

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 955 417**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 15/77** (2006.01)

**C12P 19/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2019 PCT/KR2019/008924**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2020 WO20196993**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2019 E 19762700 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2023 EP 3739044**

54 Título: **Variante fosforribosil pirofosfato amidotransferasa y método para producir nucleótido de purina usando la misma**

30 Prioridad:

**28.03.2019 KR 20190035683**

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

**30.11.2023**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
CJ Cheiljedang Center 330, Dongho-ro Jung-gu  
Seoul 04560, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, JI HYE;  
PARK, SO JUNG y  
BAEK, MIN JI**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 955 417 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**

Variante fosforribosil pirofosfato amidotransferasa y método para producir nucleótido de purina usando la misma

**5 [Campo técnico]**

La presente descripción se refiere a una fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, a un microorganismo que incluye la misma, a un método para preparar un nucleótido de purina mediante el uso de la misma. También se describe en el presente documento una composición para producir un nucleótido de purina, un método para aumentar la producción de un nucleótido de purina, o el uso de la variante fosforribosilpirofosfato amidotransferasa.

**[Técnica anterior]**

15 Ácido 5'-inosínico (monofosfato de 5'-inosina; en lo sucesivo denominado IMP), que es un material a base de nucleótidos, es un material intermedio del sistema metabólico de la biosíntesis de ácidos nucleicos, y se usa en una variedad de campos, tales como productos médicos y aplicaciones médicas. El IMP es un material muy utilizado como aditivo condimentario o para alimentos, junto con el ácido 5'-guanílico (monofosfato de 5'-guanina; en lo sucesivo denominado GMP). Se sabe que el IMP en sí tiene sabor a carne de vacuno y que potencia el sabor del ácido glutámico monosódico (glutamato monosódico (MSG)), al igual que el GMP. Por lo tanto, IMP ha recibido mucha atención como condimento de sabor basado en nucleótidos.

Los métodos de preparación de IMP incluyen un método de degradación enzimática de ácidos ribonucleicos extraídos de células de levadura, un método de fosforilación química de inosina producida por fermentación (Agri. Biol. Chem., 36, 1511(1972), etc.), un método de cultivo de un microorganismo capaz de producir directamente IMP y de recuperación posterior de IMP en un cultivo del mismo, etc. Entre estos métodos, el más usado es el método de utilización de un microorganismo capaz de producir directamente IMP.

Además, los métodos de preparación de GMP incluyen un método de conversión de ácido 5'-xantílico (monofosfato de 5'-xantosina; en lo sucesivo denominado XMP) producido por fermentación microbiana en GMP mediante el uso de un microorganismo corineforme, y un método de conversión de XMP producido por fermentación microbiana en GMP mediante el uso de *Escherichia coli*. Según los métodos, cuando se produce XMP y luego se convierte en GMP, es necesario aumentar la productividad de XMP, que es un precursor de la reacción de conversión durante la fermentación microbiana, y se requiere evitar la pérdida de GMP que ya se ha producido a lo largo de la reacción de conversión, así como de XMP producido.

Mientras tanto, las enzimas en su estado natural no siempre presentan propiedades óptimas en cuanto a actividad, estabilidad, especificidad de sustrato para isómeros ópticos, etc., que son necesarias en las aplicaciones industriales. Por tanto, se han hecho diversos intentos de mejorar las enzimas mediante variaciones de sus secuencias de aminoácidos, etc., de forma que resulten adecuadas para el uso previsto. De estos, se han aplicado diseño racional y mutagénesis dirigida al sitio de enzimas para mejorar las funciones enzimáticas. Sin embargo, en muchos casos, existe el inconveniente de que la información sobre la estructura de una enzima diana no es suficiente, o la relación estructura-función no está clara, por lo que los métodos no pueden aplicarse eficazmente. A este respecto, se informa de que la mejora de la enzima se intenta mediante un método de evolución dirigida de selección de una enzima de un rasgo deseado a partir de una biblioteca de enzimas mutantes que se construye mediante mutagénesis aleatoria del gen de la enzima, lo que conduce a la mejora de su actividad.

**[Descripción]****[Problema técnico]**

Los presentes inventores han llevado a cabo amplios estudios para producir un nucleótido de purina con un alto rendimiento mediante un método de producción del nucleótido de purina a través de fermentación microbiana, e identificaron una variante de una proteína que tiene una mayor productividad de nucleótidos de purina, completando así la presente descripción.

**[Solución técnica]**

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

60 Un objeto de la presente descripción es proporcionar una fosforribosilpirofosfato amidotransferasa tal como se reivindica en la reivindicación 1.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un polinucleótido que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa.

65 Otro objeto más de la presente descripción es proporcionar un vector que incluya el polinucleótido.

Otro objeto más de la presente descripción es proporcionar un microorganismo del género *Corynebacterium* que produzca un nucleótido de purina, incluyendo el microorganismo la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa o el vector.

5 Otro objeto más de la presente descripción es proporcionar un método para preparar un nucleótido de purina, incluyendo el método la etapa de cultivar un microorganismo del género *Corynebacterium* en un medio.

10 También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, una composición para producir un nucleótido de purina, que comprende la variante fosforribosilpirofosfato amidotransferasa de la presente descripción.

Además, se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un método para aumentar la producción de un nucleótido de purina, que comprende la variante fosforribosilpirofosfato amidotransferasa de la presente descripción.

15 También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, el uso de la variante fosforribosilpirofosfato amidotransferasa para la producción de un nucleótido de purina.

20 También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un uso del polinucleótido para la producción de un nucleótido de purina.

También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un uso del microorganismo del género *Corynebacterium* para la producción de un nucleótido de purina.

25 [Efectos ventajosos]

Cuando una fosforribosilpirofosfato amidotransferasa de la presente descripción tal como se reivindica en la reivindicación 1 se usa para cultivar un microorganismo del género *Corynebacterium*, es posible producir un nucleótido de purina con un alto rendimiento. Además, el nucleótido de purina preparado puede aplicarse no sólo a alimentos para animales o aditivos para alimentos para animales, sino también a diversos productos tales como alimentos para humanos o aditivos alimentarios, condimentos, medicamentos, etc.

[Mejor modo]

35 Una descripción detallada es la siguiente.

En el presente documento se describe, pero no se reivindica, una variante fosforribosilpirofosfato amidotransferasa que tiene un polipéptido que incluye la sustitución de uno o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Específicamente, la presente descripción proporciona la variante fosforribosilpirofosfato amidotransferasa que tiene el polipéptido que incluye la sustitución de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde la sustitución de aminoácidos incluye la sustitución de un aminoácido en la posición 2 y/o la sustitución de un aminoácido en la posición 445 desde el extremo N-terminal de SEQ ID NO: 2.

45 Para lograr los objetos anteriores, un aspecto de la presente descripción proporciona una variante fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, en donde i) el aminoácido en la posición 2 se sustituye por metionina, ii) el aminoácido en la posición 455 se sustituye por arginina, o iii) el aminoácido en la posición 2 se sustituye por metionina y el aminoácido en la posición 455 se sustituye por arginina a partir del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y en donde la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “fosforribosilpirofosfato amidotransferasa” se refiere a una enzima que tiene un papel importante en la biosíntesis de purinas. Con respecto a los objetos de la presente descripción, la enzima se refiere a una proteína implicada en la producción de nucleótidos de purina.

55 En la presente descripción, SEQ ID NO: 2 se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene actividad fosforribosilpirofosfato amidotransferasa. Específicamente, SEQ ID NO: 2 es una secuencia de una proteína que tiene actividad fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, que está codificada por el gen *purF*. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 puede obtenerse de NCBI GenBank, que es una base de datos pública. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 puede derivarse del género *Corynebacterium* (*Corynebacterium* sp.), y puede incluir cualquier secuencia que tenga la misma actividad que la de la secuencia de aminoácidos anterior sin limitación. Además, el alcance de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 puede incluir una secuencia de aminoácidos que tenga actividad fosforribosilpirofosfato amidotransferasa de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que tenga un 80 % o más de homología o identidad con la misma. La secuencia de aminoácidos incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o más de homología o identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos que tiene homología o identidad puede ser las que excluyen una

5 secuencia que tiene el 100 % de identidad del rango anterior, o puede ser una secuencia que tiene menos del 100 % de identidad. Además, es evidente que una proteína que tenga una secuencia de aminoácidos con supresión, modificación, sustitución o adición de algunos aminoácidos también entra dentro del ámbito de la presente invención, siempre que tenga la homología o identidad y muestre una eficacia correspondiente a la de la proteína anterior.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “fosforribosilpirofosfato amidotransferasa” puede utilizarse indistintamente con polipéptido que produce nucleótidos de purina, un polipéptido productor de nucleótidos de purina, un polipéptido que produce un nucleótido de purina, un polipéptido con actividad fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, una fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, etc.

