



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 379**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12P 13/04** (2006.01)

**C12P 13/10** (2006.01)

**C12P 13/14** (2006.01)

**C12P 13/22** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05765117 .6**

96 Fecha de presentación : **24.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1783203**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Proceso para producir sustancias.**

30 Prioridad: **25.06.2004 JP 2004-189012**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.04.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.04.2010**

73 Titular/es: **KYOWA HAKKO BIO Co., Ltd.**  
**1-6-1, Ohtemachi**  
**Chiyoda-ku, Tokyo, 100-8185, JP**

72 Inventor/es: **Hashimoto, Shin-Ichi y**  
**Tabata, Kazuhiko**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 337 379 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

Proceso para producir sustancias.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que tiene la capacidad de formar y acumular L-glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina y un proceso para producir L-glutamina o la sustancia usando el microorganismo.

10 **Antecedentes de la técnica**

En los microorganismos que pertenecen al género *Escherichia* y similares, la L-glutamina sirve no sólo como un sustrato para la síntesis de proteínas, sino también como un sustrato que suministra nitrógeno en la biosíntesis de los ácidos nucleicos purina y piridimina y de aminoácidos tales como L-arginina, L-histidina, L-triptofano y L-asparagina.

Por otra parte, la biosíntesis de L-glutamina está catalizada por la glutamina sintetasasa (GS) codificada por el gen *glnA* y se conoce que la actividad de GS está sometida a una regulación muy estricta y complicada. Es decir, la GS está controlada negativamente por la adenililación. Tales adenililación y desadenililación están catalizadas por la glutamina-sintetasasa adenililtransferasa (denominada en lo sucesivo en este documento proteína GlnE) codificada por el gen *glnE* y la dirección de la catálisis está determinada por la proteína reguladora PII para la glutamina sintetasasa (denominada en lo sucesivo en este documento proteína GlnB) codificada por el gen *glnB*. Cuando la proteína GlnB se uridilila, la misma promueve la desadenililación de GS mediante la proteína GlnE y, por el contrario, cuando la proteína GlnB no está uridililada, la misma promueve la adenililación de GS por la proteína GlnE. La uridililación y desuridililación de la proteína GlnB están determinadas por una proteína codificada por el gen *glnD*. Como la L-glutamina promueve la desuridililación, GS se adenilila para provocar una reducción de la actividad de GS, conduciendo a la regulación suprimiendo la síntesis de L-glutamina. Por otra parte, el ácido 2-oxoglutarico promueve la uridililación de la proteína GlnB, por lo que la síntesis de L-glutamina se promueve de acuerdo con el esquema opuesto al anterior (publicaciones no de patente N° 1 y 2).

Se han realizado intentos para producir L-glutamina por fermentación mediante la desregulación del mecanismo complicado descrito anteriormente. En la publicación de patente N° 1, se describe que se ha obtenido *Escherichia coli* que forma y acumula L-glutamina modificando GS de forma que su sitio de adenililación no estará adenililado y mediante potenciación de la expresión del gen *glnA*, pero la producción de L-glutamina por el microorganismo es sólo de 1,3 g/l.

Además, se conocen los siguientes microorganismos: cepas productoras de glutamina tales como *Corynebacterium glutamicum* que tiene una supresión del gen *glnE* (publicación de patente N° 2) y *Corynebacterium glutamicum* en el que el gen *glnA* está modificado y la expresión del gen *gdh* está potenciada (publicación de patente N° 2); cepas productoras de L-arginina tales como *Escherichia coli* en la que se ha introducido el gen *argA* (publicación de patente N° 3); cepas productoras de L-triptofano tales como *Escherichia coli* en la que el operón de triptofano, el gen *aroG* y el gen *serA* se han introducido (publicación de patente N° 4); cepas productoras de L-histidina tales como *Escherichia coli* con resistencia a aminoquinolina conferida (publicación de patente N° 5); y cepas productoras de ácido nucleico tales como *Escherichia coli* productora de ácido 5'-inosínico en la que los genes *purA*, *deoD*, *purR*, *add*, *gsk*, *edd*, *xapA*, *ushA* y *aph* están suprimidos y la expresión de gen *purF* desensibilizado está potenciada (publicación de patente N° 6) y *Escherichia coli* productora de ácido 5'-guanílico en la que los genes *purA*, *dedo*, *puR*, *add*, *gsk*, *edd*, *xapA*, *ushA* y *aph* se suprimen y la expresión del gen *purF* desensibilizado y el gen *guaAB* está potenciada (publicación de patente N° 6). Sin embargo, no ha habido informes sobre un microorganismo que pertenezca al género *Escherichia* en el que las actividades de la proteína GlnE y la proteína GlnB estén reducidas o se hayan perdido y que tengan la capacidad de formar y acumular L-glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina y un proceso para producir L-glutamina o la sustancia que usa el microorganismo.

Publicación no de patente N°: 1

55 *E. coli* y *Salmonella*, Segunda Edición (1996)

Publicación no de patente N°: 2

FEMS Microb. Lett., 201, 91-98 (2001)

60 Publicación de patente N°: 1

Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 164297/03

65 Publicación de patente N°: 2

Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 300887/02

Publicación de patente N°:3

Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 5693/82

5 Publicación de patente N° 4:

Patente de los Estados Unidos N° 5.939.295

10 Publicación de patente N°: 5

Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 86998/01

Publicación de patente N°: 6

15 Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 355087/02

### Descripción de la invención

#### Problemas a resolver por la invención

20

Un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que tenga la capacidad de formar y acumular L-glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina y un proceso para producir L-glutamina o la sustancia usando al microorganismo.

#### 25 Medios para resolver los problemas

La presente invención se refiere a los siguientes (1) a (11).

