alternativa, la homología de secuencias de polinucleótido se puede identificar comparando secuencias de acuerdo con un método de hibridación realizado en condiciones rigurosas definidas. Las condiciones definidas y apropiadas para el método de hibridación se pueden determinar considerando los métodos que son bien conocidos por una persona experta en la materia (véase más adelante en Sambrook et al., 1989).

De acuerdo con la invención, se proporciona una secuencia reguladora de la expresión que controla la expresión de un gen objetivo, que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1.

La expresión "secuencia reguladora de la expresión", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de ADN utilizada para expresión de una secuencia codificante que está unida operativamente a la secuencia de ADN en un organismo hospedador. Esta secuencia reguladora de la expresión puede incluir un promotor necesario para iniciar la transcripción, una secuencia operadora para regular la transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión al ribosoma del ARNm adecuado, y una secuencia para regular la terminación de la transcripción y la traducción. Por ejemplo, una secuencia reguladora de la expresión adecuada para procariontas puede incluir un promotor, una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma, pero no se limita a estos. Una secuencia reguladora de la expresión de la presente invención incluye Po2, como se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con una realización, se proporciona un vector que incluye la secuencia reguladora de la expresión y un gen objetivo unido operativamente a la secuencia reguladora de la expresión.

La expresión "unido operativamente", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un enlace entre una secuencia reguladora de la expresión que controla un gen objetivo (por ejemplo, un promotor) y otras secuencias de nucleótidos. A este respecto, la secuencia reguladora de la expresión puede ser capaz de controlar la transcripción y/o traducción de las otras secuencias de nucleótidos.

El término "vector", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un producto de ADN que incluye secuencias de base de un polinucleótido para codificar una proteína objetivo que está unida operativamente a una secuencia reguladora de la expresión apropiada para expresar la proteína objetivo. Además, se pueden unir o se pueden recombinar una pluralidad de secuencias de nucleótidos con el vector de manera que una secuencia de ADN de un gen seleccionado con una secuencia 3' no traducida apropiada y un promotor se pueden introducir en una célula. El vector se puede utilizar para transformación en una célula hospedadora apropiada, y a continuación, se puede replicar independientemente del genoma de la célula hospedadora. De modo alternativo, el vector se puede integrar en el genoma de la célula hospedadora. Además, el vector puede incluir el promotor y el gen objetivo, y adicionalmente puede incluir un origen de replicación, un sitio regulador promotor, un sitio de unión al ribosoma, un sitio de finalización de la transcripción, un marcador selectivo o una combinación de los mismos.

El vector utilizado en la presente invención no está particularmente limitado siempre que pueda ser replicado en una célula hospedadora y se puede utilizar cualquier vector disponible en la técnica. Los ejemplos del vector utilizados habitualmente en la técnica incluyen un vector plasmídico natural o recombinante, un vector cósmido, un vector viral y un vector bacteriófago. Los ejemplos de vectores bacteriófagos y cósmidos incluyen pWE15, M13, λ MBL3, λ MBL4, λ IXII, λ ASHII, λ APII, λ t10, λ t11, Charon4A, y Charon21A y ejemplos de los vectores plasmídicos incluyen los vectores a base de pBR, a base de pUC, a base de pBluescriptII, a base de pGEM, a base de pTZ, a base de pCL y a base de pET, pero los vectores no se limitan a estos.

El gen objetivo se refiere a un gen que codifica un producto que se expresa en una cantidad en exceso. Por ejemplo, el gen objetivo puede ser un gen involucrado en la producción de un producto que se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos (por ejemplo, L-aminoácido), ácidos orgánicos y combinaciones de los mismos. En detalle, el gen objetivo puede ser un gen que codifique una enzima involucrada en la biosíntesis de aminoácidos, un gen que codifique una enzima involucrada en la biosíntesis de ácidos orgánicos, o un gen que codifique una proteína involucrada en la exportación de un producto objetivo, pero sin limitarse a estos.

De acuerdo con una realización, se proporciona una célula hospedadora que incluye un vector, en el que el vector

incluye una secuencia reguladora de la expresión que controla a un gen objetivo e incluye un promotor que tiene una secuencia nucleotídica representada por la SEQ ID NO: 1 y un gen objetivo que está unido operativamente a la secuencia reguladora de la expresión.

5 La célula hospedadora no está particularmente limitada siempre que se utilice un microorganismo como la célula hospedadora que sea capaz de introducir el vector que incluye la secuencia reguladora de la expresión que controla un gen objetivo e incluye un promotor que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1 y el gen objetivo que está unido operativamente a la secuencia reguladora de la expresión. La célula hospedadora puede ser una célula procariota y una célula eucariota, pero en una realización ilustrativa, puede ser una célula procariota.
10 Por ejemplo, la célula hospedadora puede incluir una cepa de un microorganismo que pertenezca al género *Escherichia*, el género *Erwinia*, el género *Serratia*, el género *Providencia*, el género *Corynebacterium* y el género *Brevibacterium*. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una cepa de un microorganismo que pertenezca al género *Corynebacterium* o los genes de *Escherichia*. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una cepa de un microorganismo que pertenezca a *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum*, o *Brevibacterium lactofermentum*.