15 La fosforribosilpirofosfato amidotransferasa incluye variación(es) en la posición 2 y/o en la posición 445 desde el N-terminal en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. La fosforribosilpirofosfato amidotransferasa puede tener la sustitución de otro(s) aminoácido(s) por el(los) aminoácido(s) en la posición 2 y/o en la posición 445 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una actividad mejorada, en comparación con las que incluyen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una fosforribosilpirofosfato amidotransferasa no modificada derivada del microorganismo de tipo natural. Dicha variante de fosforribosilpirofosfato amidotransferasa significa aquellas que tienen variación del aminoácido en la posición 2 o en la posición 445 desde el N-terminal de la SEQ ID NO: 2 y/o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o más de homología o identidad con la SEQ ID NO: 2, tal como se ha descrito anteriormente.

20 La fosforribosilpirofosfato amidotransferasa tiene i) sustitución de metionina por el aminoácido en la posición 2, ii) la sustitución de arginina por el aminoácido en la posición 445, o iii) la sustitución de metionina por el aminoácido en la posición 2 y la sustitución de arginina por el aminoácido en la posición 445 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y puede tener una actividad fosforribosilpirofosfato amidotransferasa potenciada, en comparación con el polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

25 Con respecto a los objetos de la presente descripción, un microorganismo que incluye la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa tiene una productividad más alta de nucleótidos de purina que un microorganismo de tipo natural, un microorganismo que incluye la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa de tipo natural, o un microorganismo que no incluye fosforribosilpirofosfato amidotransferasa. La presente descripción es de importancia porque la producción de nucleótidos de purina por microorganismos puede aumentarse mediante el uso de la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa de la presente descripción, mientras que la cepa de tipo natural del género *Corynebacterium* no puede producir nucleótidos de purina o, aunque produce nucleótidos de purina, es capaz de producir cantidades traza de los mismos.

30 La fosforribosilpirofosfato amidotransferasa incluye una secuencia de aminoácidos que tiene sustitución de otro(s) aminoácido(s) para el (los) aminoácido (s) en la posición 2 y/o en la posición 445 como sigue: i) la sustitución de metionina por el aminoácido en la posición 2, ii) la sustitución de arginina por el aminoácido en la posición 445, o iii) la sustitución de metionina por el aminoácido en la posición 2 y la sustitución de arginina por el aminoácido en la posición 445 desde el extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Además, la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa incluye una secuencia de aminoácidos en la que otro(s) aminoácido(s) se sustituye(n) por el(los) aminoácido(s) en la posición 2 y/o en la posición 445 desde el N-terminal en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos que tiene un 80 % o más de homología o identidad con la misma. Específicamente, la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa de la presente descripción puede incluir un polipéptido que tenga al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o más de homología o identidad con la secuencia de aminoácidos que tiene sustitución de metionina por el aminoácido en la posición 2 o sustitución de arginina por el aminoácido en la posición 445 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

35 En otras palabras, aunque la presente descripción describe una “proteína o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por una SEQ ID NO: particular”, es evidente pero no se reivindica que una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con supresión, modificación, sustitución, sustitución conservativa o adición de algunos aminoácidos también puede utilizarse en la presente descripción, siempre que tenga una actividad idéntica o correspondiente a la del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: correspondiente. Por ejemplo, mientras una proteína tenga la actividad idéntica o correspondiente a la de la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, no excluye la adición de secuencia, la mutación natural, la mutación silenciosa o la sustitución conservadora de la misma que no altere la función de la proteína, antes y después de la secuencia de aminoácidos.

40 Por “sustitución conservadora” se entiende la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades estructurales y/o químicas similares. Esta sustitución de aminoácidos puede realizarse generalmente sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o naturaleza anfipática. Por ejemplo, los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; los aminoácidos cargados negativamente (ácidos), incluyen ácido glutámico y ácido aspártico; los aminoácidos aromáticos incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina; y los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano.

La “variante” puede incluir además la sustitución y/o modificación conservadora de uno o más aminoácidos en “una proteína o polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos representada por una SEQ ID NO: particular”. Por ejemplo, determinadas variantes pueden incluir variantes en las que se han eliminado una o más porciones, tales como una secuencia líder N-terminal o un dominio transmembrana. Otra variante puede incluir variantes en las que se ha eliminado una porción del N- y/o C-terminal de la proteína madura. La variante también puede incluir otras modificaciones, incluida la supresión o adición de aminoácidos, que tienen efectos mínimos sobre las propiedades y la estructura secundaria del polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido puede conjugarse con una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de una proteína que dirige la transferencia de la proteína de forma co-traducciona l o post-traducciona l. El polipéptido también puede conjugarse con otra secuencia o un enlazador para facilitar la identificación, purificación o síntesis del polipéptido. El término “variante” puede utilizarse indistintamente con modificación, proteína modificada, polipéptido modificado, mutante, muteína, divergente, etc., y puede emplearse cualquier término sin limitación, siempre que se utilice en el sentido de ser modificado.

Homología e identidad significan un grado de parentesco entre dos secuencias dadas de aminoácidos o secuencias de nucleótidos, y pueden expresarse en porcentaje. Los términos homología e identidad pueden utilizarse indistintamente.

La homología o identidad de secuencias de un polinucleótido o polipéptido conservado puede determinarse mediante un algoritmo de alineación estándar utilizado con penalizaciones de separación predeterminadas establecidas por un programa que se vaya a utilizar. Sustancialmente, las secuencias homólogas o idénticas pueden hibridar en condiciones moderada o altamente estrictas a lo largo de toda su secuencia o en al menos aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 % o aproximadamente un 90 % de toda su longitud. Con respecto a los polinucleótidos a hibridar, también pueden contemplarse polinucleótidos que incluyan un codón degenerado en lugar de un codón.

En general, como codón define qué aminoácido debe codificarse, un codón se forma emparejando tres secuencias de nucleótidos. Existen más tipos de codones en comparación con el del aminoácido a codificar, y el tipo de aminoácido a producir difiere de acuerdo con la combinación de codones. La traducción comienza a partir de un codón de iniciación y el primer aminoácido a traducir puede ser fMet. Generalmente, la traducción procede transportando fMET para el codón del ARNm correspondiente a la secuencia atg del ADN. Sin embargo, la traducción puede proceder transportando fMET cuando el primer ADN del ARNm ORF (marco abierto de lectura) es gtg o ttg. Es decir, el codón de iniciación puede ser atg, gtg o ttg.

Si dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas tienen homología, similitud o identidad puede determinarse, por ejemplo, mediante un algoritmo informático conocido, como el programa “FASTA”, utilizando parámetros predeterminados tal como en Pearson y col. (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444, y alternativamente, determinado mediante el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) tal como se aplica en el programa Needleman del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y col., 2000, Trends Genet. 16: 276-277) (versión 5.0.0 o posterior) [incluyendo el paquete de programas GCG (Devereux, J., y col., Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [Y COL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, and [CARILLO ETA.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). Por ejemplo, la homología, la similitud o la identidad pueden determinarse utilizando BLAST o ClustalW del National Center for Biotechnology Information.