30

(1) Un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* en el que las actividades de la glutamina-sintetasa adenililtransferasa (denominada en lo sucesivo en este documento proteína GlnE) y la proteína reguladora PII para glutamina sintetasa (denominada en lo sucesivo en este documento proteína GlnB) se reducen mediante mutación y que tiene la capacidad de formar y acumular L-glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina y en el que las actividades de la glutamina sintetasa adenililtransferasa y la proteína reguladora PII para glutamina sintetasa están reducidas en comparación con cepas antes de la mutación.

35

(2) Un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* en el que las actividades de la proteína GlnE y la proteína GlnB se han perdido por mutación.

40

(3) El microorganismo de acuerdo con los puntos anteriores (1) o (2), donde el microorganismo que pertenece al género *Escherichia* es un microorganismo en el que un nucleótido se ha suprimido, sustituido o añadido en la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la proteína GlnE de tipo silvestre (denominado en lo sucesivo en este documento gen *GlnE*) y en la del gen que codifica la proteína GlnB de tipo silvestre (denominado en lo sucesivo en este documento gen *glnB*).

45

(4) El microorganismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores (1) a (3), donde el microorganismo que pertenece al género *Escherichia* es *Escherichia coli*.

50

(5) El microorganismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores (1) a (4), en el que la sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina es un aminoácido o un ácido nucleico.

(6) El microorganismo de acuerdo con el punto anterior (5), en el que el aminoácido es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en L-arginina, L-triptofano, L-histidina y ácido L-glutámico.

55

(7) El microorganismo de acuerdo con el punto anterior (5), en el que el ácido nucleico es un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en adenosina, inosina, guanosina, xantosina, citidina, uridina, timidina, ácido 5'-adenílico, ácido 5'-inosínico, ácido 5'-guanílico, ácido 5'-citidílico, ácido 5'-xantílico, ácido 5'-uridílico y ácido 5'-timidílico.

60

(8) Un proceso para producir L-glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina, que comprende: cultivar el microorganismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores (1) a (4) en un medio; permitir que se forme y se acumule en el medio L-glutamina o la sustancia y recuperar la L-glutamina o la sustancia a partir del medio.

65

(9) El proceso de acuerdo con el punto anterior (8), en el que la sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina es un aminoácido o un ácido nucleico.

(10) El proceso de acuerdo con el punto anterior (9), en el que el aminoácido es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en L-arginina, L-triptofano, L-histidina y ácido L-glutámico.

(11) El proceso de acuerdo con el punto anterior (9), en el que el ácido nucleico es un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en adenosina, inosina, guanosina, xantosina, citidina, uridina, timidina, ácido 5'-adenílico, ácido 5'-inosínico, ácido 5'-guanílico, ácido 5'-citidílico, ácido 5'-xantílico, ácido 5'-uridílico y ácido 5'-timidílico.

### Efecto de la invención

La presente invención proporciona un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que tiene la capacidad de formar y acumular L-glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina y un proceso para producir L-glutamina o la sustancia usando el microorganismo.

### Mejores modos para realizar la invención

#### 1. *Microorganismos que Pertenecen al Género Escherichia en los Que las Actividades de la Proteína GlnE y la Proteína GlnB Están Reducidas o se han Perdido y Preparación de los Mismos*

Los microorganismos que pertenecen al género *Escherichia* en los que las actividades de la proteína GlnE y la proteína GlnB están reducidas o se han perdido como se ha definido en este documento anteriormente se pueden obtener mediante los siguientes métodos: un método en el que las mutaciones por supresión de los genes *glnE* y *glnB* presentes en microorganismos existentes que pertenecen al género *Escherichia* se acumulan en un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* mediante transducción de P1 [J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)]; un método en el que se realiza tratamiento por mutación tal como radiación UV y después se seleccionan las cepas en las que las actividades de la proteína GlnE y la proteína GlnB están reducidas o se han perdido; un método en el que las supresiones, sustituciones o adiciones de nucleótidos se introducen en las secuencias de nucleótidos del gen *glnE* y el gen *glnB* en el ADN cromosómico de un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* y similares. En este documento, el gen *glnE* y el gen *glnB* respectivamente consisten en una secuencia de nucleótidos donde una secuencia de nucleótidos que contiene una región que regula la expresión génica tal como una secuencia promotora se añade a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GlnE o la proteína GlnB.

En la presente invención, los microorganismos que pertenecen al género *Escherichia* en los que las actividades de la proteína GlnE y la proteína GlnB están reducidas se refieren a microorganismos en los que las actividades de la proteína GlnE y la proteína GlnB están reducidas en comparación con cepas antes de la mutación (cepas parentales) mediante la introducción de la mutación anterior, específicamente, aquellas en los que las actividades de proteína están reducidas preferiblemente en el 80% o menos, preferiblemente el 50% o menos, más preferiblemente el 30% o menos, adicionalmente preferiblemente el 20%, particularmente preferiblemente el 10% o menos y lo más preferible es que sea el 5% o menos. Las actividades de la proteína GlnE y la proteína GlnB se pueden medir mediante métodos conocidos.

Los métodos para introducir una supresión, sustitución o adición de un nucleótido en un gen en el ADN cromosómico de un microorganismo incluyen métodos que utilizan recombinación homóloga. Un ejemplo de un método general que utiliza recombinación homóloga es un método que usa un plásmido para recombinación homóloga preparado ligando un gen mutante que tiene una supresión, sustitución o adición de nucleótido introducida en un ADN plasmídico sin capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se tiene que introducir la supresión del nucleótido o similar y que porta un gen de resistencia a fármaco. Un ejemplo de un método preferido que utiliza recombinación homóloga es un método en el que se introduce una supresión, una sustitución o una adición de un nucleótido utilizando el sistema de recombinación homóloga de fago lambda [Proc. Ntl. Acad. Sci. EE.UU., 97, 6641-6645 (2000)].

