



No. 11-147941- -00000-0000

Fecha: 2011-11-01 14:46:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 84

# Industria y Comercio

## SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

### PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N° \_\_\_\_\_

54. TÍTULO PRODUCCION DE HIDROCARBUROS DE ISOPRENO  
MEJORADA QUE USA CIANOBACTERIAS DISEÑADAS  
GENETICAMENTE.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 15/63

71. SOLICITANTE THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
CALIFORNIA.

DOMICILIO California, Estados Unidos de América

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. \_\_\_\_\_



No. 11-147941- -00000-0000

Fecha: 2011-11-01 14:46:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 84

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE**  
**PCT**  
**ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1

**SOLICITUD DE:**

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE**  
**(71)**

**Nombre:** THE REGENTS OF THE  
UNIVERSITY OF CALIFORNIA

**Dirección:** 1111 Franklin Street, 12th Floor,  
Oakland, California 94607-5200, Estados  
Unidos de América.

**Nacionalidad o domicilio:** California, Estados  
Unidos de América.

**Lugar de Constitución:** Estados Unidos de  
América.

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

**Número**

3

**REPRESENTANTE**  
**O APODERADO**  
**(74)**

**Nombre:** DILIA MARÍA RODRÍGUEZ  
D'ALEMAN

**Dirección:** Carrera 11 No. 86-53, piso 6

**Teléfono:** 6 181088 **Fax:** 6350824

**E-mail:** clarkemodet@clarkemodet.com.co

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

**Número** 41.654.882  
TP 20824 CSJ

4

**INVENTOR (ES)**  
**(72)**

**Nombre:** VER HOJA ANEXA

**Dirección:**

**Nacionalidad o domicilio:**

5

**PCT (86)**

**Solicitud Internacional No.** PCT/US2010/033240 **Fecha** 30 de abril de 2010

**Publicación Internacional No.** WO 2010/127290 A3 **Fecha** 04 de noviembre de 2010

6

**TÍTULO (54)** PRODUCCION DE HIDROCARBUROS DE ISOPRENO MEJORADA QUE  
USA CIANOBACTERIAS DISEÑADAS GENETICAMENTE.

7

**Clasificación Internacional (51)** C12N 15/63

8 **Prioridad**

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

(32) Fecha

01 de mayo de 2009

(31) Número de Solicitud

61/174.729

9

**Comprobante de pago No.** 11-102365 // 11-104922 // 11-104937 // 11-97825

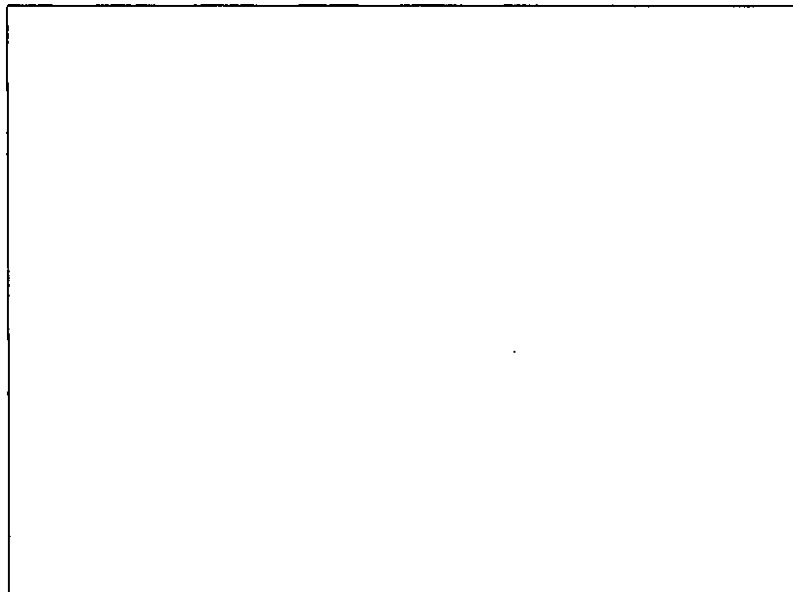
**Fecha** 19 de octubre de 2011 // 26 de octubre de 2011.

10

**ANEXOS**

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

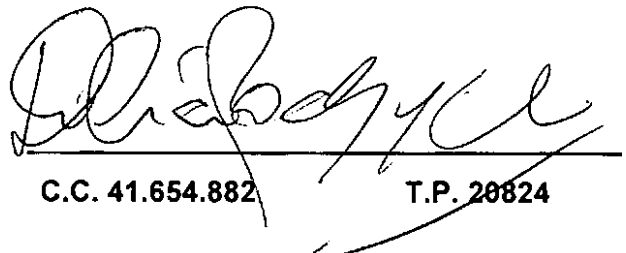
**11 FIGURA CARACTERÍSTICA**



**12 Solicito la concesión de la patente**

**NOMBRE :** DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

**FIRMA:**

  
C.C. 41.654.882 T.P. 20824

## ANEXOS

### INVENTORES

1. )

**MELIS, Anastasios**

(2745 Del Monte Avenue, El Cerrito, California 94530, Estados Unidos de América );

2. )

**LINDBERG, Pia**

( Gropgrand 3 SE, 75310 Uppsala, Suecia).