La introducción del vector se puede realizar, como se describe en la técnica, seleccionando una técnica adecuada de acuerdo con la célula hospedadora. La introducción del vector se puede realizar, por ejemplo, por electroporación, choque térmico, precipitación con fosfato de calcio (CaPO₄), precipitación con cloruro de calcio (CaCl₂), microinyección, polietilenglicol (PEG), el método de DEAE-dextrano, un método de liposoma catiónico, un método de acetato de litio-DMSO o una combinación de los mismos, pero no se limita a estos.
20

De acuerdo con una realización, se proporciona un método para producir un producto objetivo, incluyendo el método: cultivar una célula hospedadora en un medio, en el que la célula hospedadora comprende un vector que incluye una secuencia reguladora de la expresión que comprende un promotor que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1, y un gen objetivo que está unido operativamente a la secuencia reguladora de la expresión; y recuperar el producto objetivo de la célula hospedadora o del medio que incluye la célula hospedadora cultivada.
25

El producto objetivo se puede seleccionar del grupo que consiste en aminoácidos (por ejemplo, L-aminoácido), ácidos orgánicos y combinaciones de los mismos. El término "aminoácido" o "L-aminoácido", como se utiliza en la presente memoria se refiere en general a una unidad básica de una proteína que constituye un organismo vivo, en el cual un grupo aminoácido y un grupo carboxilo están unidos al mismo átomo de carbono. El aminoácido se puede seleccionar del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, treonina, serina, cisteína, cistina, metionina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, diiodotirosina, lisina, arginina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano, prolina, oxiprolina y combinaciones de los mismos, pero no se limita a estos. La expresión "ácido orgánico", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto orgánico que tiene acidez y, por ejemplo, puede incluir un compuesto orgánico que tenga un grupo carboxilo y un grupo sulfónico. El ácido orgánico puede incluir, por ejemplo, ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido butírico, ácido palmítico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido propiónico, ácido hexenoico, ácido cáprico, ácido caprílico, ácido valérico o ácido cítrico, pero no se limita a estos.
30
35
40

El cultivo de la célula hospedadora se puede realizar de acuerdo con métodos típicos conocidos en la técnica. El medio utilizado para el cultivo de la célula hospedadora puede incluir, como una fuente de azúcar, azúcar y carbohidratos, como por ejemplo glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; aceites y grasas como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes como por ejemplo glicerol y etanol; y ácidos orgánicos como por ejemplo ácido acético, individualmente o como una mezcla, pero no se limita a estos. El medio utilizado para el cultivo de la célula hospedadora puede incluir, como una fuente de nitrógeno, peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz fermentado, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos como por ejemplo sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, individualmente o como una mezcla, pero no se limita a estos. El medio utilizado para el cultivo de la célula hospedadora puede incluir, como una fuente de fósforo, dihidrógenofosfato de potasio o hidrógenofosfato de dipotasio, o sus correspondientes sales que contienen sodio, pero no se limitan a estos. El medio utilizado para el cultivo de la célula hospedadora puede incluir sales de metales como por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro, los cuales son necesarios para el crecimiento, pero las sales de los metales no se limitan a estas. Además, durante el cultivo de la célula hospedadora, se pueden agregar al medio de cultivo sustancias de crecimiento esenciales, como por ejemplo aminoácidos y vitaminas o precursores adecuados. Estos materiales se pueden agregar al medio de cultivo durante el cultivo de la célula hospedadora de una manera apropiada y, por ejemplo, se pueden agregar por lotes o de modo continuo.
45
50
55
60

Además, durante el cultivo de la célula hospedadora, se pueden agregar al medio de cultivo de una manera adecuada para regular el pH del medio de cultivo compuestos como por ejemplo hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico. Además, durante el cultivo de la célula hospedadora se puede utilizar un agente antiespumante como por ejemplo un éster de poliglicol de ácido graso para evitar la producción de espuma. Para mantener las condiciones aerobias del medio de cultivo, se puede introducir en el medio de cultivo
65

oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire). Aquí, la temperatura del medio de cultivo puede estar en un intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C. Además, el cultivo de la célula hospedadora puede continuar hasta que se obtenga una cantidad deseada del producto objetivo y a este respecto, el cultivo de la célula hospedadora puede continuar durante aproximadamente 10 horas a aproximadamente 160 horas.

La recuperación del producto objetivo a partir de la célula hospedadora o del medio de cultivo que incluye a la célula hospedadora cultivada se puede realizar (es decir, se puede separar o recuperar) a través de una reacción apropiada conocida en la técnica. Por ejemplo, una reacción apropiada puede elaborarse de acuerdo con un tratamiento utilizando precipitantes de proteína (es decir, un método de precipitación), centrifugación, extracción, sonicado, ultrafiltración, diálisis, diversas técnicas de cromatografía como por ejemplo cromatografía de tamiz molecular (es decir, filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y una combinación de las mismas, pero no se limita a estas. A este respecto, el producto objetivo producido se puede recolectar, recuperar o separar a partir de la célula hospedadora o el medio que incluye a la célula hospedadora cultivada

Modo de llevar a cabo la invención

A continuación la presente invención se describirá más detalladamente con referencia a los siguientes ejemplos. No obstante, estos ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Preparación de un vector recombinante que comprende un promotor novedoso y una cepa transformada utilizando el mismo

(1) Preparación de un vector recombinante que comprende Po2 y una cepa transformada utilizando el mismo

Para sintetizar un promotor que induzca la expresión de un gen objetivo se analizaron las secuencias de varios promotores derivados de un microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium* y un microorganismo que pertenece al género *Escherichia*, para sintetizar de esta manera un promotor que tenga una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. El promotor sintetizado se denominó promotor o2 (en lo sucesivo denominado "Po2"). Para medir la actividad de Po2 para inducir la expresión de un gen objetivo, Po2 se unió operativamente a un marco de lectura abierto (ORF) de un gen GFP de manera que se preparó un vector recombinante. A continuación, cada una de las cepas de corinebacteria y *E. coli* se transformó con el vector recombinante para preparar de esta manera cada una de las cepas transformadas de corinebacteria y *E. coli*.

Además, para preparar una cepa que tenga capacidad mejorada para producir L-aminoácidos, por ejemplo, L-arginina, o aminoácidos ramificados, como por ejemplo L-valina, como un ejemplo de un producto objetivo, se utilizó Po2 para aumentar la expresión del gen biosintético de la arginina o la valina.