El plásmido para recombinación homóloga se introduce en una célula hospedadora mediante un método ordinario, seguido por selección de un transformante en el que el plásmido para la recombinación homóloga se ha integrado en el ADN cromosómico mediante recombinación homóloga usando la resistencia a fármaco como un marcador. El transformante obtenido se cultiva usando un medio que no contiene el fármaco durante varias horas a un día y después se propaga en un medio de agar que contiene el fármaco y en un medio de agar sin el fármaco. Mediante la selección de una cepa que no crece en el primer medio pero que puede crecer en el segundo medio, se puede obtener la cepa en la que ocurrió la segunda recombinación homóloga en el ADN cromosómico. La introducción de una supresión, sustitución o adición de nucleótido en un gen deseado en el ADN cromosómico se puede confirmar determinando la secuencia de nucleótidos de una región del ADN cromosómico que contiene el gen en el que se ha introducido la supresión o similar. Además, una supresión, sustitución o adición de nucleótido se puede introducir eficazmente en genes plurales utilizando recombinación homóloga de acuerdo con un método usando un ADN lineal.

Específicamente, un ADN lineal que contiene un gen en el que se tiene que introducir una supresión, sustitución o adición de nucleótido se incorpora en una célula para provocar recombinación homóloga entre el ADN cromosómico y el ADN lineal introducido. Este método es aplicable a microorganismos que pertenecen al género *Escherichia* que tienen la capacidad de incorporar un ADN lineal, preferiblemente aquellos que pertenecen a *Escherichia coli*, más

## ES 2 337 379 T3

preferiblemente *Escherichia coli* que expresa un grupo de proteínas recombinantes obtenidas del fago  $\lambda$  (sistema de recombinación Roja).

Un ejemplo de *Escherichia coli* que expresa un sistema de recombinación roja  $\lambda$  es *Escherichia coli* JM101 que porta pKD46, que es un ADN plasmídico que comprende un gen de sistema de recombinación Roja  $\lambda$  (disponible en *Escherichia coli* Genetic Stock Center, Universidad de Yale, EE.UU.).

Los ejemplos de los ADN útiles para recombinación homóloga son los siguientes:

- (a) ADN lineal en el que los ADN que tienen homología con los ADN presentes en el exterior de ambos extremos de una región de ADN cromosómico que se tiene que someter a introducción de una supresión, sustitución o adición de nucleótido están presentes en ambos extremos de un gen de resistencia a fármaco;
- (b) ADN lineal en el que los ADN que tienen homología con los ADN presentes en el exterior de ambos extremos de una región de ADN cromosómico que se tiene que someter a introducción de una supresión, sustitución o adición de nucleótido están ligados entre sí;
- (c) ADN lineal en el que los ADN que tienen homología con ADN presentes en el exterior de ambos extremos de una región de ADN cromosómico que se tiene que someter a introducción de una supresión, sustitución o adición de nucleótido están presentes en ambos extremos de ADN que consiste en un gen de resistencia a fármaco y un gen que se puede usar para selección negativa y
- (d) ADN lineal del punto anterior (a) en el que una secuencia de nucleótidos reconocida por recombinasa Flp obtenida de levadura [Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 82, 5875 (1985)] está presente adicionalmente entre el gen de resistencia a fármaco y los ADN que tienen homología con ADN presentes en el exterior de ambos extremos de la región de ADN cromosómico.

Como el gen de resistencia a fármaco, se puede usar cualquiera de diversos genes de resistencia a fármaco que impartan resistencia a un fármaco al que el microorganismo hospedador muestre sensibilidad. Cuando se usa *Escherichia coli* como el microorganismo hospedador, los ejemplos de los genes de resistencia a fármaco incluyen gen de resistencia a kanamicina, gen de resistencia a cloranfenicol, gen de resistencia a gentamicina, gen de resistencia a espectinomina, gen de resistencia a tetraciclina y gen de resistencia a ampicilina.

El “gen que se puede usar para selección negativa” se refiere a un gen que es mortal para un microorganismo hospedador en determinadas condiciones de cultivo cuando el gen se expresa en el microorganismo hospedador. Los ejemplos de los genes son el gen *sacB* obtenido a partir de un microorganismo que pertenece al género *Bacillus* [Appl. Environ. Microbiol., 59, 1361-1366 (1993)] y el gen *rpsL* obtenido a partir de un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* [Genomics, 72, 99-104 (2001)].

Los ADN que tienen homología con los ADN presentes en el exterior de ambos extremos de una región de ADN cromosómico que se tiene que someter a introducción de una sustitución o supresión, que existen en ambos extremos de los ADN lineales anteriores, se localizan en la misma dirección que los del ADN cromosómico, y su longitud es preferiblemente de aproximadamente 10 pb a 100 pb, más preferiblemente de aproximadamente 20 pb a 50 pb y adicionalmente preferiblemente de aproximadamente 30 pb a 40 pb.

La secuencia de nucleótidos reconocida por recombinasa Flp obtenida de levadura no está limitada específicamente siempre y cuando sea una secuencia de nucleótidos reconocida por dicha proteína y que cataliza recombinación homóloga. Los ejemplos preferidos son ADN que tienen la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 9 y ADN que tienen una secuencia de nucleótidos en la que de uno a varios nucleótidos se han suprimido, sustituido o añadido en dicho ADN y que tienen una secuencia de nucleótidos reconocida por recombinasa Flp obtenida de levadura y que cataliza recombinación homóloga.

El ADN anterior que tiene homología se refiere a ADN que tiene un grado tal de homología que permite la aparición de recombinación homóloga entre la región objeto de ADN cromosómico y el ADN lineal anterior, específicamente, homología del 80% o más, preferiblemente homología del 90% o más, más preferiblemente homología del 95% o más y adicionalmente preferiblemente homología del 100%.