. 000002

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 102365

Bogotá D.C., Octubre 19 de 2011 - 16:52:33

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 427150172 | 19/10/2011 | 66.460.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                   | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-------------------------|--------------------------------------------|---------------|--------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN | 571.000.00    | 571.000.00   |
|       |                         |                                            |               | \$571.000.00 |

SON: \*\*QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-147941- -00000-0000

Fecha: 2011-11-01 14:46:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 84

000000.3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 104922

Bogotá D.C., Octubre 26 de 2011 - 16:37:02

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 427159961 | 26/10/2011 | 51.250.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                       | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-------------------------|------------------------------------------------|---------------|--------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 3 PROC. REGISTRO DE MARCAS Y LEMAS COMERCIALES | 728.000.00    | 728.000.00   |
|       |                         |                                                |               | \$728.000.00 |

SON: \*\*SETECIENTOS VEINTIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-147941- -00000-0000

Fecha: 2011-11-01 14:46:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 84

000004

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 26 de 2011 - 16:37:12

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 104937

Bogotá D.C., Octubre 26 de 2011 - 16:37:02

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 427159961 | 26/10/2011 | 51.250.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|---------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 50.000.00     | 50.000.00    |
|       |                                                     |                                    |               | \$50.000.00  |

SON: \*\*CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-147941- -00000-0000

Fecha: 2011-11-01 14:46:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 84

- 000005

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Octubre 26 de 2011 - 16:37:12

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0097825

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 16:44:47

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 325084605 | 05/10/2011 | 77.805.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|---------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 5.000.00      | 5.000.00     |
|       |                                                     |                                    |               | \$5.000.00   |

SON: \*\*CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

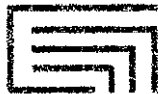
Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
No. 11-147941-00000-0000  
Fecha: 2011-11-01 14:46:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 84

000006

D-3141



Clarke, Modet & Co.

E-MAIL: clarkemo@colomsat.net.co  
SANTAFÉ DE BOGOTÁ, A.A. 92397  
COLOMBIA

P 758

## PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s) Julie Serracino

en mi (nuestro) caracter de representante(s) legales de  
**The Regents of the University of California**  
una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de  
**1111 Franklin Street, 12th Floor**  
**Oakland, California 94607-520 USA**  
y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Santa Fé de Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, variedades vegetales, marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistirse, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistirse a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 6) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 7) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

## POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned Julie Sarracino

legal representative(s) of THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

an organization existing under the laws of  
1111 Franklin Street, 12th Floor  
Oakland, California 94607-5200, US  
and in present execution of its business activity, domiciled at

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Santa Fé de Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, vegetal varieties, Marks, Signs, Trade Names and emblems of appellation of Origin, as well as their renewals, extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain, and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses, as well as their renewals or extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtention or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation, related object and waive or renounce the rights therein, process of granting, admit the facts of the case.
- 6) To ratify or not the officious agency.
- 7) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

A los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_  
de \_\_\_\_\_, el Notario que suscribe DA FE de  
que:

1. \_\_\_\_\_  
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado \_\_\_\_\_  
firmó de su puño  
y letra el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está  
legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en  
su carácter de \_\_\_\_\_  
de la persona jurídica \_\_\_\_\_

4. La citada persona jurídica con sede en \_\_\_\_\_  
está  
legalmente constituida, que tiene actualmente  
existencia legal y que el acto para el cual se ha  
otorgado este poder está comprendido entre los que  
constituyen su objeto social.

5. El otorgante tiene efectivamente la representación  
que ostenta, que esta es legítima y que está  
facultado para otorgar este poder.

6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me  
constan porque he tenido a la vista los  
documentos auténticos.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Consul de  
Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

### **CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)**

A los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_  
de \_\_\_\_\_, el Notario que suscribe DA FE de  
que:

1. \_\_\_\_\_  
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en \_\_\_\_\_  
firmó en su presencia  
el documento que antecede, conoce al otorgante  
y que este está legalmente capacitado para el  
otorgamiento.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Consul de  
Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Consul de  
Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una  
certificación dejando constancia 1) de la existencia  
legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente  
su objeto social, y 3) de que la persona o personas que  
otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando  
constancia así mismo de que tuvo a la vista los papeles  
que acrediten tales circunstancias.



This \_\_\_\_\_ day of \_\_\_\_\_  
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. \_\_\_\_\_  
(name of the person who signs the power of attorney)

of legal age and domiciled  
in \_\_\_\_\_  
set his hand on the foregoing document.