La homología, similitud o identidad de polinucleótidos o polipéptidos puede determinarse comparando la información de secuencias mediante un programa informático GAP, por ejemplo, Needleman y col. (1970), J Mol Biol.48: 443, tal como se describe en Smith y Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482. Brevemente, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto del programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada (o matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4)) de Gribskov y col. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745, tal como se describe en Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada espacio y una penalización de 0,10 adicional para cada símbolo en cada espacio (o penalización por apertura de hueco 10, penalización por extensión de hueco 0,5); y (3) ninguna penalización para los espacios finales. Por tanto, el término “homología” o “identidad”, tal como se utiliza en el presente documento, representa la relevancia entre secuencias.

Debido a la degeneración de codones, es evidente que también puede incluirse un polinucleótido para traducirse en el polipéptido que tenga sustitución de otro(s) aminoácido(s) por el(los) aminoácido(s) en la posición 2 y/o en la posición 445 desde el N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que tenga homología o identidad con el mismo. Además, mediante hibridación en condiciones rigurosas con una sonda preparada a partir de una secuencia génica conocida, por ejemplo, una secuencia complementaria a toda o parte de la secuencia de nucleótidos, se incluye una secuencia polinucleotídica que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa que incluye la secuencia de aminoácidos en la que i) sustitución de metionina por el aminoácido en la posición 2 ii) sustitución de arginina por el aminoácido en la posición 445, o iii) sustitución de metionina por

el aminoácido en la posición 2 y sustitución de arginina por el aminoácido en la posición 445 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “polinucleótido” se refiere a una cadena de ADN o ARN que tiene más de una longitud determinada como polímero nucleotídico, que es una cadena larga de monómeros nucleotídicos conectados por enlaces covalentes, y más específicamente, a un fragmento polinucleotídico que codifica un polipéptido.

10 El polinucleótido que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa de la presente descripción puede incluir cualquier secuencia polinucleotídica sin limitación, siempre y cuando codifique el polipéptido que tiene actividad fosforribosilpirofosfato amidotransferasa de la presente descripción como se reivindica en la reivindicación 1. En la presente descripción, un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa es el gen *purF*, y específicamente, el gen puede derivarse de *Corynebacterium stationis*.

15 Específicamente, debido a la degeneración de codones o al considerar codones preferidos por un microorganismo en el que se permite que el polipéptido se exprese, pueden realizarse diversas modificaciones en la región codificante del polinucleótido de la presente descripción dentro del alcance que no cambia la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Puede incluirse cualquier secuencia polinucleotídica sin limitación siempre que codifique la variante fosforribosilpirofosfato amidotransferasa que tiene sustitución de metionina por el aminoácido en la posición 2 o de arginina por el aminoácido en la posición 445 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, el polinucleótido de la presente descripción puede incluir una secuencia que tenga alguna secuencia modificada en SEQ ID NO: 1.

25 Además, mediante hibridación en condiciones estrictas con una sonda preparada a partir de una secuencia genética conocida, por ejemplo, una secuencia complementaria a toda o parte de la secuencia de nucleótidos, se incluye una secuencia que codifica una proteína que tiene actividad de la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa con sustitución de metionina por el aminoácido en la posición 2 o de arginina por el aminoácido en la posición 445 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Por “condiciones estrictas” se entienden las condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos. Tales condiciones se describen detalladamente en la bibliografía (por ejemplo, J. Sambrook y col., anteriormente). Las condiciones estrictas pueden incluir condiciones en las que los genes que tienen homología o identidad alta, por ejemplo, genes que tienen 40 % o más, específicamente 85 % o más, 90 % o más, más específicamente 95 % o más, aún más específicamente 97 % o más, particularmente específicamente 99 % o más de homología o identidad son capaces de hibridarse entre sí, y los genes que tienen homología o identidad más baja no son capaces de hibridarse entre sí, o condiciones que son condiciones de lavado comunes para la hibridación Southern, por ejemplo una concentración de sal y una temperatura correspondientes a 35 60 °C, 1×SSC, 0,1 % SDS, específicamente 60 °C, 0,1×SSC, 0,1 % SDS, más específicamente 68 °C, 0,1×SSC, 0,1 % SDS, una vez, específicamente, dos o tres veces.

40 La hibridación requiere que dos ácidos nucleicos tengan secuencias complementarias, aunque son posibles apareamientos erróneos entre bases dependiendo del grado de rigor de la hibridación. El término “complementario” se utiliza para describir la relación entre bases nucleotídicas capaces de hibridarse entre sí. Por ejemplo, con respecto al ADN, la adenosina es complementaria a la timina y la citosina es complementaria a la guanina. Por consiguiente, la presente descripción también puede incluir fragmentos aislados de ácido nucleico complementarios a las secuencias completas, así como secuencias de ácido nucleico sustancialmente similares.

45 Específicamente, un polinucleótido que tenga homología o identidad puede detectarse mediante condiciones de hibridación que incluyan una etapa de hibridación a  $T_m$  de 55 °C y utilizando las condiciones descritas anteriormente. Además, el valor de  $T_m$  puede ser de 60 °C, 63 °C o 65 °C y puede ser controlado adecuadamente por los expertos en la técnica según el propósito.

50 La rigurosidad apropiada para hibridar polinucleótidos depende de la longitud de los polinucleótidos y el grado de complementación, y variables bien conocidas en la técnica (véase Sambrook y col, anteriormente, 9.50-9.51, 11.7-11.8).

55 En la presente descripción, el gen que codifica la secuencia de aminoácidos de la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa es el gen *purF*, y un polinucleótido que codifica el mismo es el mismo descrito anteriormente.

En la presente descripción, el polinucleótido que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa también es el mismo que se ha descrito anteriormente.

60 Otro aspecto más de la presente descripción proporciona un polinucleótido que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, o un vector que incluye el polinucleótido.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a una construcción de ADN que contiene la secuencia nucleotídica del polinucleótido que codifica el polipéptido deseado y que está unido de forma operable a una secuencia de control adecuada, de manera que el polipéptido deseado se expresa en un huésped adecuado. Las secuencias de control pueden incluir un promotor para dirigir la transcripción, una secuencia operadora determinada para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifique un sitio adecuado de unión al ribosoma

en el ARNm y una secuencia para controlar la terminación de la transcripción y la traducción. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede replicarse o funcionar independientemente del genoma del hospedador, o puede integrarse en el propio genoma.

5 El vector usado en la presente descripción es replicable en la célula huésped, y puede utilizarse cualquier vector conocido en la técnica. Los ejemplos del vector comúnmente usado pueden incluir plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos naturales o recombinantes. Por ejemplo, como vector fago o vector cósmido, pueden utilizarse pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, etc., y como vector plásmido, pueden utilizarse los basados en pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, etc. Específicamente, pueden utilizarse pDZ, 10 pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, el vector pCCIBAC, etc.

Por ejemplo, el polinucleótido que codifica el polipéptido deseado puede insertarse en el cromosoma a través de un vector de inserción cromosómica en una célula. La inserción del polinucleótido en el cromosoma puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por recombinación homóloga. Se puede incluir adicionalmente 15 un marcador de selección para confirmar la inserción del vector en el cromosoma. El marcador de selección se utiliza para la selección de células transformadas con el vector, es decir, para confirmar si se ha insertado la molécula de ácido nucleico deseada, y pueden utilizarse marcadores capaces de proporcionar fenotipos seleccionables tales como resistencia a fármacos, auxotrofia, resistencia a agentes citotóxicos y expresión de proteínas de superficie. En las circunstancias en las que se tratan los agentes selectivos, sólo las células capaces de expresar los marcadores de selección pueden sobrevivir o expresar otros rasgos fenotípicos, por lo que las células transformadas pueden ser seleccionadas.