La homología entre secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el algoritmo BLAST por Karlin y Altschul [Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90, 5873 (1993)] y FASTA [Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]. En base al algoritmo BLAST, se han desarrollado programas tales como BLASTN y BLASTX [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]. Cuando una secuencia de nucleótidos se analiza mediante BLASTN en base a BLAST, los parámetros, por ejemplo, son los siguientes: puntuación = 100 y longitud de palabra = 12. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros por defecto de cada programa. Las técnicas específicas para estos análisis se conocen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

El fragmento de ADN lineal anterior se puede preparar mediante PCR. El ADN lineal deseado también se puede obtener construyendo ADN que contiene el ADN lineal anterior en plásmido y después realizando tratamiento con enzimas de restricción.

## ES 2 337 379 T3

Más específicamente, los ejemplos de los métodos para introducir una supresión, sustitución o adición de nucleótido en el ADN cromosómico de un microorganismo utilizando recombinación homóloga incluyen los siguientes Métodos 1 a 4.

### 5 Método 1

Un método que comprende introducir el ADN lineal de los puntos anteriores (a) o (d) en un microorganismo hospedador y seleccionar un transformante que porta el ADN lineal insertado en su ADN cromosómico mediante recombinación homóloga usando la resistencia a fármaco como un marcador.

### Método 2

15 Un método que comprende introducir el ADN lineal del punto anterior (b) en el transformante obtenido de acuerdo con el Método anterior 1 y eliminar el gen de resistencia a fármaco insertado en su ADN cromosómico mediante el Método 1 para sustituir o suprimir una región del ADN cromosómico del microorganismo.

### 20 Método 3

Un método que comprende:

- 25 [1] introducir el ADN lineal del punto anterior (c) en un microorganismo hospedador y seleccionar un transformante que porta el ADN lineal insertado en su ADN cromosómico mediante recombinación homóloga usando la resistencia a fármaco como un marcador;
- 30 [2] sintetizar ADN ligando los ADN que tienen homología con los ADN presentes en el exterior de ambos extremos de una región de ADN cromosómico que se tiene que someter a la introducción de una sustitución o supresión en la misma dirección que la del ADN cromosómico e introducir el ADN sintetizado en el transformante obtenido en el punto anterior [1]; y
- 35 [3] cultivar el transformante sometido a la operación del punto anterior [2] en condiciones de forma que el gen que se puede usar para selección negativa se expresa y seleccionar una cepa capaz de crecer mediante el cultivo como una cepa en la que el gen de resistencia a fármaco y el gen que se puede usar para la selección negativa se eliminen del ADN cromosómico.

### 40 Método 4

Un método que comprende:

- 45 [1] introducir el ADN lineal del punto anterior (d) en un microorganismo hospedador y seleccionar un transformante que porta el ADN lineal insertado en su ADN cromosómico mediante recombinación homóloga usando la resistencia a fármaco como un marcador; y
- 50 [2] introducir un plásmido de expresión de gen de recombinasa Flp en el transformante obtenido en el punto anterior [1] y después de la expresión del gen, obtener una cepa sensible al fármaco usado en el punto anterior [1].

En los métodos anteriores, la introducción del ADN lineal en un microorganismo hospedador se puede realizar mediante cualquiera de los métodos para introducción de ADN en el microorganismo, por ejemplo, el método que usa ión calcio [Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 69, 2110 (1972)], el método de protoplasto (Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 248394/88) y electroporación [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)].

55 Mediante el uso de un ADN lineal en el que se inserta un gen arbitrario que se tiene que insertar en ADN cromosómico en la parte central del ADN lineal usado en el Método 2 o Método 3 [2], es posible eliminar el gen de resistencia a fármaco y similares y al mismo tiempo insertar un gen arbitrario al ADN cromosómico.

60 Los Métodos anteriores 2 a 4 son métodos que no dejan genes extraños tales como un gen de resistencia a fármaco y un gen que se puede usar para selección negativa en el ADN cromosómico del transformante que se obtendrá finalmente. Por lo tanto, es posible producir fácilmente un microorganismo que tenga supresiones, sustituciones o adiciones de nucleótidos en dos o más regiones diferentes del ADN cromosómico repitiendo las operaciones de estos métodos usando el mismo gen de resistencia a fármaco y el mismo gen que se puede usar para selección negativa.

65 Es posible confirmar fácilmente que un microorganismo en el que las actividades de la proteína GlnE y la proteína GlnB están reducidas o se han perdido obtenido mediante los métodos anteriores tiene la capacidad de formar y acumular L-glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina cultivando

## ES 2 337 379 T3

microorganismo en un medio y después analizando L-glutamina o la sustancia formada y acumulada en el medio mediante un método conocido tal como análisis de HPLC o bioensayo.

Un ejemplo de un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* en el que las actividades de la proteína GlnE y la proteína GlnB se han perdido por mutación y que forma y acumula L-glutamina obtenible por los métodos anteriores es *Escherichia coli* JGLBE1 en la que el gen *glnE* y el gen *GlnB* están suprimidos.

El microorganismo anterior que pertenece al género *Escherichia* en el que las actividades de la proteína GlnE y la proteína GlnB están reducidas o se han perdido como se ha definido en este documento anteriormente tiene la capacidad no sólo de formar y acumular L-glutamina sino también la capacidad de formar y acumular una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina.

Los ejemplos de las sustancias biosintetizadas utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina incluyen aminoácidos y ácidos nucleicos. Los ejemplos preferidos de los aminoácidos incluyen L-arginina, L-histidina, L-triptofano y ácido L-glutámico. Los ejemplos preferidos de los ácidos nucleicos incluyen adenosina, inosina, guanosina, xantósina, citidina, uridina, timidina, ácido 5'-adenílico, ácido 5'-inosínico, ácido 5'-guanílico, ácido 5'-citidílico, ácido 5'-xantílico, ácido 5'-uridílico y ácido 5'-timidílico.