2. The grantor is to him personally known and that  
he/she has legal capacity to execute the document.

3. The grantor has executed the foregoing document  
in his capacity of \_\_\_\_\_  
of the juridical person \_\_\_\_\_

4. The mentioned juridical person with place of  
business in \_\_\_\_\_  
is duly organized, has actual legal existence, and that  
the purposes for which the power of attorney is granted  
are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in fact the referred quality and  
that his/her representation is legal and that he/she  
is empowered to grant this power of attorney.

6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on  
the authentic documents which for such purpose were  
exhibited to me.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the  
signature of the Notary Public.

### **NOTARIAL CERTIFICATE ( When the applicant is an INDIVIDUALS)**

On this \_\_\_\_\_ day of \_\_\_\_\_  
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. \_\_\_\_\_  
(name of the person who signs the Power of Attorney)

of legal age and domiciled at \_\_\_\_\_  
signed in his presence  
the foregoing document, the grantor is to him  
personally known and that he/she has legal capacity to  
execute the document.

Notary Public

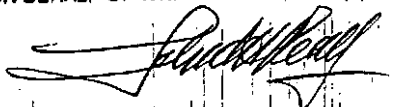
NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the  
signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consul or before  
who it is granted must issue a certification stating 1) the  
legal existence of the corporation, 2) that the corporate  
purposes are actually being accomplished, 3) that the  
person or persons who grant this Power of Attorney are  
empowered to do it. The Consul will certify also that the  
documents evidencing those circumstances were  
exhibited to him.



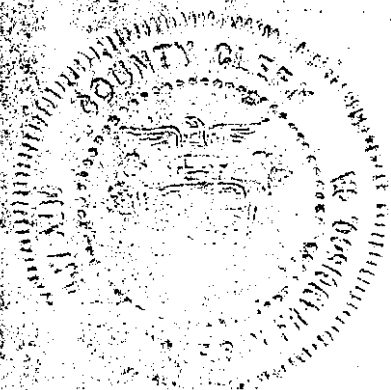
ON DECEMBER 14 1999 BEFORE ME LELAND H. PERRY  
THE UNDERSIGNED NOTARY PUBLIC, PERSONALLY APPEARED  
JULIE SARRACINO

PERSONALLY KNOWN TO ME (OR PROVED TO ME ON THE BASIS OF SATISFACTORY EVIDENCE) TO BE THE PERSON(S) WHOSE NAME(S) IS/ARE SUBSCRIBED TO THE WITHIN INSTRUMENT AND ACKNOWLEDGED TO ME THAT HE/SHE/ THEY EXECUTED THE SAME IN HIS/HER/THEIR AUTHORIZED CAPACITY(IES) AND THAT BY HIS/HER/THEIR SIGNATURE(S) ON THE INSTRUMENT THE PERSON(S) OR THE ENTITY UPON BEHALF OF WHICH THE PERSON(S) ACTED, EXECUTED THE INSTRUMENT.

WITNESS MY HAND 

AND OFFICIAL SEAL

State of California  
City and County of San Francisco



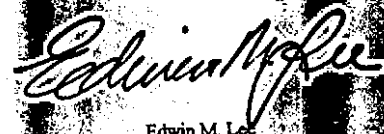
I, Edwin M. Lee, Acting County Clerk in and for the City and County of San Francisco, DO HEREBY CERTIFY: That

LELAND H. PERRY

whose name is subscribed to the attached certificate of acknowledgment, proof or affidavit, was at the time of taking said acknowledgment, proof or affidavit, a Notary Public in and for the City and County of San Francisco, duly commissioned and sworn in said City and County, and was as such, an officer of said State, duly authorized by the laws thereof to take and certify the same, as well as to take and certify the proof and acknowledgment of deeds and other instruments in writing to be recorded in said State, and that full faith and credit are and ought to be given to his or her official acts; that the certificate of such officer is required to be under seal; that the impression of his or her official seal is not required by law to be on file in the office of the County Clerk. I further certify that I am well acquainted with the handwriting of said notary and verily believe that the signature to the attached certificate is genuine, and further that the annexed instrument is executed and acknowledged according to the laws of the State of California.

In witness whereof, I have hereunto set my hand and annexed the seal of the County Clerk, in and for the City and County of San Francisco.

Dated: DEC 14 1999



Edwin M. Lee  
Acting County Clerk

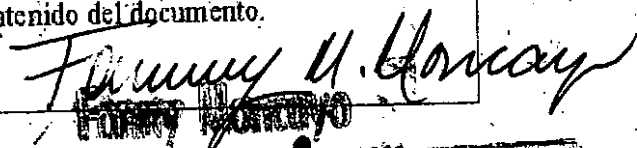


3419

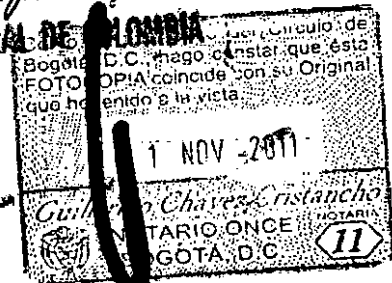


CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA  
San Francisco, California

Fecha 15 DE DICIEMBRE DE 1999 No. 3823  
El suscrito Consul General de Colombia CERTIFICA que EDWIN M. LEE quien autoriza el presente documento, ejercia legalmente, en la fecha alli expresada, las funciones de SUPERVISOR DE NOTARIOS DE SAN FRANCISCO, CALIFORNIA y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales. El Consulado no asume reponsabilidad alguna por el contenido del documento.