(1.1) Preparación de un vector pECCG117-Po2-gfp y una cepa transformada utilizando el mismo

(1.1.1) Preparación de un vector

Se llevó a cabo una PCR mediante la utilización del Po2 sintetizado como molde y un conjunto de cebador de la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 que incluyen los sitios de restricción Kpn I/EcoR V. La PCR se realizó de acuerdo con los ciclos de desnaturalización a una temperatura de 94 °C durante 5 minutos, desnaturalización a una temperatura de 94 °C durante 30 segundos, hibridación a una temperatura de 60 °C durante 30 segundos y polimerización a una temperatura de 72 °C durante 30 segundos, en la que los ciclos se realizaron 30 veces. Posteriormente la polimerización se realizó nuevamente en las cepas a una temperatura de 72 °C durante 7 minutos, obteniéndose así Po2 que tiene una longitud de aproximadamente 100 pares de bases.

La PCR se realizó utilizando un vector pGFPuv (fabricado por Clontech, EE. UU.) como molde y un conjunto de cebador de la SEQ ID NO: 4 y 5 SEQ ID NO: 5 que incluye los sitios de restricción PstI/EcoR V. La PCR se realizó de acuerdo con los ciclos de desnaturalización a una temperatura de 94 °C durante 5 minutos, desnaturalización a una temperatura de 94 °C durante 30 segundos, hibridación a una temperatura de 55 °C durante 30 segundos y polimerización a una temperatura de 72 °C durante 1 minuto, en la que los ciclos se realizan 30 veces. Posteriormente la polimerización se realizó nuevamente en las cepas a una temperatura de 72 °C durante 7 minutos, obteniéndose así la SEQ ID NO: 6 que incluye el ORF del gen GFP.

Se trató Po2 con enzimas de restricción PstI y EcoR V y el ORF del gen GFP se trató con las enzimas de restricción Kpn I y EcoR V en los sitios PstI y Kpn I de un vector lanzadera pECCG117 (véase *Biotechnology Letters* vol 20 13, No. 10, p. 721-726 (1991)) que se puede expresar en *E. coli* y corinebacterias. A continuación, el Po2 y el ORF del gen GFP tratados se unieron operativamente entre sí mediante la utilización de una enzima de conjugación de ADN para fabricar de esta manera un vector recombinante en el cual Po2 y el gen GFP están unidos entre sí. Aquí, el vector recombinante se denominó pECCG117-Po2-gfp.

(1.1.2) Preparación de una cepa transformada utilizando el vector

Se transformó *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 con cada uno de un vector pECCG117 y el vector recombinante pECCG117-Po2-gfp mediante un método de pulso eléctrico y después las cepas transformadas se obtuvieron a partir de un medio selectivo que contiene 25 mg/l de kanamicina. Las cepas obtenidas se transformaron con el vector pECCG117 y el vector recombinante pECCG117-Po2-gfp, denominándose a cada uno ATCC13032/pECCG117 y ATCC13032/ECCG117-Po2-gfp.

Además, *E. coli* DH5 α se transformó con el vector recombinante pECCG117-Po2-gfp mediante un método de choque térmico y después las cepas transformadas se obtuvieron partir de medio de agar Luria-Bertani (LB) que contiene 25 mg/l de kanamicina. Las cepas obtenidas se denominaron DH5 α /pECCG117-Po2-gfp y se les asignó una designación de depósito "CA01-2290". CA01-2290 fue depositada en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) el 23 de octubre de 2014 con el número de registro KCCM11591P, de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes.

(1.2) Preparación de un vector pECCG117-Po2-argJ y una cepa transformada utilizando el mismo**(1.2.1) Preparación de un vector**

Para la síntesis de un vector en el cual se expresa por el Po2 un gen biosintético principal, por ejemplo un gen argJ (Ncgl1341, SEQ ID NO: 7) que codifica la ornitina acetiltransferasa/N-acetilglutamato sintasa bifuncional, para aumentar la producción de arginina, se utilizó el vector recombinante pECCG117-Po2-gfp para preparar un vector pECCG117-Po2-argJ.

De manera más detallada, se realizó la PCR en una cepa utilizando los cromosomas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 como molde y un conjunto de cebador de la SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, para obtener de esta manera fragmentos de ADN que incluyen los genes argJ. La PCR se realizó de acuerdo con los ciclos de desnaturalización a una temperatura de 94 °C durante 1 minuto, hibridación a una temperatura de 58 °C durante 30 segundos y polimerización a una temperatura de 72 °C durante 2 minutos utilizando una polimerasa Pfu, en la que los ciclos se realizaron 30 veces. A continuación, se amplificó un fragmento que tenía una longitud de aproximadamente 1.201 pb y que incluía los sitios de las enzimas de restricción EcoRV y 3' PstI en un extremo 5'. Los fragmentos amplificados generados por la PCR se purificaron y se mezclaron con el vector pECCG117-Po2-gfp tratado con las enzimas de restricción EcoRV y PstI y después se unieron utilizando el In-fusion Cloning Kit para preparar de esta manera un vector recombinante, que se denominó pECCG117 -Po2-argJ.

(1.2.2) Preparación de una cepa transformada utilizando el vector

Corynebacterium glutamicum KCCM10741P, que es una cepa productora de arginina, se transformó con el vector pECCG117-Po2-argJ recombinante mediante un método de pulso eléctrico (véase el documento KR 10-0791659) y después las cepas transformadas se obtuvieron a partir de un medio selectivo que contiene 25 mg/l de kanamicina. La cepa obtenida se denominó KCCM10741P/pECCG117-Po2-argJ.

(1.3) Preparación de un vector pECCG117-Po2-ilvE y una cepa transformada utilizando el mismo**(1.3.1) Preparación de un vector**

Para la síntesis de un vector en el cual se expresa por el Po2 un gen biosintético principal, por ejemplo, un gen ilvE (Ncgl2123, SEQ ID NO: 10) que codifica una aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada, para el aumento de la producción de valina, se utilizó el vector recombinante pECCG117-Po2-gfp para preparar un vector pECCG117-Po2-ilvE.