Otro aspecto más de la presente descripción proporciona un microorganismo productor de un nucleótido de purina, incluyendo el microorganismo la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa como se reivindica en la reivindicación 1 o 25 el polinucleótido que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa. Específicamente, el microorganismo que incluye la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa y/o el polinucleótido que la codifica puede ser un microorganismo preparado por transformación con un vector que incluye el polinucleótido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “transformación” se refiere a un proceso de introducción de un vector que incluye un polinucleótido que codifica una proteína diana en una célula huésped, de forma que la 30 proteína codificada por el polinucleótido pueda expresarse en la célula huésped. No importa si el polinucleótido transformado se inserta en el cromosoma de una célula huésped y se localiza en él o se localiza fuera del cromosoma, siempre que el polinucleótido transformado pueda expresarse en la célula huésped. Además, el polinucleótido puede incluir ADN y ARN que codifiquen la proteína diana. El polinucleótido puede introducirse en cualquier forma, siempre que el polinucleótido pueda introducirse en la célula huésped y expresarse en ella. Por 35 ejemplo, el polinucleótido puede introducirse en la célula huésped en forma de un casete de expresión, que es un constructo génico que incluye todos los elementos necesarios para la expresión autónoma. El casete de expresión puede incluir un promotor, una señal de terminación de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma y una señal de terminación de la traducción que pueden estar unidos de forma operable al polinucleótido. El casete de expresión puede estar en forma de un vector de expresión que realiza autorreplicación. Además, el polinucleótido puede ser 40 introducido en la célula huésped como tal para ser enlazado operablemente a la secuencia requerida para la expresión en la célula huésped.

Además, la expresión “unido operablemente” se refiere a una unión funcional entre una secuencia génica y una 45 secuencia promotora que inicia y media la transcripción del polinucleótido que codifica el polipéptido deseado de la presente descripción.

La expresión “microorganismo que incluye el polipéptido” o “microorganismo que incluye la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un microorganismo preparado proporcionando productividad de nucleótidos de purina a un microorganismo que tiene una productividad de nucleótidos de purina naturalmente débil o a una cepa madre que no tiene productividad de nucleótidos de purina. El 50 microorganismo es un microorganismo que expresa la t fosforribosilpirofosfato amidotransferasa que tiene el polipéptido que incluye la sustitución de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en el que la sustitución de aminoácidos incluye la sustitución de metionina por el aminoácido en la posición 2 y/o la sustitución de arginina por el aminoácido en la posición 445 del N-terminal de SEQ ID NO: 2, en el que la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de 55 SEQ ID NO: 2. También se describe un microorganismo que puede ser un microorganismo que expresa el polipéptido variante, en el que el microorganismo tiene actividad fosforribosilpirofosfato amidotransferasa debido a la sustitución de otro(s) aminoácido(s) por el(los) aminoácido(s) en la posición 2 y/o en la posición 445 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

60 El microorganismo puede ser una célula o un microorganismo que puede incluir el polinucleótido que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, o puede transformarse con el vector que incluye el polinucleótido que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa para expresar la misma.

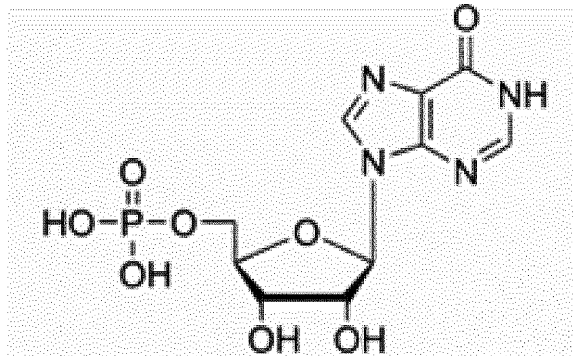
65

En la presente descripción, el microorganismo productor de un nucleótido de purina puede utilizarse indistintamente con un microorganismo productor de nucleótidos de purina o un microorganismo con productividad de nucleótidos de purina.

5 Con respecto a los objetos de la presente descripción, el “nucleótido de purina” significa un nucleótido que incluye una estructura de purina. Los ejemplos de los mismos pueden incluir IMP, XMP o GMP.

Específicamente, el término “IMP (monofosfato de 5'-inosina)” es un material a base de ácido nucleico que se compone de la siguiente fórmula química 1:

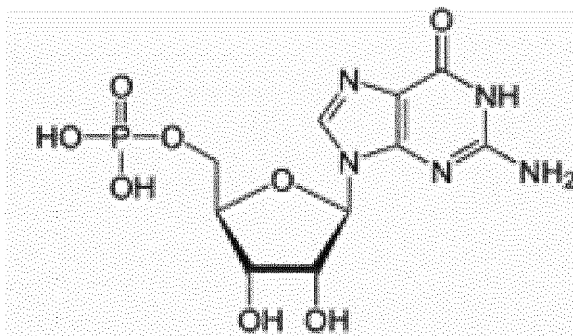
[Fórmula química 1]



El IMP tiene el nombre IUPAC de monofosfato de 5'-inosina o ácido 5'-inosínico, y se utiliza ampliamente en los alimentos como potenciador del sabor, junto con el XMP o el GMP.

30 El término “GMP (5'-guanina monofosfato)” es un material a base de ácido nucleico compuesto por la siguiente fórmula química 2:

[Fórmula química 2]

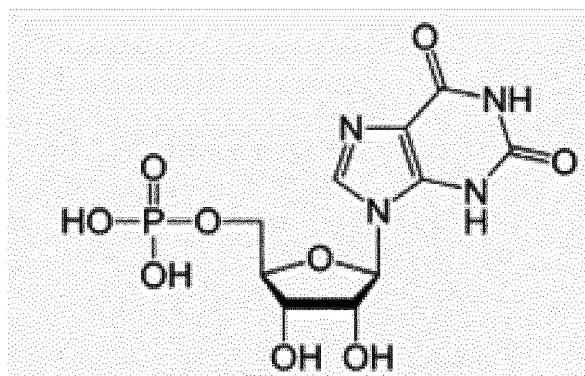


GMP tiene el nombre IUPAC de [(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-9*H*-purin-9-il)-3,4-dihidroxitetrahydro-2-furanil]dihidrógeno fosfato de metilo, y también se denomina ácido 5'-guanídílico, ácido 5'-guanílico o ácido guanílico.

GMP en forma de sus sales, tales como guanilato de sodio, guanilato de dipotasio y guanilato de calcio, se usa ampliamente como aditivo alimenticio. Cuando se usa como aditivo junto con IMP, GMP exhibe un efecto sinérgico para mejorar el sabor. GMP puede prepararse convirtiéndose a partir de XMP. Tal como se confirma en una realización de la presente descripción, el polipéptido de la presente descripción puede aumentar la producción de XMP, y a partir del aumento de la producción de XMP, se puede convertir el GMP y aumentar su producción. Por consiguiente, es evidente que GMP también se incluye en el alcance de la presente descripción.

El término “XMP (monofosfato de 5'-xantosina)” es un material intermedio del metabolismo de las purinas y está compuesto por la siguiente fórmula química 3. El XMP tiene el nombre IUPAC de monofosfato de 5'-inosina o ácido 5'-xantílico. El XMP puede formarse a partir de IMP por acción de la IMP deshidrogenasa, o el XMP puede convertirse en GMP por acción de la GMP sintetasa. Además, el XMP puede formarse a partir del XTP mediante la desoxirribonucleósido trifosfato pirofosfohidrolasa, que es una enzima con actividad XTPasa.