CONSUL GENERAL DE COLOMBIA



PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE  
Y DERECHOS CONSULARES

US \$ 22.-

000008

u. Saracino

COPIA  
DE  
FOLIO 10  
DE 10



COPIA  
DE  
FOLIO 10  
DE 10  
01 NOV 2011  
C. Saracino

JEFE DE LEGALIZACIONES

1999 DEC 27 12:23

RESPONSABILIDAD DEL TEXTO  
NO SE APLICA

MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES

433709

# NOTORIAL CERTIFICATE

I, Julie Sarracino, have the legal capacity to sign all documents related to the filing and prosecution of United States and Foreign utility and design Patent Applications on behalf of The Regents of the University of California, a corporation duly organized and existing under the laws of the State of California, whose home office is located in Oakland, California, USA.

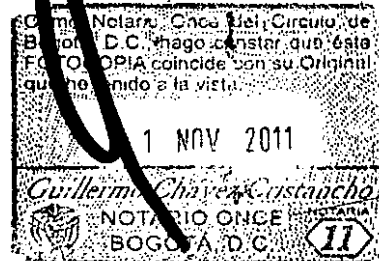
I, Julie Sarracino, am authorized to sign all documents in the name of said corporation and that the purposes for which said instrument is granted are within the scope of the object or activities of said corporation.

The foregoing is based on a letter dated March 17, 1999 from J. Michael Bishop, M.D., Chancellor of The Regents of the University of California, and an Attestation dated June 2, 1999 from Joel Kirschbaum, Interim Director of the Office of Technology Management of The Regents of the University of California.

Signed:

*Julie Sarracino*

Dated: 10/14/99



ESTO DE TARE  
CHOS CONSULARES  
LA fech  
NOT  
y sello  
acostum  
reponsab

000000

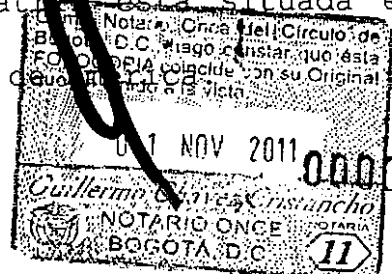
TRADUCCION OFICIAL No.1033/99.-

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS, Y LLEVA EL SELLO Y LA FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGÚN RESOLUCION No. 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972.

TRADUCCION DE LOS SELLOS QUE APARECEN EN EL PODER OTORGADO POR JULIE SARRACINO, REPRESENTANTE LEGAL DE THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, UNA SOCIEDAD QUE EXISTE BAJO LAS LEYES DE CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, DOMICILIADA EN EL 1111 FRANKLIN STREET, PISO 12, OAKLAND, CALIFORNIA 94607-5200, ESTADOS UNIDOS, A LAS DOCTORAS DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, OTORGADO Y FIRMADO EN SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, EL 14 DE DICIEMBRE DE 1999.  
FIRMADO: JULIE SARRACINO, GERENTE COMERCIAL

CERTIFICADO NOTARIAL

Yo, Julie Sarracino, tengo la condición legal para firmar todos los documentos relacionados con la radicación y obtención de Solicitudes de Patente de utilidad y diseño de los Estados Unidos y Extranjeras a nombre de The Regents of the University of California, una sociedad debidamente organizada y existente bajo las leyes del Estado de California, cuya casa matriz está situada en Oakland, California, Estados Unidos



000010

TRADUCCION OFICIAL No.1033/99.-

Yo, Julie Sarracino, estoy autorizada para firmar todos los documentos a nombre de dicha sociedad y los fines para los cuales se otorga dicho instrumento están dentro del alcance del objeto o actividades de la mencionada sociedad.

Lo anterior está basado en una carta de fecha 17 de marzo de 1999 de J. Michael Bishop, M.D., Canciller de The Regents of the University of California y en una autenticación de fecha junio 2 de 1999 de Joel Kirschbaum, Director Interino de la Oficina de Administración Tecnológica de The Regents of the University of California.