De manera más detallada, la PCR se realizó en una cepa utilizando los cromosomas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 como molde y un conjunto de cebador de la SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para obtener de esta manera fragmentos de ADN que incluyen los genes ilvE. La PCR se realizó de acuerdo con ciclos de desnaturalización a una temperatura de 94 °C durante 1 minuto, hibridación a una temperatura de 58 °C durante 30 segundos y polimerización a una temperatura de 72 °C durante 2 minutos utilizando una Pfu polimerasa, en la que los ciclos se realizaron 30 veces. A continuación, se amplificó un fragmento que tenía una longitud de aproximadamente 1.201 pb y que incluía los sitios de las enzimas de restricción EcoRV y 3' PstI en un extremo 5'. Los fragmentos amplificados generados por la PCR se purificaron, se mezclaron con el vector pECCG117-Po2-gfp tratado con las enzimas de restricción EcoRV y PstI y después se unieron utilizando el In-fusion Cloning Kit, para preparar de esta manera un vector recombinante el cual se denominó pECCG117-Po2-ilvE.

(1.3.2) Preparación de una cepa transformada utilizando el vector

Corynebacterium glutamicum KCCM111201P, que es una cepa productora de valina, se transformó con el vector

recombinante pECCG117-Po2-ilvE por un método de pulso eléctrico (véase el documento KR 10-1117022) y después las cepas transformadas se obtuvieron a partir de un medio selectivo que contenía 25 mg/l de kanamicina. Las cepas obtenidas se denominaron KCCM11201P/pECCG117-Po2-ilvE.

5 **Ejemplo comparativo 1: Preparación de un vector recombinante que incluye un promotor de control y una cepa transformada utilizando el vector**

10 Para medir la actividad de Po2 para inducir la expresión de un gen objetivo, se utilizó el gen GFP para unir operativamente un promotor potente conocido (por ejemplo, Ptrc, Pcj1, Pcj4 o Pej7 (véase el documento KR 10-0620092)) o un promotor silvestre (por ejemplo aceEP (WT)) al ORF del gen GFP para preparar un vector recombinante. Después, cada una de las cepas de corinebacteria y *E. coli* se transformaron con el vector recombinante para preparar de esta manera cada una de las cepas transformadas de corinebacteria y *E. coli*.

15 Además, para evaluar las cepas transformadas que incluyen un gen biosintético principal utilizando el Po2 para aumentar la producción de un gen objetivo, se preparó una cepa transformada que incluye un gen biosintético principal para aumentar la producción de arginina o una cepa transformada que incluye un gen biosintético principal para aumentar la producción de valina.

20 **(1) Preparación de un vector de expresión de gfp que tiene un promotor diferente a partir de Po2 en términos de comparación de la actividad con el Po2 y una cepa transformada de *Corynebacterium glutamicum***

25 Las secuencias de bases de aceEP (WT) se obtuvieron del U.S. National Institute of Health (NIH Genbank), y la PCR de las mismas se realizó utilizando los cromosomas de *Corynebacterium glutamicum* tipo silvestre ATCC13032 natural como molde y un conjunto de cebador de la SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 que incluye los sitios de restricción Kpn I/EcoR V. La PCR se realizó de la misma manera que en el apartado (1.1) del Ejemplo 1 para preparar de esta manera un vector recombinante denominado pECCG117-aceEP(WT)-gfp.

30 Las cepas de *Corynebacterium glutamicum* se transformaron con cada uno del vector preparado pECCG117-aceEP(WT)-gfp y los vectores pECCG117-Pcj1-gfp, pECCG117-Pcj4-gfp, and pECCG117-Pcj7-gfp (véase el documento KR 10-0620092) de la misma manera que en el apartado (1.1) del Ejemplo 1 para preparar de esta manera cepas transformadas que se denominaron ATCC13032/pECCG117-aceEP(WT)-gfp, ATCC13032/pECCG117-Pcj1-gfp, ATCC13032/pECCG117-Pcj4-gfp, y ATCC13032/pECCG117-Pcj7-gfp.

35 **(2) Preparación de un vector de expresión de gfp que tiene un promotor diferente de Po2 en términos de comparación de actividad con el Po2 y una cepa transformada de *E. coli***

40 Las secuencias de bases de Ptrc se obtuvieron del U.S. National Institute of Health (NIH Genbank) y la PCR de las mismas se realizó utilizando pTrc99A (NCBI GenBank, M22744) como molde y un conjunto de cebador de la SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 que incluye los sitios de restricción Kpn I/EcoR. La PCR se realizó de la misma manera que en el apartado (1.1) del Ejemplo 1 para preparar de esta manera un vector recombinante denominado pECCG117-Ptrc-gfp.

45 Las cepas de *E. coli* se transformaron cada una con el vector preparado pECCG117-Ptrc-gfp y los vectores pECCG117-Pcj1-gfp y pECCG117-Pcj4-gfp, de la misma manera que en el apartado (1.1) del Ejemplo 1, para preparar de esta manera cepas transformadas que fueron denominadas, DH5α/pECCG117-Ptrc-gfp, DH5α/pECCG117-Pcj1-gfp y DH5α/pECCG117-Pcj4-gfp.

50 **(3) Preparación de una cepa transformada que tiene un promotor diferente a partir del Po2 en términos de comparación de la capacidad de producción del producto objetivo con el Po2**

(3.1) Preparación de una cepa transformada de *Corynebacterium glutamicum*, teniendo la cepa transformada capacidad de producción de arginina

55 Se utilizó el vector pECCG117-Pcj7-gfp para preparar un vector denominado pECCG117-Pcj7-argJ de la misma manera que en el apartado (1.2.1) del Ejemplo 1, excepto que la PCR se realizó utilizando un conjunto de cebadores de la SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 17.

60 Después se preparó la cepa transformada utilizando el vector pECCG117-Pcj7-argJ de la misma manera que en el apartado (1.2.2) del Ejemplo 1 y se denominó KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ.

(3.2) Preparación de una cepa transformada de *Corynebacterium glutamicum*, teniendo la cepa transformada capacidad de producción de valina

65 El vector pECCG117-Pcj7-gfp vector se utilizó para preparar un vector denominado pECCG117-Pej7-ilvE de la misma manera que en el apartado (1.3.1) del ejemplo 1, excepto que la PCR se realizó utilizando un conjunto de cebadores de la SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 18.