## [Fórmula química 3]



5

10

15

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “microorganismo productor de un nucleótido de purina” puede ser un microorganismo en el que se produce una modificación genética o se potencia la actividad para producir el nucleótido de purina deseado, incluido todo un microorganismo de tipo natural o un microorganismo en el que se produce una modificación genética de forma natural o artificial, y el microorganismo puede ser un microorganismo en el que un mecanismo particular se debilita o potencia mediante la inserción de un gen exógeno o mediante la potenciación o inactivación de la actividad de un gen endógeno. Con respecto a los objetos de la presente descripción, el microorganismo productor de un nucleótido de purina puede caracterizarse en que el microorganismo incluye la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa para tener una mayor productividad de un nucleótido de purina deseado, y el microorganismo es un microorganismo del género *Corynebacterium*. Específicamente, en la presente descripción, el microorganismo productor de un nucleótido de purina o el microorganismo con productividad de nucleótidos de purina puede ser un microorganismo en el que algunos de los genes implicados en la vía de biosíntesis de nucleótidos de purina están potenciados o debilitados, o algunos de los genes implicados en la vía de degradación de nucleótidos de purina están potenciados o debilitados. Por ejemplo, el microorganismo puede ser un microorganismo en el que la expresión del gen *purA* que codifica la adenilosuccinato sintetasa esté debilitada. Además, la expresión de *guaB*, que es un gen que codifica la inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa presente en la vía de degradación del IMP, puede regularse en función del nucleótido de purina. Específicamente, cuando el nucleótido de purina es IMP, la expresión de *guaB* puede debilitarse, o cuando el nucleótido de purina es XMP o GMP, la expresión de *guaB* puede potenciarse.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “microorganismo del género *Corynebacterium* que produce un nucleótido de purina” se refiere a un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de nucleótidos de purina de forma natural o por mutación. Específicamente, tal como se utiliza en el presente documento, el microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad de nucleótidos de purina puede ser un microorganismo del género *Corynebacterium* que ha mejorado la productividad de nucleótidos de purina debido a una mayor actividad del gen *purF* que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa. Más concretamente, tal como se usa en el presente documento, el microorganismo del género *Corynebacterium* con productividad de nucleótidos de purina se refiere a un microorganismo del género *Corynebacterium* que ha mejorado la productividad de nucleótidos de purina debido a la inclusión de la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa o el polinucleótido que codifica la misma, o debido a la transformación con el vector que incluye el polinucleótido que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa. El “microorganismo del género *Corynebacterium* que ha mejorado la productividad de nucleótidos de purina” se refiere a un microorganismo que ha mejorado la productividad de nucleótidos de purina, en comparación con una cepa parental antes de la transformación o con un microorganismo no modificado. El “microorganismo no modificado” se refiere a una cepa de tipo natural propiamente dicha, o a un microorganismo que no incluye la variante de nucleótido de purina productora de proteínas, o a un microorganismo que no se transforma con el vector que incluye el polinucleótido que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa.

Tal como se usa en el presente documento, el “microorganismo del género *Corynebacterium*” puede ser específicamente *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium stationis*, etc.

Otro aspecto más de la presente descripción proporciona un método para preparar un nucleótido de purina, incluyendo el método la etapa de cultivar el microorganismo del género *Corynebacterium* que produce un nucleótido de purina en un medio. Por ejemplo, el método de la presente descripción puede incluir además la etapa de recuperar el nucleótido de purina del microorganismo o del medio después de la etapa de cultivo.

En el método, la etapa de cultivo del microorganismo puede realizarse mediante un cultivo por lotes conocido, un cultivo continuo, un cultivo por lotes alimentado, etc. A este respecto, las condiciones de cultivo son un pH óptimo

(por ejemplo, pH 5 a pH 9, específicamente pH 6 a pH 8, y más específicamente pH 6,8) puede ajustarse utilizando un compuesto básico (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco) o un compuesto ácido (por ejemplo, ácido fosfórico o ácido sulfúrico). Se puede mantener una condición aeróbica añadiendo oxígeno o una mezcla gaseosa que contenga oxígeno al cultivo. La temperatura de cultivo puede mantenerse entre 20 °C y 45 °C, y específicamente entre 25 °C y 40 °C, y el cultivo puede realizarse durante entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 160 horas. El nucleótido de purina producido por el cultivo puede segregarse al medio o permanecer dentro de las células.

Además, en un medio de cultivo a utilizar, como fuente de carbono, azúcares e hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y celulosa), aceites y grasas (por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco), ácidos grasos (por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico), alcoholes (por ejemplo, glicerol y etanol), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético), etc., pueden utilizarse individualmente o mezclados. Como fuente de nitrógeno, puede utilizarse un compuesto orgánico que contenga nitrógeno (por ejemplo, peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de remojo de maíz, harina de soja y urea), o un compuesto inorgánico (por ejemplo, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio), etc., individualmente o en una mezcla. Como fuente de fósforo, pueden utilizarse dihidrogenofosfato potásico, hidrogenofosfato dipotásico, la sal sódica correspondiente, etc., individualmente o en una mezcla. El medio también puede incluir materiales esenciales que promuevan el crecimiento, tales como otras sales metálicas (por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro), aminoácidos y vitaminas.

Un método de recuperación del nucleótido de purina producido en la etapa de cultivo de la presente descripción consiste en recoger el nucleótido de purina deseado del medio de cultivo utilizando un método apropiado conocido en la técnica según el método de cultivo. Por ejemplo, puede utilizarse centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización, HPLC, etc., y el nucleótido de purina deseado puede recuperarse del medio o microorganismo utilizando un método apropiado conocido en la técnica.

Además, la etapa de recuperación puede incluir un proceso de purificación. El proceso de purificación puede realizarse mediante el uso de un método apropiado conocido en la técnica. Por tanto, el nucleótido de purina recuperado puede ser una forma purificada o un líquido de fermentación de microorganismos que incluya el nucleótido de purina (Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).

También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, una composición para producir un nucleótido de purina, que comprende la variante fosforribosilpirofosfato amidotransferasa.

La composición para producir un nucleótido de purina se refiere a una composición capaz de producir un nucleótido de purina por el polinucleótido de la presente descripción. Por ejemplo, la composición comprende el polinucleótido, y además puede comprender, sin limitación, una constitución capaz de hacer funcionar el polinucleótido. El polinucleótido puede estar en una forma incluida en un vector para expresar un gen vinculado operablemente a la célula huésped introducida.

Además, la composición puede comprender además cualquier excipiente adecuado utilizado convencionalmente en una composición para producir un nucleótido de purina. Dicho excipiente puede ser, por ejemplo, un conservante, un agente humectante, un agente dispersante, un agente de suspensión, un tampón, un agente estabilizador o un agente isotónico.

También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un método para aumentar la producción de un nucleótido de purina, que comprende la etapa de cultivo de la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa en un microorganismo del género *Corynebacterium*.

Los términos “fosforribosilpirofosfato amidotransferasa”, “microorganismo del género *Corynebacterium*”, “cultivo”, “homoserina o L-aminoácido derivado de la homoserina” son los descritos anteriormente.

También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un uso de la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa para la producción de un nucleótido de purina, o la preparación de una composición para producir un nucleótido de purina.

También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un uso del polinucleótido para la producción de un nucleótido de purina, o la preparación de una composición para producir un nucleótido de purina.

También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, el uso del microorganismo del género *Corynebacterium* para la producción de un nucleótido de purina, o la preparación de una composición para producir un nucleótido de purina.

[Modo para la invención]

De aquí en adelante, la presente descripción se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. No obstante, es evidente para los expertos en la técnica a la que se refiere la presente descripción que estos ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos.

## 5 Ejemplo 1: Preparación de la cepa productora de IMP de tipo natural

Las cepas de tipo natural del género *Corynebacterium* no pueden producir IMP, o pueden producirlo en cantidades muy pequeñas. Por tanto, se preparó una cepa productora de IMP basada en *Corynebacterium stationis* ATCC6872 de tipo natural. Específicamente, la cepa productora de IMP se preparó debilitando la actividad de *purA*, que codifica la adenilosuccinato sintetasa, y la actividad de *guaB*, que codifica la deshidrogenasa del ácido 5'-inosínico.

Ejemplo 1-1: Preparación de la cepa debilitada *purA*

Para preparar una cepa en la que se cambiara el codón de inicio de *purA*, se preparó primero un vector de inserción que contenía *purA*. Para clonar el gen *purA* en el vector de inserción, se realizó una PCR utilizando el ADN genómico de *Corynebacterium stationis* ATCC6872 como molde y los cebadores de SEQ ID NO: 3 y 4 y SEQ ID NO: 5 y 6 durante 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, recocido a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 2 min. La PCR se realizó utilizando dos fragmentos de ADN obtenidos por la PCR anterior como molde y los cebadores de SEQ ID NO: 3 y 6 durante 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, recocido a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 2 min para obtener un fragmento de ADN. El fragmento de ADN obtenido se digirió con la enzima de restricción XbaI y se clonó en un vector pDZ (patente coreana n.º 10-0924065 y publicación internacional de patente n.º 2008-033001) que había sido digerido con la misma enzima. El vector preparado por el método anterior se designó como pDZ-*purA*-alt.