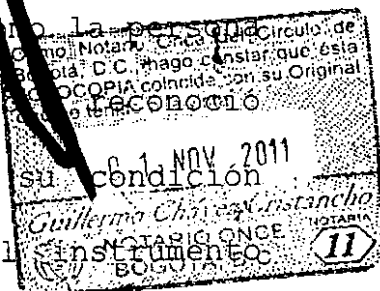
FIRMADO POR: JULIE SARRACINO FECHA: 12/14/99

-----

ESTADO DE CALIFORNIA - CIUDAD Y CONDADO DE SAN FRANCISCO

AUTENTICACION PARA PROPOSITOS GENERALES

El 14 de diciembre de 1999, ante mi Leland H. Perry, el suscrito Notario Público, compareció personalmente JULIE SARRACINO a quien conozco personalmente (o quien me probó sobre la base de evidencia satisfactoria) como la persona cuyo nombre suscribe el anterior instrumento, y la reconocí ante mi que ella suscribió el mismo en su condición autorizada y que mediante su firma en el instrumento.



TRADUCCION OFICIAL No.1033/99.-

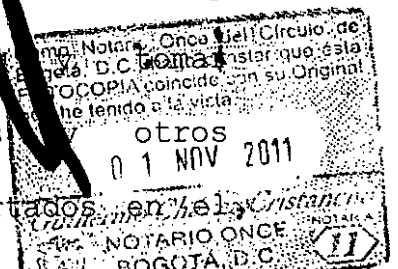
mencionado la persona o entidad en cuyo nombre actuó la persona, suscribió el instrumento.

EN EVIDENCIA DE LO CUAL, pongo mi firma y sello oficial.

FIRMADO Y SELLADO POR: LELAND H. PERRY, NOTARIO PUBLICO  
- CALIFORNIA, CONDADO DE SAN FRANCISCO. COMISION #  
1124932, EXPIRA EL 13 DE MARZO DEL 2001.

-----  
ESTADO DE CALIFORNIA - CIUDAD Y CONDADO DE SAN FRANCISCO

Yo, Edwin M. Lee, Funcionario del Condado Encargado en y para la Ciudad y Condado de San Francisco, POR EL PRESENTE CERTIFICO que LELAND H. PERRY, cuyo nombre suscribe el certificado de autenticación, prueba, o declaración juramentada del instrumento anexo, era en el momento de tomar dicha autenticación, prueba, o declaración juramentada, Notario Público en y para la ciudad y Condado de San Francisco, debidamente, comisionado y juramentado, en dicha ciudad y condado y como tal estaba un funcionario de dicho estado debidamente autorizado por las leyes de dicho Estado, para tomar y certificar el mismo, así como hacer autenticaciones y pruebas de escrituras instrumentos por escrito que deban ser reportados en el mencionado estado y que a sus actos oficiales



000012

TRADUCCION OFICIAL No.1033/99.-

dárseles plena fe y credibilidad; que el certificado de dicho funcionario se requiere que sea expedido bajo su sello; que no se requiere por ley que la impresión de su sello oficial esté registrado en este despacho. Certifico además que estoy familiarizado con la letra del mencionado Notario Público y creo fielmente que la firma que aparece en el certificado adjunto es auténtica y además que el instrumento adjunto está suscrito y autenticado de conformidad con las leyes del Estado de California.

EN EVIDENCIA DE LO CUAL, he puesto mi firma y el sello del Funcionario del Condado en y para la Ciudad y Condado de San Francisco.

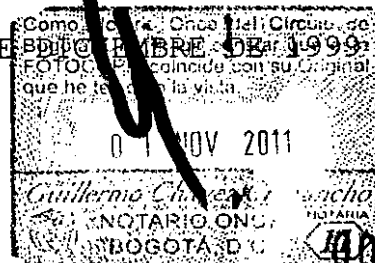
Fecha: Diciembre 14 de 1999.

FIRMADO POR: EDWIN M. LEE. HAY SELLO EN RELIEVE DEL FUNCIONARIO DEL CONDADO Y LA CIUDAD DE SAN FRANCISCO.

-----  
SIGUE AUTENTICACION DE LA FIRMA QUE PRECEDE POR EL CONSULADO DE COLOMBIA EN SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, BAJO EL NUMERO 3823 Y AUTENTICACION DE LA FIRMA DEL CONSUL POR EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA EN BOGOTA, BAJO EL NUMERO 433709 DEL 27 DE DICIEMBRE DE 1999.

-----  
LA TRADUCTORA OFICIAL

*Alma Lila de la Cruz*



0013

RESUMEN  
DE RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1999 DIC 29 A 11:55

OFICINA DE RELACIONES  
SANTAFÉ DE BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES

347017

HFCMA VR1138

FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPENA  
FIRMES INDICADAS



RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos y composiciones para la producción de hidrocarburos de isopreno de  
5 cianobacterias.

10

15

000014

**PRODUCCION DE HIDROCARBUROS DE ISOPRENO MEJORADA QUE USA**  
**CYANOBACTERIAS DISEÑADAS GENETICAMENTE**

**REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

5

Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud provisional No. 61/174,729, presentada el 1 de mayo, 2009 cuya aplicación se incorpora aquí para referencia.