Los microorganismos que pertenecen al género *Escherichia* en los que las actividades de la proteína GlnE y la proteína GlnB están reducidas o se han perdido como se ha definido en este documento anteriormente y que tienen la capacidad de formar y acumular una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina incluyen, además de *Escherichia coli* JGLBE1, microorganismos obtenidos tratando los microorganismos obtenidos mediante los métodos anteriores adicionalmente mediante los siguientes métodos, solos o en combinación:

- (a) un método en que al menos uno de los mecanismos que regula la biosíntesis de la sustancia se relaja o cancela;
- (b) un método en el que la expresión de al menos una de las enzimas implicadas en la biosíntesis de la sustancia está potenciada;
- (c) un método en el que el número de copias de al menos uno de los genes enzimáticos implicados en la biosíntesis de la sustancia está aumentado;
- (d) un método en el que al menos una de las rutas metabólicas que se ramifican a partir de la ruta biosintética de la sustancia en metabolitos diferentes a la sustancia está debilitada o bloqueada; y
- (e) un método en el que se selecciona una cepa celular que tiene una resistencia más elevada a un análogo de la sustancia en comparación con una cepa de tipo silvestre.

Cuando la sustancia es un aminoácido, los métodos de los puntos anteriores (a) a (b) se describen, por ejemplo, en la siguiente bibliografía: (a), Agric. Biol. Chem., 43, 105-111 (1979), J. Bacteriol., 110, 761-763 (1972), Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 318-323 (1993), etc.; (b), Agric. Biol. Chem., 43, 105-111 (1979), J. Bacteriol., 110, 761-763 (1972), etc.; (c), Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 318-323 (1993), Agric. Biol. Chem., 39, 371-377 (1987), etc.; (d), Appl. Environ. Microbiol., 38, 181-190 (1979), Agric. Biol. Chem., 42, 1773-1778 (1978), etc.; y (e) Agric. Biol. Chem., 36, 1675-1684 (1972), Agric. Biol. Chem., 41, 109-116 (1977), Agric. Biol. Chem., 37, 2013-2023 (1973), Agric. Biol. Chem., 51, 2089-2094 (1987), etc. Cuando la sustancia es un ácido nucleico, los métodos de los puntos anteriores (a) a (e) se describen específicamente en Biotechnology, segunda edición completamente revisada, ed. H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler y P. Stadler, vol. 6 "products of primary metabolism" ed. M. Roehr, VCH verslgsgesellschaft mbH, Weinheim (1996), Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 355087/02, etc.

Los microorganismos de la presente invención también incluyen microorganismos obtenidos sometiendo los microorganismos que pertenecen al género *Escherichia* que ya se conoce que tiene la capacidad de producir una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina al tratamiento para provocar la reducción o pérdida de las actividades de la proteína GlnE y de la proteína GlnB mediante mutación de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

Los ejemplos conocidos de los microorganismos que pertenecen al género *Escherichia* que tienen la capacidad de producir una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina incluyen *Escherichia coli* que produce L-arginina (Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 5693/82), *Escherichia coli* que produce L-triptofano (Patente de los Estados Unidos N° 5.939.295), *Escherichia coli* que produce L-histidina (Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 86998/01) *Escherichia coli* que produce ácido L-glutámico (Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 244970/93) *Escherichia coli* que produce ácido 5'-inosínico (Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 355087/02) y *Escherichia coli* que produce ácido 5'-guanílico (Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa N° 355087/02).

## 2. Proceso de Producción de la Presente Invención

Se puede producir L-Glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina cultivando en un medio un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que se puede preparar mediante los métodos descritos en el punto anterior 1, permitiendo que se formen y acumulen en el medio L-glutamina o la sustancia y recuperando L-glutamina o la sustancia a partir del medio.

Los ejemplos de las sustancias biosintetizadas utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina incluyen las sustancias mencionadas en el punto anterior 1.

El medio usado en el proceso de producción de la presente invención puede ser cualquiera de medios sintéticos y medios naturales siempre y cuando contengan nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo de la presente invención y la biosíntesis de L-glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina, por ejemplo, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y vitaminas.

Como las fuentes de carbono, se puede usar cualquiera de las fuentes de carbono que se puede asimilar por el microorganismo usado. Los ejemplos de fuentes de carbono adecuadas incluyen carbohidratos tales como glucosa y fructosa, alcoholes tales como etanol y glicerol y ácidos orgánicos tales como ácido acético.

Los ejemplos de las fuentes de nitrógeno incluyen amoníaco, sales de amonio tales como sulfato de amonio, compuestos de nitrógeno tales como amina y fuentes de nitrógeno naturales tales como peptona e hidrolizado de soja.

Los ejemplos de las sales inorgánicas incluyen fosfato potásico, sulfato de magnesio, cloruro sódico, sulfato ferroso y carbonato potásico.

Los ejemplos de las vitaminas incluyen biotina y tiamina. Además, si es necesario, se pueden añadir sustancias necesarias para el crecimiento de un microorganismo de la presente invención (por ejemplo, en el caso de un microorganismo que requiere aminoácidos, el aminoácido requerido).

El cultivo preferiblemente se realiza en condiciones aeróbicas, por ejemplo, mediante cultivo por agitación o cultivo con agitación centrífuga en aireación. La temperatura de cultivo es de 20 a 50°C, preferiblemente de 20 a 42°C y más preferiblemente de 28 a 38°C. El pH del cultivo es de 5 a 9, preferiblemente de 6 a 7,5 y el periodo de cultivo es de 5 horas a 5 días, preferiblemente de 16 horas a 3 días.

La L-Glutamina o la sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina acumulada en el medio se puede recuperar mediante métodos de purificación ordinarios. Por ejemplo, la L-glutamina se puede recuperar retirando las células y las materias sólidas por centrifugación o similar después del cultivo y después realizando tratamiento de intercambio iónico, concentración o cristalización fraccionada.