[Tabla 1]

SEQ ID NO.	Nombre del cebador	(Secuencia (5'-3'))
3	pDZ- <i>purA</i> (alt) -1	GCTCTAGAGGCCACGATGCCCGGAGCATC
4	pDZ- <i>purA</i> (alt) -2	TAACGATAGCTGCCAAGGTTATTCACCTCCTAGATT
5	pDZ- <i>purA</i> (alt)-3	AGGAAGTGAATAACCTTGGCAGCTATCGTTATCGTCCG
6	pDZ- <i>purA</i> (alt)-4	GCTCTAGAGGTCACGAATGGGTAGGTGCC

El vector recombinante pDZ-*purA*-alt se transformó en la cepa *Corynebacterium stationis* ATCC6872 por electroporación y, a continuación, las cepas en las que se insertó el vector en el cromosoma por recombinación homóloga se seleccionaron en un medio que contenía 25 mg/l de kanamicina. Las cepas primarias así seleccionadas se sometieron a un cruce secundario y, a continuación, las cepas seleccionadas se sometieron a secuenciación, con lo que se seleccionó una cepa final en la que se introdujo la mutación. Esta cepa se designó ATCC6872-*purA*(alt).

Ejemplo 1-2: Preparación de la cepa debilitada *guaB*

Para preparar una cepa en la que se cambiara el codón de inicio de *guaB*, primero se preparó un vector de inserción que contenía *guaB*. Para clonar el gen *guaB* en el vector de inserción, se realizó una PCR utilizando el ADN genómico de *Corynebacterium stationis* ATCC6872 como molde y los cebadores de SEQ ID NO: 7 y 8 y SEQ ID NO: 9 y 10. La PCR también se realizó usando los productos de PCR anteriores como molde y cebadores de SEQ ID NO: 7 y 10. El fragmento de ADN obtenido se clonó de la misma manera que en el ejemplo 1-1. El vector preparado se designó pDZ-*guaB*-alt.

[Tabla 2]

SEQ ID NO.	Nombre del cebador	(Secuencia (5'-3'))
7	pDZ- <i>guaB</i> (a1t) -1	GCTCTAGACTACGACAACACGGTGCCTAA
8	pDZ- <i>guaB</i> (alt)-2	CACGATTTTCGGTCAATACGGGTCTTCTCCTTCGCAC
9	pDZ- <i>guaB</i> (alt)-3	AGGAGAAGACCCGTATTGACCGAAAATCGTGTCTTCT
10	pDZ- <i>guaB</i> (alt)-4	GCTCTAGAATCGACAAGCAAGCCTGCACG

El vector recombinante pDZ-*guaB*-alt se transformó en la cepa ATCC6872-*purA*(alt) preparada en el ejemplo 1-1 por electroporación, y luego las cepas en las que el vector se insertó en el cromosoma por recombinación homóloga se seleccionaron en un medio que contenía 25 mg/l de kanamicina. Las cepas primarias así seleccionadas se sometieron a un cruce secundario y, a continuación, las cepas seleccionadas se sometieron a secuenciación, con lo que se seleccionó una cepa final en la que se introdujo la mutación.

La cepa productora de IMP finalmente seleccionada, basada en *Corynebacterium stationis* ATCC6872 de tipo natural, se designó CJI9088.

## Ejemplo 1-3: Prueba de titulación de fermentación de CJ19088

Se dispensaron 2 ml de un medio de cultivo de semillas en tubos de ensayo de 18 mm de diámetro y se esterizaron en autoclave a presión. Se inocularon sendos ATCC6872 y CJ19088 y se incubaron a 30 °C durante 24 h con agitación para utilizarlos como cultivos semilla. Se dispensaron 29 ml de un medio de fermentación en matraces Erlenmeyer agitados de 250 ml y se esterizaron en autoclave bajo presión a 121 °C durante 15 min, y se inocularon 2 ml del cultivo semilla y se incubaron durante 3 días. Las condiciones de cultivo se ajustaron a una velocidad de rotación de 170 rpm, una temperatura de 30 °C y un pH de 7,5.

Después de completar el cultivo, la producción de IMP se midió por HPLC (SHIMAZDU LC20A), y los resultados de cultivo son como en la siguiente tabla 3. Los siguientes resultados sugieren que las cepas debilitadas por *purA* y *guaB* tienen productividad IMP.

[Tabla 3]

Cepa	IMP (g/l)
ATCC6872	0
CJ19088	0,52

- Medio de cultivo de semillas: glucosa al 1 %, peptona al 1 %, extracto de carne al 1 %, extracto de levadura al 1 %, cloruro de sodio al 0,25 %, 100 mg/l de adenina, 100 mg/l de guanina, pH 7,5

- Medio de fermentación: glutamato de sodio al 0,1 %, cloruro de amonio al 1 %, sulfato de magnesio al 1,2 %, cloruro de calcio al 0,01 %, 20 mg/l de sulfato de hierro, 20 mg/l de sulfato de manganeso, 20 mg/l de sulfato de zinc, 5 mg/l de sulfato de cobre, 23 mg/l de L-cisteína, 24 mg/l de alanina, 8 mg/l de ácido nicotínico, 45 pg/l de biotina, 5 mg/l de tiamina ácido clorhídrico, 30 mg/l de adenina, ácido fosfórico al 1,9 % (85 %), glucosa al 2,55 %, fructosa al 1,45 %.

### Ejemplo 2: Identificación de la variante mejorada fosforribosilpirofosfato amidotransferasa

Con el fin de mejorar la actividad de la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, que es la primera enzima en la vía biosintética de IMP, para la mejora de la productividad de IMP, se preparó una biblioteca mutante de *purF*, que es un gen que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, y se identificó una mutación que mejora la productividad de IMP.

#### Ejemplo 2-1: Preparación del vector que contiene *purF*

Para preparar una biblioteca de mutantes *purF*, primero se preparó un vector recombinante que contenía *purF*. Se realizó una PCR utilizando el ADN genómico de *Corynebacterium stationis* ATCC6872 como molde y los cebadores de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, y se clonó un producto de la PCR en el vector pCR2.1 de *E. coli* utilizando un kit de clonación TOPO (Invitrogen) para obtener pCR-*purF*.

[Tabla 4]

SEQ ID NO.	Nombre del cebador	(Secuencia (5'-3'))
11	<i>purF</i> tempF	AAGTTGATGCTTCAGGCACA
12	<i>purF</i> tempF	TGCAAGGATTGGCTCTTTGT

#### Ejemplo 2-2: Preparación de la biblioteca de mutantes *purF*

Se preparó una biblioteca de mutantes *purF* basada en el vector preparado en el ejemplo 2-1. La biblioteca se preparó utilizando un kit de PCR propenso a errores (clontech Diversify® PCR Random Mutagenesis Kit). En condiciones en las que pueden producirse mutaciones, se realizó la PCR utilizando los cebadores de SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14. Concretamente, en condiciones en las que pueden producirse de 0 a 3 mutaciones por 1000 pb, se realizó un precalentamiento a 94 °C durante 30 s, seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 30 s y 68 °C durante 1 min 30 s. Un producto de PCR así obtenido se sometió a PCR utilizando un megaprimer (500 ng a 125 ng) durante 25 ciclos de 95 °C durante 50 s, 60 °C durante 50 s y 68 °C durante 12 min, y después se trató con DpnI, y se transformó en *E. coli* DH5α y se extendió en un medio sólido LB que contenía kanamicina (25 mg/l). Se seleccionaron 20 tipos de colonias transformadas y, a continuación, se obtuvieron plásmidos, seguidos de un análisis de secuenciación. Como resultado, se confirmó que las mutaciones se introducían en distintos sitios con una frecuencia de 2 mutaciones/kb. Se tomaron aproximadamente 20.000 colonias de *E. coli* transformadas y se extrajeron de ellas plásmidos, que se designaron como biblioteca pTOPO-*purF*.

[Tabla 5]

SEQ ID NO.	Nombre del cebador	(Secuencia (5'-3'))
13	purF lib F	ACACGAGATAGCCCAGTGG
14	purF lib R	TCGTAGTTGCCATCAAAGCA

Ejemplo 2-3: Evaluación de la biblioteca preparada y selección de la cepa

La biblioteca pTOPO-purF preparada en el ejemplo 2-2 se transformó en la cepa CJ19088 preparada en el ejemplo 1 por electroporación, y luego se extendió en un medio nutritivo que contenía 25 mg/l de kanamicina para obtener 10.000 colonias en las que se insertó el gen mutante. Las colonias se designaron como CJ19088\_pPO\_purF(mt)1 a CJ19088\_pPO\_purF(mt)10000.