10 **ESTABLECIMIENTO CONFORME LOS DERECHOS A INVENCIONES HECHAS BAJO**  
**INVESTIGACION Y DESARROLLO PATROCINADO FEDERALMENTE**

No aplicable

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Formación de isopreno en plantas es debido a la presencia de un gen de isopreno sintasa (IspS) (Miller et al, Planta 213: 483-487, 2001), un gen nuclear que codifica para una proteína de cloroplasto localizada que cataliza la conversión de uno de los productos de la trayectoria MEP, difosfato de dimetilalilo (DMAPP), a isopreno (Lichtenthaler, Biochem Soc Trans 28: 785 - 789, 2000). Isopreno sintasas de planta codificada por el gen IspS, se han clonado y caracterizado de álamo (Populus alba, Populus tremuloides) (Miller et al 2001, supra, Sasaki et al, FEBS Lett 579: 2514-2518, 2005; Sharkey et. al, Plant Physiol 137: 700-712, 2005) y vid kudzu (Pueraria montana) (Sharkey et al, 2005). Isopreno es una pequeña molécula hidrófoba y volátil que puede ir fácilmente a través de las membranas celulares y por lo tanto se emiten a partir de las

000015

hojas en la atmósfera. El proceso de inducción de estrés térmico y emisión de tales hidrocarburos volátiles de cadena corta por las plantas se ha discutido como contaminación no deseable de la atmósfera en la literatura (Sharkey et al, Ann Bot (Lond) 101: 5-18, 2008). Se ha mostrado que la producción de isopreno y liberación puede funcionar como un mecanismo protector para la planta a través de la cual aumenta la tolerancia termo (Sasaki et al, Plant Cell Physiol 48: 1254-1262, 2007; Sharkey et al, Plant Physiol 125: 2001-2006, 2001; Singaas et al, Plant Physiol 115: 1413-1420, 1997). También se ha descrito que hidrocarburos volátiles se pueden producir utilizando microalgas, cianobacterias, o bacterias que se han diseñado para expresar los genes de IspS (WO 2008/003078).

Las cianobacterias expresan la vía MEP. Las correspondientes enzimas están involucradas en la biosíntesis de una variedad de moléculas (por ejemplo, carotenoides, tocoferoles, fitol, esteroides, hormonas, entre muchas otras). Sin embargo, a diferencia de ciertas herbáceas, plantas de hojas caducas y coníferas, cianobacterias no tienen la isopreno sintasa.

La ruta de biosíntesis de isoprenoides MEP en las bacterias normalmente utiliza piruvato y gliceraldehído-3-fosfato como sustratos, que se combinan para formar deoxixilulosa-5-fosfato (DXP). DXP entonces se convierte en metil-eritritol fosfato (MEP), que posteriormente se modifica para formar hidroxil-2-metil-2-butenilo-4-difosfato (HMBPP). HMBPP es el sustrato necesario para la formación de IPP y DMAPP como la etapa final en esta vía biosintética (Figura 1). Las cianobacterias también contienen una isomerasa IPP que cataliza la interconversión de IPP y DMAPP (Barkley et al, J Bacteriol 186: 8156 a 8158, 2004; Poliquin et al, J Bacteriol 186: 4685-4693, 2004).

000016

Inactivación genética del gen IPP isomerasa resulta en el deterioro de la biosíntesis de isoprenoides a partir de sustratos de fotosintéticos (Poliquin et al., 2004, supra).

Los estudios previos con *Synechocystis* sp. PCC 6803 han demostrado que, bajo condiciones de crecimiento fotosintético, sustrato para la vía MEP en las cianobacterias no puede derivar de piruvato y G3P. Por el contrario, los sustratos procedentes del ciclo de pentosa fosfato puede entrar en la vía en los pasos posteriores de MEP (Ershov et al, J Bacteriol 184: 5045-5051, 2002; Poliquin et al 2004, supra) (Figura 1), proporcionando un enlace más directo entre la fotosíntesis de productos y la ruta biosintética isoprenoide. Además, se ha demostrado que, en la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, la reacción catalizada por GcpE, y Fe-S que contiene la enzima responsable de la formación de HMBPP, es dependiente de la reducción por la ferredoxina para su actividad (Okada y Hase, J Biol Chem 280: 20672-20679, 2005) (Figura 1), proporcionando un nuevo enlace directo entre la fotosíntesis y la vía de biosíntesis isoprenoide.

Esta invención se basa en, en parte, en el descubrimiento de los ácidos nucleicos y los sistemas de expresión que proporcionan la producción de hidrocarburos de cadena corta usando cianobacterias diseñadas genéticamente, por ejemplo, *Synechocystis* sp. PCC6803, para generar nuevas cepas mejoradas capaces de producción de isopreno ( $C_5H_8$ ). Dichas cianobacterias genéticamente modificadas se pueden utilizar comercialmente en un sistema cerrado la cultivo de masas, por ejemplo, (foto)biorreactores, para proporcionar una fuente de combustible renovable para motores de combustión interna, o, en reformación a bordo, en los motores operados con celda de combustible, o para proporcionar una fuente de isopreno para su uso en otros procedimientos químicos, tales como la síntesis química.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de mejoras de la ingeniería de las cianobacterias que, en  
5 modificación adecuada, producen 5-carbono isoprenoides. En un aspecto, por lo tanto, la invención proporciona métodos y composiciones para la producción y la cosecha de isopreno de cianobacterias. Tales organismos genéticamente modificados se pueden utilizar comercialmente en un sistema de cultivo de masa  
10 cerrado, por ejemplo, para proporcionar una fuente de combustible renovable para motores de combustión interna, o, en reformación en bordo, en motores operados con celdas de combustible; o para proporcionar una fuente de isopreno para usos en otros procesos químicos, tales como la síntesis química.