A continuación, se preparó una cepa transformada utilizando el vector pECCG117-Pcj7-*ilvE* de la misma manera que en el apartado (1.3.2) del Ejemplo 1 y se denominó KCCM11201P/pECCG117-Pcj7-*ilvE*.

5 Ejemplo 2; Confirmación de actividad de Po2 para inducir la expresión de un gen objetivo

(1) Confirmación de la actividad de Po2 para inducir la expresión de un gen objetivo en *Corynebacterium glutamicum*

10 Para medir la actividad de Po2 para inducir la expresión de un gen objetivo en las cepas transformadas de *Corynebacterium glutamicum*, la medición de la actividad de la proteína de fluorescencia verde (GFP) de la cepa transformada denominada ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp del apartado (1.1.2) del Ejemplo 1 se comparó con la medición de la actividad de GFP de las cepas transformadas, denominadas ATCC13032/pECCG117 del apartado (1.1.2) del Ejemplo 1 y ATCC13032/ pECCG117-*aceEP*(WT)-gfp, ATCC13032/pECCG117-Pcj1-gfp, 15 ATCC13032/pECCG117-Pcj4-gfp y ATCC13032/pECCG117-Pcj7-gfp del apartado (1) del Ejemplo comparativo 1.

Cada una de las cepas transformadas de *Corynebacterium glutamicum* anteriores se inoculó en un matraz acodado de 250 ml que contenía 25 ml de un medio de siembra en una relación en volumen de 1:20 y después, se cultivó con agitación (a una velocidad de aproximadamente 200 rpm) a una temperatura de 30 °C hasta que las cepas crecieron hasta una fase de metafase de cultivo (DO600 = 10,0). Después de completar el cultivo, las células se recogieron por centrifugación (a una velocidad de aproximadamente 5000 rpm durante aproximadamente 15 minutos). Las células recogidas se lavaron dos veces con una solución de tampón Tris.HCl 0,1 % (pH 8,0) y después se suspendieron en la misma solución tampón hasta obtener una turbidez a 610 nm de aproximadamente 160. Las células se fragmentaron durante 6 minutos mediante la utilización de un agitador de esferas, después las esferas de vidrio se añadieron a 1,25 g/1,5 ml de suspensión. Se recogió por centrifugación (a una velocidad de aproximadamente 15.000 rpm durante aproximadamente 20 minutos) un sobrenadante que contenía un extracto celular y después se midió cuantitativamente en términos de concentración de proteína en la misma, de acuerdo con el método de Bradford (véase Bradford, M.M 1976. Anal. Biochem. 72: 248-254). Después, la misma cantidad de extracto celular se irradió con luz a una longitud de onda de excitación de 488 nm utilizando el método de Laure Gory o similar y se midió la luz a una longitud de onda de emisión de 511 nm utilizando el espectrofotómetro LS-50B (Perkin-Elmer), para determinar de esta manera la expresión del gen GFP. Los resultados de la medición de la actividad de GFP en cada una de las cepas se muestran en al Tabla 1.

[Medio de siembra]

35 Veinte (20) g de glucosa, 5 g de sulfato de amonio, 5 g de extracto de levadura, 1,5 g de urea, 4 g de KH₂PO₄, 8 g de K₂HPO₄, 0,5 g de MgSO₄·7H₂O, 150 µg de biotina, 1,5 mg de clorhidrato de tiamina, 3 mg de ácido pantoténico de calcio, 3 mg de nicotinamida (en 1 l de agua destilada) y pH 7,2.

40 [Tabla 1]

Intensidad de fluorescencia en <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
Cepa	Intensidad de fluorescencia
ATCC13032/pECCG117	0,0
ATCC13032/ pECCG117-Po2-gfp	2339,5
ATCC13032/ pECCG117- <i>aceEP</i> (WT)-gfp	170,7
ATCC13032/ pECCG117-Pcj1-gfp	589,6
ATCC13032/ pECCG117-Pcj4-gfp	920,5
ATCC13032/ pECCG117-Pcj7-gfp	270,4

Como se muestra en los resultados de la Tabla 1, se confirmó que el Po2 tenía una actividad de promotor en *Corynebacterium glutamicum* y que la cepa denominada ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp presentaba una intensidad de fluorescencia que es por lo menos 13 veces la de la cepa ATCC13032/pECCG117-*aceEP*(WT)-gfp silvestre. Además, se confirmó que la cepa denominada ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp presentaba una intensidad de fluorescencia a un nivel que es mucho mayor que el de cada una de las cepas denominadas ATCC13032/pECCG117-Pcj1-gfp, ATCC13032/ pECCG117-Pcj4-gfp y ATCC13032/pECCG117-Pcj7-gfp utilizando promotores potentes conocidos (por ejemplo, Pcj1, Pcj4 y Pcj7). En consecuencia, se confirmó que el Po2 actuaba como un promotor potente para expresar un gen objetivo.

(2) Confirmación de la actividad de Po2 para inducir una expresión del gen objetivo en *E.coli*

Para medir la actividad de Po2 para inducir la expresión de un gen objetivo en las cepas transformadas de *E. coli*, la medición de la actividad de GFP de la cepa transformada denominada DH5α/pECCG117-Po2-gfp del apartado

(1.1.2) del Ejemplo 1 se comparó con la medición de la actividad de GFP de las cepas transformadas, denominadas DH5α/pECCG117-Ptrc-gfp, DH5α/pECCG117-Pcj1-gfp y DH5α/pECCG117-Pcj4-gfp del apartado (2) del Ejemplo comparativo 2.