- Medio nutritivo: peptona al 1 %, extracto de carne al 1 %, cloruro de sodio al 0,25 %, extracto de levadura al 1 %, agar al 2 %, pH 7,2.

Cada una de las 10.000 colonias obtenidas se inoculó en 200 µl de un medio de cultivo semilla esterilizado en autoclave a presión, y se cultivó en una placa de 96 pocillos profundos con agitación a 30 °C y 1.200 rpm durante 24 h utilizando un agitador de microplacas (TAITEC), y después se utilizó como cultivo semilla. Se dispensaron 290 µl de medio de fermentación esterilizado en autoclave a presión en una placa de 96 pocillos profundos y se inocularon en ella 20 µl de cada uno de los cultivos de semillas, tras lo cual se procedió al cultivo con agitación en las mismas condiciones anteriores durante 72 h.

Para analizar la producción de ácido 5'-inosínico en el medio de cultivo, una vez finalizado el cultivo, se transfirieron 3 µl de sobrenadante del cultivo a una placa UV de 96 pocillos, cada uno de los cuales contenía 197 µl de agua destilada. A continuación, se utilizó un lector de microplacas para realizar la agitación durante 30 s y un espectrofotómetro para medir la densidad óptica a 25 °C y 270 nm y se comparó con la densidad óptica de la cepa CJ19088 para seleccionar 50 colonias de la cepa mutante que mostraran un aumento del 10 % o más en la densidad óptica. Otras colonias mostraron una densidad óptica similar o inferior a la del control.

Las densidades ópticas de las 50 cepas seleccionadas se midieron del mismo modo que en el caso anterior para examinar repetidamente las cantidades de producción de ácido 5'-inosínico. Se seleccionaron dos cepas CJ19088\_pTOPO\_purF(mt)201 y CJ19088\_pTOPO\_purF (mt)5674, que mostraron una notable mejora en la productividad del ácido 5'-inosínico en comparación con la cepa CJ19088.

Ejemplo 2-4: Identificación de mutación mediante secuenciación

Para identificar las mutaciones genéticas de las cepas mutantes, cada una de las cepas CJ19088\_pTOPO\_purF(mt)201 y CJ19088\_pTOPO\_guaB(mt)5674 se sometió a PCR utilizando cebadores de SEQ ID NO: 15 y 16, seguido de secuenciación. Sus genes *purF* se compararon con los de las cepas ATCC6872 y CJ19088 que contenían el gen *purF* de tipo natural.

Como resultado, se descubrió que ambas cepas incluían la mutación del gen *purF* en sitios diferentes.

En concreto, se confirmó que la cepa CJ19088\_pTOPO\_purF(mt)201 tiene una mutación de sustitución de metionina por valina en la posición 2 de la secuencia de aminoácidos *purF* representada por la SEQ ID NO: 2, y la cepa CJ19088\_pTOPO\_purF(mt)5674 tiene una mutación de sustitución de arginina por glicina en la posición 445 de la secuencia de aminoácidos *purF* representada por la SEQ ID NO: 2.

[Tabla 6]

SEQ ID NO.	Nombre del cebador	(Secuencia (5'-3'))
15	purF-seq-F	ACACGAGATAGCCCAGTGG
16	purF-seq-R	ACCAAGTCATCGACGCACATT

En los ejemplos 3 y 4 siguientes, se examinó si las mutaciones mencionadas afectaban a la producción de IMP del microorganismo del género *Corynebacterium*.

**Ejemplo 3: Examen de la productividad de IMP en CJ19088**

Las mutaciones identificadas en el ejemplo 2 se introdujeron en CJ19088, que es una cepa productora de IMP derivada de ATCC6872, y se examinó la productividad de IMP.

Ejemplo 3-1: Preparación del vector de inserción que contiene la mutación *purF*

Para introducir cepas con la mutación seleccionada en el ejemplo 2, se preparó un vector de inserción. Se prepara un vector para la introducción de la mutación *purF* de la siguiente manera.

La PCR se realizó utilizando el ADN genómico del ATCC6872 como molde y los cebadores de SEQ ID NO: 17 y 18 y SEQ ID NO: 19 y 20. La PCR se realizó por desnaturalización a 94 °C durante 5 min, y luego, durante 20 ciclos de a 94 °C durante 30 s, a 55 °C durante 30 s, a 72 °C durante 1 min, seguido de polimerización a 72 °C durante 5 min. La PCR se realizó utilizando cada uno de los fragmentos de ADN resultantes como molde y los cebadores de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 20. El fragmento de ADN resultante se digirió con XbaI. Usando ligasa T4, el fragmento de ADN se clonó en un vector pDZ lineal que se había digerido con la enzima de restricción XbaI y, por lo tanto, se preparó pDZ-*purF* (V2M). La PCR se realizó usando cebadores de SEQ ID NO: 21 y 22 y SEQ ID NO: 23 y 24 de la misma manera que anteriormente. La PCR se realizó utilizando cada uno de los fragmentos de ADN resultantes como molde y los cebadores de SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 24. El fragmento de ADN resultante se digirió con XbaI. Usando ligasa T4, el fragmento de ADN se clonó en un vector pDZ lineal que se había digerido con la enzima de restricción XbaI y, por lo tanto, se preparó pDZ-*purF*(G445R).

[Tabla 7]

SEQ ID NO.	Nombre del cebador	(Secuencia (5'-3'))
17	<i>purF</i> V2M 1F	GGGTCTAGAAGTACTGACCCGACCACTGCA
18	<i>purF</i> V2M 1R	TGGGGAAAGTAGTGTTTCATCACGACGC
19	<i>purF</i> V2M 1F	TAGTAGAATCAGCGTCGTGATGAACAC
20	<i>purF</i> V2M 2R	GGGTCTAGATGGATTCCTGCCTCATTGACA
21	<i>purF</i> G445R 1F	GGGTCTAGACCGATGGCAAGACCTTGTACG
22	<i>purF</i> G445R 1R	CAAACCCTAAAGAGTCTGCTCTGATAGCTTC
23	<i>purF</i> G445R 2F	CAGTGTGCGAAGCTATCAGAGCAGACTCTT
24	<i>purF</i> G445R 2R	GGGTCTAGACAAGGTCATCGATGTAGCCATCG

Ejemplo 3-2: Introducción del mutante en la cepa CJI9088 y evaluación

CJI9088 se transformó con cada uno de los vectores pDZ-*purF*(V2M) y pDZ-*purF*(G445R) preparados en el ejemplo 3-1, y las cepas en las que el vector se insertó en el cromosoma por recombinación homóloga se seleccionaron en un medio que contenía 25 mg/l de kanamicina. Las cepas primarias así seleccionadas se sometieron a un cruzamiento secundario para seleccionar cepas en las que se introdujo la mutación del gen diana. La introducción de la mutación genética en las cepas transformadas finales se examinó mediante PCR utilizando los cebadores de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, y después se realizó la secuenciación para confirmar la introducción de la mutación en las cepas. Específicamente, la cepa introducida con la mutación V2M del gen *purF* se designó como CJI9088\_*purF*\_m1, y la cepa introducida con la mutación G445R del gen *purF* se designó como CJI9088\_*purF*\_m2. Además, para preparar una cepa mutante que tuviera las mutaciones V2M y G445R, se transformó la cepa CJI9088\_*purF*\_m1 con el vector pDZ-*purF*(G445R), y se obtuvieron colonias de la misma manera que en el caso anterior. Mediante el análisis de secuenciación de las colonias obtenidas, se seleccionó una cepa introducida con las mutaciones V2M y G445R del gen *purF* y se designó como CJI9088\_*purF*\_m1m2.