15 Cianobacterias no poseen una isopreno sintasa, que cataliza el último paso cometido en formación de isopreno ( $C_5H_8$ ). Por lo tanto, esta invención proporciona métodos y composiciones para modificar genéticamente microorganismos para expresar un gen de isopreno sintasa, por ejemplo, un gen de isopreno sintasa  
20 kudzu ajustado a codón, a fin de producir isopreno ( $C_5H_8$ ) en cianobacterias.

En un aspecto, la invención proporciona un método de producción de hidrocarburos de isopreno en cianobacterias, el método que comprende: la introducción de un cartucho de expresión  
25 que comprende un ácido nucleico que codifica la isopreno sintasa en las cianobacterias, en donde el ácido nucleico que codifica isopreno sintasa está operativamente enlazado a un promotor PsbA2 u otro promotor adecuado, y cultiva las cianobacterias bajo condiciones en donde el ácido nucleico que codifica la isopreno  
30 sintasa se expresa. En algunas modalidades, el cartucho de

000018

expresión se introduce en el locus del gen PsbA2 y el promotor PsbA2 es el promotor de cianobacterias nativas. En algunas modalidades, las cianobacterias son cianobacterias unicelulares, por ejemplo, una *Synechocystis* sp o *Synechococcus* sp. En 5 modalidades alternativas, las cianobacterias son multicelulares, por ejemplo, una *Gloeocapsa* sp. Las cianobacterias multicelulares pueden ser cianobacterias filamentosas sp. tal como una *Nostoc* sp, una *Anabaena* sp, o una sp *Arthrospira*. En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica una isopreno sintasa que tiene al 10 menos 55%, 60%, 70%, 75% o 80% de identidad de secuencia, frecuentemente al menos 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia, para SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica una isopreno sintasa que comprende los aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica 15 *IspS* es el codón-ajustado para la expresión en cianobacterias, por ejemplo, en algunas modalidades, el ácido nucleico es una variante codón-ajustado de SEQ ID NO: 1, donde los codones utilizados con una frecuencia promedio de menos de 12 % en *Synechocystis* se sustituyen por los codones utilizados con más 20 frecuencia. En algunas modalidades, el ácido nucleico de isopreno sintasa comprende SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad, por lo general al menos 85% de identidad o 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad para SEQ ID NO: 3.

En otros aspectos, la invención proporciona una célula 25 de cianobacterias, en donde la célula de cianobacterias comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica la isopreno sintasa y se enlaza operativamente a un promotor PsbA2. En algunas modalidades, las cianobacterias son cianobacterias unicelulares, por ejemplo, una *Synechocystis* sp o una *Synechococcus* sp. En 30 modalidades alternativas, las cianobacterias son cianobacterias

000019

multicelulares, por ejemplo, una *Gloeocapsa* sp. En algunas modalidades, las cianobacterias multicelulares sp son unas cianobacterias filamentosas sp. tales como *Nostoc* sp, una *Anabaena* sp, o una *Arthrospira* sp. En algunas modalidades, el

5 ácido nucleico heterólogo codifica una isopreno sintasa que tiene al menos 55%, 60%, 70%, 75% o 80% de identidad de secuencia, frecuentemente al menos 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia, para SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, la célula de cianobacterias comprende un ácido nucleico heterólogo que

10 codifica una isopreno sintasa que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, el ácido nucleico heterólogo introducido en la célula de cianobacterias que codifica IspS es el codón-ajustado para la expresión en cianobacterias, por ejemplo, en algunas modalidades, el ácido nucleico es una

15 variante codón-ajustado de SEQ ID NO: 1, donde los codones utilizados con un frecuencia promedio de menos de 12% en *Synechocystis* se sustituyen por los codones utilizados con más frecuencia. En algunas modalidades, el ácido nucleico de isopreno sintasa comprende SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene al

20 menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad para SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de hidrocarburos de isopreno en las cianobacterias como se describe en este documento que expresan un gen de

25 isopreno sintasa, en donde el método comprende cianobacterias que cultivan masa como se describe anteriormente en las condiciones en que se expresa el gen de isopreno sintasa, por ejemplo, de altas condiciones de luz, (por ejemplo 500 - 2000  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y recolecta el isopreno volátil producido por las

30 cianobacterias.