Determinadas realizaciones de la presente invención se ilustran en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

### Ejemplo 1

#### Preparación de un Microorganismos en el Que el Gen *glnE* y el gen *glnB* están Suprimidos

La supresión de genes específicos en ADN cromosómico de *Escherichia coli* se realizó de acuerdo con el método que utiliza el sistema de recombinación homóloga de fago lambda [Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 97, 6641-6645 (2000)]. Los plásmidos pKD46, pKD3 y pCP20 usados más adelante se prepararon mediante extracción, de acuerdo con un método conocido, a partir de cepas de *Escherichia coli* que los portan que se obtuvieron de *Escherichia coli* Genetic Stock Center, Universidad de Yale, EE.UU.

#### (1) Clonación del Gen de Resistencia a Fármaco para Supresión Génica

Las secuencias de nucleótidos del gen *glnE* y del gen *glnB* de *Escherichia coli* K12 se han descrito anteriormente [Science, 5331, 1453-1474 (1997)]. En base a las secuencias de nucleótidos indicadas, los ADN que consisten en las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID N°: 1 y 2 que se usarán como ADN cebadores para la supresión del gen *glnE* y los ADN que consisten que las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID N°: 3 y 4 que se usarán como ADN cebadores para la supresión del gen *glnB* se sintetizaron usando un sintetizador de ADN (Modelo 8905, PerSeptive Biosystems, Inc). Los ADN cebadores sintetizados se diseñaron basándose en las secuencias de nucleótidos de 36 pb que se encuentran cadena arriba y cadena abajo de los genes diana respectivos que se tienen que suprimir.

Se realizó PCR usando cada conjunto de los ADN sintéticos anteriores como un conjunto de cebadores y ADN de pKD3 como un molde. Se realizó PCR durante 30 ciclos de 94°C durante un minuto, 55°C durante 2 minutos y 72°C durante 3 minutos, usando 40  $\mu$ l de una mezcla de reacción que comprende 10 ng del ADN plasmídico, 0,5  $\mu$ mol/l de cada uno de los cebadores, 2,5 unidades de ADN polimerasa de *Pfu* (Stratagene), 4  $\mu$ l de tampón para ADN polimerasa de *Pfu* (10 x) (Stratagene) y 200  $\mu$ mol/l de cada uno de los desoxiNTP.

## ES 2 337 379 T3

Un décimo de cada una de las mezclas de reacción resultantes se sometió a electroforesis en gel de agarosa para confirmar que el fragmento deseado se había amplificado. Después, la mezcla de reacción restante se mezcló con un volumen igual de fenol/cloroformo (1 vol/l vol) saturado con TE [10 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,0), 1 mmol/l de EDTA].

La mezcla resultante se centrifugó y la capa superior obtenida se mezcló con un volumen de dos veces de etanol frío y se dejó que reposara a -80°C durante 30 minutos, seguido de centrifugación para precipitar el ADN. Después, el precipitado de ADN se disolvió en 20 µl de TE. Mediante este procedimiento, se obtuvieron fragmentos génicos de resistencia a cloranfenicol para supresión del gen *glnE* y el gen *glnB*.

### (2) Preparación de *Escherichia coli* JM101 en la Que el Gen *glnE* en el ADN Cromosómico se ha Suprimido

*Escherichia coli* JM101 se transformó con pKD46 y *Escherichia coli* JM101 que portaba pKD46 (denominada en lo sucesivo en este documento *Escherichia coli* JM101/pKD46) se seleccionó en medio LB agar que contenía 100 mg/l de ampicilina. La *Escherichia coli* JM101/pKD46 cultivada en presencia de 10 mmol/l de L-arabinosa y 50 µg/ml de ampicilina se transformó mediante electroporación usando el fragmento génico de resistencia a cloranfenicol para supresión del gen *glnE* y una cepa recombinante en la que el gen de resistencia a cloranfenicol se había insertado en el gen *glnE* en el ADN cromosómico de la cepa JM101 y el gen estructural de *glnE* se suprimió, se seleccionó en medio LB agar que contenía 25 mg/l de cloranfenicol.

Las réplicas de la cepa resistente a cloranfenicol obtenida se prepararon en medio de LB agar que contenía 25 mg/l de cloranfenicol, seguido por aislamiento de colonia única a 42°C. Después, las réplicas de las colonias obtenidas se prepararon en medio de LB agar que contenía 25 mg/l de cloranfenicol y LB agar que contenía 100 mg/l de ampicilina para seleccionar una colonia que mostraba resistencia a cloranfenicol y sensibilidad a ampicilina. La cepa con pKD46 eliminado seleccionada se transformó usando pCP20, se propagó en medio LB agar que contenía 100 mg/l de ampicilina y se cultivó durante una noche a 30°C.

Las réplicas de la cepa resistente a ampicilina que crecieron en el medio se prepararon en medio LB agar sin fármaco, seguido por aislamiento de colonia única a 42°C. Después, las réplicas de las colonias obtenidas se prepararon en medio LB agar sin fármaco, medio LB agar que contenía 25 mg/l de cloranfenicol y medio LB agar que contenía 100 mg/l de ampicilina para seleccionar colonias que mostraban sensibilidad a cloranfenicol y sensibilidad a ampicilina. Los ADN cromosómicos se prepararon a partir de las cepas respectivas obtenidas de ese modo de acuerdo con un método ordinario [Seibutsukogaku Jikkensho (Experiments in Biotechnology), editado por The Society for Biotechnology, Japón, pág. 97-98, Baifukan (1992)]. Se realizó PCR de colonia usando ADN cebadores que consisten en las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID N°: 5 y 6 que se diseñaron basándose en una secuencia de nucleótidos interna del gen *glnE*.