Tal como se muestra en los resultados a continuación, la cepa CJI9088\_*purF*\_m1 o CJI9088\_*purF*\_m2 con la mutación V2M o la mutación G445R en el gen *purF* mostró una concentración de IMP de 0,15 g/l (128 %) o 0,09 g/l (117 %), respectivamente, lo que indica una mejora en comparación con la cepa CJI9088 de control. Además, la cepa CJI9088\_*purF*\_m1m2 con las mutaciones V2M y G445R mostró una mejora de la concentración de IMP de 0,31 g/l (159 %), lo que indica que cuando se incluyen las dos mutaciones, se puede obtener la mejora más eficaz en la concentración de IMP.

[Tabla 8]

Cepa	IMP (g/l)
CJI9088	0,52
CJI9088_ <i>purF</i> _m1	0,67
CJI9088_ <i>purF</i> _m2	0,61
CJI9088_ <i>purF</i> _m1m2	0,83

**Ejemplo 4: Examen de la productividad de IMP en la cepa productora de IMP derivada de ATCC6872**

Para examinar el efecto del mutante *purF* que se identificó en el ejemplo 2, basado en una cepa que produce una alta concentración de IMP, se introdujo el mutante en CJI0323 (n.º de registro KCCM12151P, n.º de patente coreana 10-1904675), que es una cepa que produce una alta concentración de IMP, y se examinó la productividad de IMP.

## Ejemplo 4-1: Introducción del mutante en la cepa CJI0323 y evaluación

CJI0323 se transformó con cada uno de los vectores pDZ-purF(V2M) y pDZ-purF(G445R) preparados en el ejemplo 3-1, y las cepas en las que el vector se insertó en el cromosoma por recombinación homóloga se seleccionaron en un medio que contenía 25 mg/l de kanamicina. Las cepas primarias así seleccionadas se sometieron a un cruzamiento secundario para seleccionar cepas en las que se introdujo la mutación del gen *diana*. La introducción de la mutación genética en las cepas transformadas finales se examinó mediante PCR utilizando los cebadores de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, y después se realizó la secuenciación para confirmar la introducción de la mutación en las cepas. Específicamente, la cepa introducida con la mutación V2M del gen *purF* se designó como CJI0323\_purF\_m1, y la cepa introducida con la mutación G445R del gen *purF* se designó como CJI0323\_purF\_m2. Además, para preparar una cepa mutante que tuviera las mutaciones V2M y G445R, se transformó la cepa CJI0323\_purF\_m1 con el vector pDZ-purF(G445R), y se obtuvieron colonias de la misma manera que en el caso anterior. Mediante el análisis de secuenciación de las colonias obtenidas, se seleccionó una cepa introducida con las mutaciones V2M y G445R del gen *purF* y se designó como CJI0323\_purF\_m1m2.

El CJI0323\_purF\_m1 fue denominado CJI2353, depositado en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos el 10 de septiembre de 2018, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest, y se le asignó el número de registro KCCM12316P. Además, el preparado CJI0323\_purF\_m2 se denominó CJI2354, se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos el 10 de septiembre de 2018, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest, y se le asignó el número de registro KCCM12317P.

Como se muestra en los resultados a continuación, la cepa CJI0323\_purF\_m1 o CJI0323\_purF\_m2 con la mutación V2M o la mutación G445R en el gen *purF* mostraron una concentración de IMP de 1,9 g/l (119 %) o 0,95 g/l (109 %), respectivamente, lo que indica una mejora en comparación con la cepa CJI0323 de control. Además, la cepa CJI0323\_purF\_m1m2 con las mutaciones V2M y G445R mostró una mejora de la concentración de IMP de 3,33 g/l (134 %), lo que indica que cuando se incluyen las dos mutaciones, se puede obtener la mejora más eficaz en la concentración de IMP.

[Tabla 9]

Cepa	IMP (g/l)
CJI0323	9,52
CJI0323_purF_m1	11,42
CJI0323_purF_m2	10,47
CJI0323_purF_m1m2	12,85

Ejemplo 5: Examen de la productividad del ácido 5'-xantílico del mutante *purF*

Para examinar el efecto del mutante *purF* que se identificó en el ejemplo 2, basado en una cepa productora de XMP, se introdujo el mutante en KCCM10530 (publicación de patente coreana n.º 10-2005-0056670), que es una cepa productora de una alta concentración de XMP, y se examinó la productividad de XMP.

## Ejemplo 5-1: Introducción del mutante en la cepa KCCM10530 y evaluación

KCCM10530 se transformó con cada uno de los vectores pDZ-purF(V2M) y pDZ-purF(G445R) preparados en el ejemplo 3-1, y las cepas en las que el vector se insertó en el cromosoma por recombinación homóloga se seleccionaron en un medio que contenía 25 mg/l de kanamicina. Las cepas primarias así seleccionadas se sometieron a un cruzamiento secundario para seleccionar cepas en las que se introdujo la mutación del gen *diana*. La introducción de la mutación genética en las cepas transformadas finales se examinó mediante PCR utilizando los cebadores de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, y después se realizó la secuenciación para confirmar la introducción de la mutación en las cepas. Específicamente, la cepa introducida con la mutación V2M del gen *purF* se designó como KCCM10530\_purF\_m1, y la cepa introducida con la mutación G445R del gen *purF* se designó como KCCM10530\_purF\_m2. Además, para preparar una cepa mutante que tuviera las mutaciones V2M y G445R, se transformó la cepa KCCM10530\_purF\_m1 con el vector pDZ-purF(G445R), y se obtuvieron colonias de la misma manera que en el caso anterior. Mediante el análisis de secuenciación de las colonias obtenidas, se seleccionó una cepa introducida con las mutaciones V2M y G445R del gen *purF* y se designó como KCCM10530\_purF\_m1m2.

El KCCM10530\_purF\_m1 fue denominado CJX1681, depositado en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos el 10 de septiembre de 2018, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest, y se le asignó el número de registro KCCM12312P. Además, el preparado KCCM10530\_purF\_m2 se denominó CJX1682, se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos el 10 de septiembre de 2018, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest, y se le asignó el número de registro KCCM12313P.

Tal como se muestra en los resultados a continuación, la cepa KCCM10530\_purF\_m1 o KCCM10530\_purF\_m2 con la mutación V2M o la mutación G445R en el gen *purF* mostraron una concentración de XMP de 1,77 g/l (115 %) o

0,8 g/l (107 %), respectivamente, lo que indica una mejora, en comparación con la cepa KCCM10530 de control. Además, la cepa KCCM10530\_purF\_m1m2 con las mutaciones V2M y G445R mostró una mejora de la concentración de XMP de 2,36 g/l (120 %), lo que indica que cuando se incluyen las dos mutaciones, se puede obtener la mejora más eficaz en la concentración de XMP.

5

[Tabla 10]

10

Cepa	IMP (g/l)
KCCM10530	11,8
KCCM10530_purF_m1	13,57
KCCM10530_purF_m2	12,68
KCCM10530_purF_m1m2	14,16

**REIVINDICACIONES**

1. Una fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, que comprende o bien;
- 5                    i) una metionina en la posición 2 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2,
- ii) una arginina en la posición 445 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o
- 10                   iii) una metionina en la posición 2 y una arginina en la posición 445 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2,
- en donde dicha fosforribosilpirofosfato amidotransferasa tiene al menos el 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y en donde dicha fosforribosilpirofosfato amidotransferasa que tiene dicha sustitución, o dichas sustituciones, tiene una mayor
- 15                   productividad de nucleótidos de purina que la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
2. Un polinucleótido que codifica la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa de la reivindicación 1.
- 20 3. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 2.
4. Un microorganismo del género *Corynebacterium* que produce un nucleótido de purina, en donde dicho microorganismo comprende la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa de la reivindicación 1.
- 25 5. El microorganismo según la reivindicación 4, en donde dicho microorganismo es *Corynebacterium stationis*.
6. Un método para preparar un nucleótido de purina, que comprende la etapa de cultivar el microorganismo de la reivindicación 4 en un medio.
- 30 7. El método según la reivindicación 6, que comprende además la etapa de recuperar el nucleótido de purina del microorganismo o del medio después de la etapa de cultivo.
8. El método según la reivindicación 6, en donde dicho microorganismo es *Corynebacterium stationis*.
- 35