5 Cada una de las cepas transformadas de *E. coli* anteriores se inoculó en un matraz acodado de 250 ml que contenía 25 ml de un medio LB que contenía kanamicina en una relación en volumen de 1:20 y después, se cultivó con agitación (a una velocidad de aproximadamente 200 rpm) a una temperatura hasta la cual las cepas crecieron hasta una fase de metafase de cultivo (DO600 = 3,0). Después de completar el cultivo, las células se recogieron por centrifugación (a una velocidad de aproximadamente 5000 rpm durante aproximadamente 15 minutos), se lavaron
10 dos veces con una solución de tampón Tris.HCl 0,1 % (pH 8,0) y después se suspendieron en la misma solución tampón, se fragmentaron por sonicación, y después se sometieron a centrifugación (a una velocidad de aproximadamente 15.000 rpm durante aproximadamente 20 minutos) para obtener un sobrenadante que contenía un extracto celular. El sobrenadante se midió cuantitativamente en términos de concentración de proteína en la misma, de acuerdo con el método de Bradford. Después, la misma cantidad de extracto celular se iradió con luz a una longitud de onda de excitación de 488 nm utilizando el método de Laure Gory o similar y se midió la luz a una longitud de onda de emisión de 511 nm utilizando el espectrofotómetro LS-50B (Perkin-Elmer), para determinar de esta manera la expresión del gen GFP. Los resultados de la medición de la actividad de GFP en cada una de las cepas se muestran en al Tabla 2.

20 [Tabla 2]

Intensidad de fluorescencia en <i>E. coli</i>	
Cepa	Intensidad de fluorescencia
DH5α/pECCG117-Ptrc-gfp	287,0
DH5α/pECCG117-Po2-gfp	248,9
DH5α/pECCG117-Pcj1-gfp	3041,9
DH5α/pECCG117-Pcj4-gfp	135,1

Como se muestra en los resultados de la Tabla 2, se confirmó que Po2 tenía una actividad de promotor en *E.coli* y que la cepa denominada DH5α/pECCG117-Po2-gfp presentaba la intensidad de fluorescencia a un nivel similar al de la cepa denominada DH5α/pECCG117-Ptrc-gfp, que es un promotor potente conocido y mayor que la de la cepa DH5α/pECCG117-Pcj4-gfp. Por consiguiente, se confirmó que Po2 actuaba como un promotor potente para expresar un gen objetivo en *E. coli*.

30 **Ejemplo 3: Evaluación de las cepas en cuanto al aumento de la capacidad de producción de un producto objetivo**

(1) Evaluación de las cepas en cuanto al aumento de producción de arginina

Para evaluar los factores que influyen en la producción de arginina, cuando el gen biosintético principal de la arginina, es decir, el gen argJ se expresaba usando el Po2, la cepa denominada KCCM10741P/pECCG1 17-Po2-argJ del apartado (1.2.2) del ejemplo 1, la cual se utilizó como la cepa para aumentar la producción del gen argJ, se comparó con la cepa no transformada denominada KCCM10741P (que no tiene capacidad de producción de arginina transformada) y la cepa denominada KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ del apartado (3.1) del Ejemplo comparativo 1 en términos de capacidad de producción de arginina.

40 Se inoculó un asa de cada una de las cepas transformadas anteriores en un matraz acodado de 250 ml que contenía 25 ml de un medio de producción y después se cultivó en agitación a una velocidad de aproximadamente 200 rpm a una temperatura de 30 °C durante 48 horas. Después de completar el cultivo, la producción de L-arginina se midió por HPLC. Los resultados de medición de la producción de L-arginina se muestran en la Tabla 3.

45 **[Medio de producción]**

Glucosa 6 %, sulfato de amonio 3 %, fosfato monopotásico 0,1 %, sulfato de magnesio heptahidratado 0,2 %, 5 licor de maíz fermentado (CSL) 1,5 %, NaCl 1 %, extracto de levadura 0,5 %, 100 µg/l de biotina y pH 7,2.

50 Tabla 3

Producción de arginina en KCCM10741P		
Cepa	DO	Concentración de arginina (g/l)
KCCM110741P	89	3,1
KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ	85	4,6
KCCM10741P/pECCG1 17-Po2-argJ	82	5,7

5 Como se muestra en los resultados de la Tabla 3, se confirmó que el Po2 aumentaba la producción de arginina en *Corynebacterium glutamicum* en el cual había aumentado la expresión del gen argJ. En particular, la producción de arginina en *Corynebacterium glutamicum* aumentó en aproximadamente 84 % en comparación con la cepa control, y aumentó aproximadamente 23 % en comparación con la cepa denominada KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ. En consecuencia, se confirmó que el Po2 influía en el aumento de la expresión del gen argJ.

(2) Evaluación de las cepas en cuanto al aumento de la producción de L-valina

10 Para evaluar los factores que influyen en la producción de valina, cuando el gen biosintético principal de la valina, es decir, el gen ilvE se expresaba mediante utilizando el Po2, la cepa denominada KCCM11201P/pECCG117-Po2-ilvE del apartado (1.3.2) del Ejemplo 1, la cual se utilizaba como la cepa para aumentar la producción del gen ilvE se comparó con la cepa no transformada denominada KCCM11201P (que no tiene capacidad de producción de L-valina transformada) y la cepa denominada KCCM11201P/pECCG117-Pcj7-ilvE del apartado (3.2) del Ejemplo comparativo 1 en términos de capacidad de producción de L-valina.

15 Se inoculó un asa de cada una de las cepas transformadas anteriores en un matraz acodado de 250 ml que contenía 25 ml de un medio de producción y después se cultivó en agitación a una velocidad de aproximadamente 200 rpm a una temperatura de 30 °C durante 72 horas. Después de completar el cultivo, la producción de L-valina se midió por HPLC. Los resultados de medición de la producción de L-arginina se muestran en la Tabla 4.

[Medio de producción]

25 Glucosa 5 %, sulfato de amonio 2 %, fosfato monopotásico 0,1 %, sulfato de magnesio heptahidratado 0,05 %, CSL 2,0 %, 200 µg/l de biotina y pH 7,2

[Tabla 4]

Producción de valina en KCCM11201P	
Cepa	Concentración de valina (g/l)
KCCM11201P	2,8
KCCM11201P/pECCG117-Pcj7-ilvE	3,3
KCCM11201P/pECCG117-Po2-ilvE	3,7

30 Como se muestra en los resultados de la Tabla 4, se confirmó que Po2 aumentaba la producción de valina en *Corynebacterium glutamicum* en la cual aumentaba la expresión del gen ilvE. En particular, la producción de valina en la cepa denominada KCCM11201P/pECCG117-Po2-ilvE había aumentado de manera significativa en aproximadamente 32 % en comparación con la de la cepa control y había aumentado aproximadamente 17 % en comparación con la de la cepa denominada KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-ilvE. Por consiguiente, se confirmó que Po2 influía en el aumento de expresión del gen ilvE.