Se realizó PCR de colonia durante 30 ciclos de 94°C durante un minuto, 55°C durante 2 minutos y 72°C durante 3 minutos, usando 40 µl de una mezcla de reacción que comprende las células en una cantidad obtenida poniendo en contacto una punta de pipeta de 200 µl con la colonia, 0,5 µmol/l de cada uno de los cebadores, 2,5 unidades de ADN polimerasa de *Pfu*, 4 µl de tampón para ADN polimerasa de *Pfu* (10 x) y 200 µmol/l de cada uno de los desoxiNTP. De las cepas sometidas a PCR, se identificó una cepa con la que no se detectó amplificación génica como una cepa que tenía la supresión del gen *glnE* y se denominó *Escherichia coli* JGLE1.

De la misma manera a la anterior, *Escherichia coli* JM101/pKD46 se transformó usando el fragmento génico de resistencia a cloranfenicol para supresión del gen *glnB* para obtener *Escherichia coli* en la que el gen *glnB* se había suprimido y la cepa obtenida se denominó *Escherichia coli* JGLB1.

### (3) Preparación de *Escherichia coli* JM101 en la Que los Genes *glnE* y *glnB* en el ADN Cromosómico Están Suprimidos

*Escherichia coli* JGLE1 obtenido en el punto anterior (2) se transformó con pKD46, se propagó en medio LB agar que contenía 100 mg/l de ampicilina y se cultivó durante una noche a 30°C para obtener *Escherichia coli* JGLE1 que portaba pKD46 (denominada en este documento en lo sucesivo *Escherichia coli* JGLE1/pKD46). De la misma manera que en el punto anterior (2) *Escherichia coli* JGLE1/pKD46 se transformó mediante electroporación con el fragmento génico de resistencia a cloranfenicol para la supresión del gen *glnB* para obtener una cepa recombinante en la que el gen *glnB* en el ADN cromosómico se había suprimido. Se realizó PCR de colonia en las mismas condiciones que en el punto anterior (2) usando ADN cebadores que consisten en las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID N°: 7 y 8 que se denominaron basándose en una secuencia de nucleótidos interna en el gen *glnB*. Una cepa con la que no se detectó amplificación génica en la PCR anterior se identificó como una cepa que tenía la supresión del gen *glnB* y se denominó *Escherichia coli* JGLBE1.

## ES 2 337 379 T3

### Ejemplo 2

*Producción Fermentativa de L-Glutamina Usando el Microorganismo en el Que el Gen glnE y el Gen glnB Están Suprimidos (1)*

5 *Escherichia coli* JM101 y *Escherichia coli* JGLB1, *Escherichia coli* JGLE1 y *Escherichia coli* JGLBE1 obtenidas en el Ejemplo 1 se inocularon respectivamente en 8 ml de medio LB [10 g/l de Bacto-triptona (Difco), 5 g/l de extracto de levadura (Difco) y 5 g/l de cloruro de sodio] en un tubo de ensayo y se cultivaron a 28°C durante 17 horas. Cada uno de los cultivos resultantes se inoculó en 8 ml de un medio de producción [16 g/l de hidrogenofosfato dipotásico, 10 14 g/l de dihidrogenofosfato potásico, 5 g/l de sulfato de amonio, 1 g/l de ácido cítrico (anhidro), 5 g/l de ácido Casamino (Difco), 10 g/l de glucosa, 10 mg/l de vitamina B<sub>1</sub>, 25 mg/l de heptahidrato de sulfato de magnesio y 50 mg/l de heptahidrato de sulfato ferroso; pH ajustado a 7,2 con 10 mol/l de hidróxido sódico; glucosa, vitamina B<sub>1</sub>, heptahidrato de sulfato de magnesio y heptahidrato de sulfato ferroso se añadieron después de esterilización por vapor separada] en un tubo de ensayo en una cantidad del 1% y se cultivaron a 30°C durante 24 horas. El cultivo resultante se centrifugó para obtener un sobrenadante de cultivo.

El producto en el sobrenadante de cultivo se derivatizó mediante el método de F-moc y después se analizó mediante HPLC. El análisis de HPLC se realizó usando ODS-HG5 (Nomura Kagaku Co., Ltd.) como una columna de separación y solución A (6 ml/l de ácido acético y acetonitrilo al 20% (v/v), pH ajustado a 4,8 con trietilamina) y solución B (6 20 ml/l de ácido acético y acetonitrilo al 70% (v/v), pH ajustado a 4,8 con trietilamina) como eluyentes. La proporción de solución A a solución B fue de 8:2 durante los primeros 5 minutos de elución y a partir de entonces se cambió con un gradiente lineal de forma que la proporción se volvió 1:1 a los 20 minutos después del inicio de la elución. Los resultados de análisis se muestran en la Tabla 1.

	L-Glutamina (mg/l)	Ácido L-glutámico (mg/l)
JM101	0	24
JGLB1	0	25
JGLE1	10	53
JGLBE1	620	29

Los resultados en la Tabla 1 revelaron que *Escherichia coli* JGLBE1 en la que el gen *glnE* y el gen *glnB* se habían suprimido acumula una cantidad extraordinaria de L-glutamina en el medio en comparación con *Escherichia coli* JGLB1 o JGLE1 que tenían una supresión génica única en la que el gen *glnE* o el gen *glnB* se había suprimido.

### Ejemplo 3

*Producción Fermentativa de L-Glutamina Usando el Microorganismo en el Que el Gen glnE y el Gen glnB están Suprimidos (2)*

45 *Escherichia coli* JGLBE1 obtenida en el Ejemplo 1 se inoculó en 50 ml de medio LB en un matraz de Erlenmeyer de 300 ml y se cultivó a 28°C durante 17 horas.

El cultivo resultante se inoculó en 950 ml de un medio de producción para fermentación en tarro [7 g/l de dihidrogenofosfato potásico, 5 g/l de cloruro de amonio, 1 g/l de ácido cítrico (anhidro) 5 g/l de extracto de levadura (Kyokuto Pharmaceutical Ind. Co., Ltd.), 10 mg/l de heptahidrato de sulfato de manganeso, 20 g/l de glucosa, 10 mg/l de vitamina B<sub>1</sub>, 2 mg/l de heptahidrato de sulfato de magnesio y 0,2 g/l de heptahidrato de sulfato ferroso; pH ajustado a 7,2 con 10 mol/l de hidróxido sódico; glucosa, vitamina B<sub>1</sub>, heptahidrato de sulfato de magnesio y heptahidrato de sulfato ferroso se añadieron después de esterilización por vapor separada] en un fermentador de tarro 2-1 en una cantidad del 1%. El cultivo se realizó a 30°C con agitación (900 rpm) y aireación (aire comprimido esterilizado con un filtro de esterilización; 1,0 vvm), durante el cual el pH del medio se mantuvo a 7,0 con hidróxido de amonio al 18%. Después de que la glucosa añadida inicialmente se había agotado (después de 24 horas), se suministró una solución de glucosa al 60% esterilizada a una velocidad de 10 a 13 ml por hora.

Después de 50 horas de cultivo, el cultivo resultante se analizó de la misma manera que en el Ejemplo 2, mediante lo cual se observó que se habían acumulado 8,0 g/l de L-glutamina en el cultivo.

### Aplicabilidad industrial

Se puede producir eficazmente L-Glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina mediante la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* en el que las actividades de adenililtransferasa de glutamina sintetasa (denominada en lo sucesivo en este documento proteína GlnE) y proteína reguladora PII para glutamina sintetasa (denominada en lo sucesivo en este documento proteína GlnB) se reducen mediante mutación y que tiene la capacidad de formar y acumular L-glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina y en el que las actividades de adenililtransferasa de glutamina sintetasa y proteína reguladora PII para glutamina sintetasa están reducidas en comparación con cepas antes de la mutación.
- 10 2. Un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* en el que las actividades de proteína GlnE y proteína GlnB se pierden por mutación.
- 15 3. El microorganismo de acuerdo la reivindicación 1 ó 2, en el que el microorganismo que pertenece el género *Escherichia* es un microorganismo en el que un nucleótido se ha suprimido, sustituido o añadido en la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la proteína GlnE de tipo silvestre y en el del gen que codifica la proteína GlnB de tipo silvestre.
- 20 4. El microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el microorganismo que pertenece al género *Escherichia* es *Escherichia coli*.
- 25 5. El microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina es un aminoácido o ácido nucleico.
- 30 6. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el aminoácido es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en L-arginina, L-triptofano, L-histidina y ácido L-glutámico.
- 35 7. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el ácido nucleico es un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en adenosina, inosina, guanosina, xantosina, citidina, uridina, timidina, ácido 5'-adenílico, ácido 5'-inosínico, ácido 5'-guanílico, ácido 5'-citidílico, ácido 5'-xantílico, ácido 5'-uridílico y ácido 5'-timidílico.
- 40 8. Un proceso para producir L-glutamina o una sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina, que comprende: cultivar el microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un medio; permitir que L-glutamina o la sustancia se formen y acumulen en el medio; y recuperar la L-glutamina o la sustancia a partir del medio.
- 45 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la sustancia biosintetizada utilizando nitrógeno suministrado por L-glutamina es un aminoácido o un ácido nucleico.
- 50 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el aminoácido es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en L-arginina, L-triptofano, L-histidina y ácido L-glutámico.
- 55 11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el ácido nucleico es un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en adenosina, inosina, guanosina, xantosina, citidina, uridina, timidina, ácido 5'-adenílico, ácido 5'-inosínico, ácido 5'-guanílico, ácido 5'-citidílico, ácido 5'-xantílico, ácido 5'-uridílico y ácido 5'-timidílico.
- 60
- 65

# ES 2 337 379 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

5	SEC ID N°: 1 - Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
	SEC ID N°: 2 - Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
	SEC ID N°: 3 - Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
	SEC ID N°: 4 - Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
	SEC ID N°: 5 - Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
10	SEC ID N°: 6 - Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
	SEC ID N°: 7 - Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
	SEC ID N°: 8 - Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
	SEC ID N°: 9 - Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
15	<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.	
	<120> Proceso para producir sustancias	
	<130> 1000P11695W00	
20	<150> JP2004-189012	
	<151> 25-06-2004	
	<160> 9	
25	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
	<211> 56	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
35	<400> 1	
	gttgagcggc tgccagagcc ttagccgag gaatcagtgt aggctggagc tgcttc	56
40	<210> 2	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
50	<400> 2	
	ctgcagctt gccgcacca gttcagctc tgcggtcata tgaatatcct ccttag	56
55	<210> 3	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
	<400> 3	
65	ctggacgatg tccgcgaagc actggccgaa gtcggtgtgt aggctggagc tgcttc	56

## ES 2 337 379 T3

<210> 4  
<211> 56  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

10 <400> 4  
  
tgccgcgtcg tcctcttcac cggtacggat gcgaaatcata tgaatatcct ccttag 56

15 <210> 5  
<211> 27  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

25 <400> 5  
  
agccaaccgc cgcaggccga cgaatgg 27

30 <210> 6  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
35 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

40 <400> 6  
  
ggtcagcgcc atcgcttct gctcttc 27

45 <210> 7  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 7

55 tcccgacacg agctggatgc aaacgat 27

<210> 8  
<211> 27  
60 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
65 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

## ES 2 337 379 T3

<400> 8

atggaaacat ccggcaaccc ttgacgc

27

5

<210> 9

<211> 34

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

15 <400> 9

gaagttccta tactttctag agaataggaa cttc

34

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65