[Número de registro]

40 Institución de registro: Korean Culture Center of Microorganisms (internacional)
Número de registro: KCCM11591P
Fecha de registro: 23 de octubre de 2014

45 De acuerdo con una o más de las realizaciones anteriores, el promotor reivindicado puede tener diversas actividades de acuerdo con el microorganismo utilizado para inducir la expresión de un gen objetivo. A este respecto, el promotor se puede utilizar en un caso en donde la actividad del gen objetivo tiene que ser controlada durante la producción del producto objetivo, lo que da como resultado una producción eficiente del producto objetivo.

50 Aunque se han descrito varias realizaciones, los expertos con conocimientos comunes en la materia entenderán que se pueden realizar diversos cambios en la forma y detalles de la presente memoria sin apartarse del alcance de las siguientes reivindicaciones.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

5

Para CJ CheilJedang Corporation
CJ CHEILJEDANG CENTER
330, DONGHO-RO
JUNG-GU, SEOUL 100-400,
REPUBLIC OF KOREA

RECEPCIÓN EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL emitido según la Regla 7.1 de la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la parte inferior de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO		
Referencia identificativa dada por el DEPOSITANTE: <i>Escherichia coli</i> CA01 - 2290	Número de registro dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: KCCM11591P	
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXOMÓMICA PROPUESTA		
El microorganismo identificado en I anteriormente se acompañó por: <input type="checkbox"/> una descripción científica <input type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marcar con una cruz lo aplicable)		
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN		
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anteriormente, que recibió el 23 de octubre de 2014 (fecha del depósito original) ¹		
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL		
Nombre:	Korean Culture Center of Microorganisms	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s): Fecha: 23 de octubre de 2014
Dirección:	CJ CheilJedang Corporation CJ CHEILJEDANG CENTER 330, DONGHO-RO JUNG-GU, SEOUL 100-400, REPUBLIC OF KOREA	

¹ Cuando se aplica la regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquirió el estado de autoridad depositaria internacional; cuando un depósito hecho fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito según el Tratado de Budapest, dicha fecha es la fecha en la que el microorganismo se recibió en la autoridad depositaria internacional.

10

Formulario BP/4

Página única

LISTADO DE SECUENCIAS

15

<110> CJ corporation

<120> Nuevo promotor y usos del mismo

20

<130> PX051110

<150> KR 2015-0014587

<151> 29-01-2015

25

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

30

<210> 1

<211> 86

<212> ADN

ES 2 743 753 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de ADN del promotor o2
 5
 <400> 1
caataatcgt gaattttggc agcaacagaa ttatgtggta taatggaaac gtgcaaaagc 60
atagattatt ggaggagatc aaaaca 86
 10
 <210> 2
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> cebador directo para PCR del promotor o2
 <400> 2
 ggtaccaat aatcgtgaat ttggc 26
 20
 <210> 3
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> cebador inverso para PCR del promotor o2
 <400> 3
 gatatctgt ttgatcct ccaata 26
 30
 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> cebador directo para PCR de pGFPuv
 <400> 4
 gatatcatga gtaaaggaga aga 23
 40
 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> cebador inverso para PCR de pGFPuv
 50
 <400> 5
 ctgcagttat ttgtagagct cat 23
 55
 <210> 6
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Secuencia de ADN de GFP
 <400> 6

ES 2 743 753 T3

gatatcatga gtaaaggaga agaacttttc actggagttg toccaattct tgttgaatta 60
gatggtgatg ttaatgggca caaatTTTTct gtcagtggag agggTgaagg tgatgcaaca 120
tacggaaaac ttaccotTaa atttatTTTgc actactggaa aactacctgt tccatggcca 180
acactTgtca ctactTTctc ttatggTgtt caatgctTTT cccgttatcc ggatcatatg 240
aaacggcatg actTTTTcaa gagTgccatg cccgaaggTt atgtacagga acgcactata 300
tctttcaaag atgacgggaa ctacaagacg cgtgctgaag tcaagTTTga aggtgatacc 360
cttgTtaatc gtatcgagTt aaaaggTatt gattTTTaaag aagatggaaa cattctcgga 420
cacaactcg agtacaacta taactcacac aatgtataca tcacggcaga caaacaaaag 480
aatggaatca aagctaactt caaaattcgc cacaacattg aagatggatc cgttcaacta 540
gcagaccatt atcaacaaaa tactccaatt ggcgatggcc ctgtcctTTT accagacaac 600
cattacctgt cgacacaatc tgccctTTTog aaagatccca acgaaaagcg tgaccacatg 660
gtccttcttg agTTTgTaaC tgotgctggg attacacatg gcatggatga gctctacaaa 720
taactgcag 729

<210> 7
<211> 1167
<212> ADN
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 7

atggcagaaa aaggcattac cgcgccgaaa ggcttctgtt gttctgcaac gaccgcggt 60
attaaagctt ctggcaatcc tgacatggcg ttggtggtta accagggTcc agagTTTTcc 120
gcagcggccg tgtttacacg taacogagTt ttgcgagcgc ctgtgaaggT gagccgagag 180
aacgTtgctg atggccagat cagggctgTt ttgtacaacg ctggTaatgc taatgcgtgt 240

5

10

ES 2 743 753 T3

aatggtctgc aggggtgagaa ggatgctcgt gagtctgttt ctcatctagc tcaaaatttg 300
 ggcttgagg attccgatat tgggtgtgtt tccactggtc ttattggtga gttgcttccg 360
 atggataagc tcaatgcagg tattgatcag ctgaccgctg agggcgcttt gggtgacaat 420
 ggtgcagctg ctgccaaaggc gatcatgacc actgacacgg tggataagga aaccgtcgtg 480
 tttgctgatg gttggactgt cggcggaaatg ggcaaggcg tgggcatgat ggcgcctct 540
 cttgccacca tgctggtctg cttgaccaact gatgcatccg ttactcagga aatggctcag 600
 atcgcgctgg ctaatgctac ggccgttacg tttgacacc tggatattga tggatcaacc 660
 tccaccaatg acaccgtgtt cctgctggca tctggcgcta gcggaatcac cccaactcag 720
 gatgaactca acgatgcggt gtacgcagct tgttctgata tcgcagcga gcttcaggct 780
 gatgcagagg gtgtgacc aa gcgcgttgct gtgacagtgg tgggaaccac caacaacgag 840
 caggcgatta atgcggctcg cactgttgct cgtgacaatt tgttcaagtg cgcaatggtt 900
 ggatctgac caaactgggg tcgctgtgtg gctgcagctg gcatggctga tgctgatatg 960
 gaaccagaga agatctctgt gttcttcaat ggtcaagcag tatgccttga ttccactggc 1020
 gctcctggtg ctcgtgaggt ggatctttcc ggcgctgaca ttgatgtccg aattgatttg 1080
 ggcaccagtg gggaaaggcca ggcaacagtt cgaaccactg acctgagctt ctctacgtg 1140
 gagatcaact ccgctacag ctcttaa 1167

5 <210> 8
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador directo para PCR de argJ

<400>8
 gagatcaaaa cagatatcat ggcaaaaaa ggcattac 38

15 <210> 9
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador inverso para PCR de argJ

<400> 9
 atccccggg ctgcagtaa gagctgtacg cggagt 36

25 <210> 10
 <211> 1104
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

30 <400> 10

ES 2 743 753 T3

atgacgtcat tagagttcac agtaaccogt accgaaaatc cgacgtcacc cgatcgtctg 60
aaggaaattc ttgccgcacc gaagttoggt aagtacttca ccgaccacat ggtgaccatt 120
gactggaacg agtcggaagg ctggcacaac gcccaattag tgccatacgc gccgattcct 180
atggatcctg ccaccaccgt attccaactac ggacaggcaa tttttgaggg aattaaggcc 240
taccgccatt cggacgaaac catcaagact ttccgtcctg atgaaaacgc cgagcgtatg 300
cagcgttcag cagctcgaat ggcaatgcc aagttgccaa ccgaggactt tattaagca 360
cttgaactgc tggtagacgc ggatcaggat tgggttcctg agtacggcgg ggaagcttcc 420
ctctacctgc gccattcat gatctccacc gaaattggct tgggtgtcag cccagctgat 480
gcctacaagt tcttggtcat cgcattccca gtccggcgtt acttcaccgg tggaatcaag 540
cctgtttccg tctggctgag cgaagattac gtccgcgctg caccgcgagg aactggtgac 600
gccaaatttg ctggcaacta cgcggcttct ttgcttgccc agtcccaggc tgcggaaaag 660
ggctgtgacc aggtcgtatg gttggatgcc atcgagcaca agtacatcga agaaatgggt 720
ggcatgaacc ttgggttcat ctaccgcaac ggcgaccacg tcaagctagt caccctgaa 780
ctttccggct cactacttcc aggcattact cgcaagtcac ttctacaagt agcacgcgac 840
ttgggctacg aagtagaaga gcgaaagatc accaccaccg agtgggaaga agacgcaaag 900
tctggcgcca tgaccgagge atttgcttgc ggtactgcag ctgttatcac ccctgttggc 960
accgtgaaat cagctcacgg caccttcgaa gtgaacaaca atgaagtcgg agaaatcacg 1020
atgaagcttc gtgaaaccct caccggaatt cagcaaggaa acggtgaaga ccaaacgga 1080
tggtttacc cactggttgg ctaa 1104

5 <210> 11
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador directo para PCR de ilvE

<400> 11
gagatcaaaa cagatatcat gacgtcatta gagttc 36

15 <210> 12
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador inverso para PCR de ilvE

<400> 12
atccccggg ctgcagttag ccaaccagtg ggta 34

25 <210> 13
<211> 26
<212> ADN

ES 2 743 753 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> cebador directo para PCR de aceP(WT)
 <400> 13
 ggtaccgtca ttacccccgc ctaacc 26
 10 <210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador inverso para PCR de aceP(WT)
 <400> 14
 20 gatatcaaaa gtcacttct taagt 26
 <210> 15
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador directo para PCR de trcP
 <400> 15
 30 ggtaccctgc acggtgcacc aatgct 26
 <210> 16
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para PCR de trcP
 40 <400> 16
 gatatcctgt ttcctgtgtg aaattg 26
 <210> 17
 <211> 41
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo para PCR de argJ
 50 <400> 17
 cgaaaggaaa cactcgatat catggccaaa aaaggcatta c 41
 <210> 18
 <211> 39
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> cebador directo para PCR de ilvE
 <400> 18
 cgaaaggaaa cactcgatat catgacgtca ttagagttc 39
 65

REIVINDICACIONES

1. Un promotor que comprende una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Una secuencia reguladora de la expresión, que comprende el promotor de la reivindicación 1.
3. Un vector que comprende la secuencia reguladora de la expresión de la reivindicación 2 y un gen objetivo que está unido operativamente a la secuencia reguladora de la expresión.
- 10 4. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 3.
5. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la célula hospedadora es una célula bacteriana que pertenece al género *Corynebacterium* o al género *Escherichia*.
- 15 6. Un método para producir un producto objetivo, comprendiendo el método:
cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 4 o la reivindicación 5; y
recuperar el producto objetivo de la célula hospedadora o un medio de cultivo que incluye a la célula
hospedadora cultivada.
- 20 7. El método de la reivindicación 6, en el que el producto objetivo es un aminoácido.