. 000020

En un aspecto adicional, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica una isopreno sintasa que comprende el aminoácido SEQ ID NO: 2, donde el ácido nucleico es una variante codón-ajustado de SEQ ID NO: 1, donde los codones utilizados con una frecuencia promedio es de menos de 12% para *Synechocystis* se reemplazan por los codones utilizados con más frecuencia. En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad para SEQ ID NO: 3. La invención proporciona, además, vectores que comprenden el ácido nucleico y las células huésped de cianobacterias en las que el ácido nucleico ha sido introducido.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

15

Figura 1 vía MEP para la biosíntesis de isopreno. Compuestos: G3P gliceraldehído 3-fosfato; DXP deoxixilulosa 5-fosfato, MEP = metileritritol 4-fosfato, CDP-ME = difosfocitidililo metileritritol, CDP-MEP = CDP-ME 2-fosfato, ME-cPP = metileritritol 2,4-ciclodifosfato; HMBPP = difosfato de hidroximetilbutenilo; IPP = difosfato de isopentenilo; DMAPP = dimetilalil difosfato. Enzimas: Dxs = DXP sintasa; Dxr = DXP reductoisomerasa; IspD = CDP-ME-sintasa, IspE = CDP-ME-quinasa; IspF = ME-cPP sintasa; GcpE (IspG) HMBPP sintasa, Fd = ferredoxina; IspH = HMBPP reductasa; Ipi = IPP isomerasa; IspS = isopreno sintasa. Los nombres ORF correspondientes en la base de datos del genoma de *Synechocystis* (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/> (Kaneko y Tabata, Plant Cell Physiol 38: 1171-117, 1997)) se proporcionan en paréntesis, cuando sea aplicable. La vía consume equivalentes de reducción y

- 000021

energía en forma de NADPH, ferredoxina reducida, CTP y ATP, en última instancia, derivados de la fotosíntesis. (Véase también Ershov et al, J Bacteriol 184: 5045-5051, 2002; Sharkey et al 2008, supra).

Figura 2 perfil SDS-PAGE de extracto de *E. coli* de célula completa de proteínas, aisladas de células no inducidas (línea 1) e inducidas (línea 2). La proteína IspS en las células inducidas (línea 2), es visible como un polipéptido 65 kD pronunciado.

Figura 3 Codón usa ajuste para el gen IspS. Gráficas de frecuencia de codones usados para cada posición en los genes klspS y SklspS comparados con un codón que usa tabla derivado de una secuencia del genoma de *Synechocystis*. El 12% de la frecuencia de corte utilizado en el ajuste del gen se muestra como una línea horizontal. Eje Y se grafica como el log de la frecuencia de codones utilizados con el fin de enfatizar la diferencia entre las dos secuencias en relación con el uso de codones raros.

Figura 4 Constructos de plásmidos para la transformación de *Synechocystis*. Las dos versiones del gen de isopreno sintasa, klspS y SklspS, son cada uno clonado en un plásmido basado en pBluescript, que también contiene las secuencias de flanqueo del gen psbA2 y un cartucho de resistencia a los antibióticos, por doble recombinación homóloga (inserción) en el genoma de *Synechocystis*. Los sitios de restricción utilizados para la clonación se indican, npt = gen de neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a la canamicina, bla = gen  $\beta$ -lactamasa, que confiere resistencia a la ampicilina.

Figura 5 los mapas genéticos y Southern blots de tipo silvestre y los transformantes IspS. (a) Mapa del locus

000022

*Synechocystis* psbA2, con genes *klspS* y *SklspsS* insertados, en comparación con el tipo silvestre. Los sitios de restricción de *XbaI* (X), *NdeI* (N), y *SacI* (S) se indican. Barras en cada mapa muestran tamaños esperados de los fragmentos de restricción detectado en Southern blots usando la sonda de región *psbA2* corriente arriba ("sonda"), (b) Southern blot de los transformantes *klspS* y *Synechocystis* de tipo silvestre. Panel izquierdo: restricción por *XbaI* y *SacI*. Panel derecho: restricción de *XbaI* y *NdeI*. Línea 1: tipo silvestre, línea 2: kI-6, línea 2: kI-14, línea 3: kl-17. (c) Southern blot en transformantes *SklspsS* y *Synechocystis* de tipo silvestre. Panel izquierdo: restricción *XbaI* y *SacI*. Panel derecho: restricción de *XbaI* y *NdeI*. Línea 1: tipo silvestre, línea 2: kI-6, línea 2: kI-14, línea 3: kl-17.

Figura 6 resultados RT-PCR que muestran la transcripción de *klspS* y *SklspsS* en cepas transformadas de *Synechocystis*. (a) transcripción de *klspS*. Líneas son: M: marcadores moleculares de tamaño; + RT: RT-PCR utilizando ARN de cepa 6 de *klspS* como plantilla para la transcripción inversa, -RT: como con +RT pero sin la adición de enzima RT en la reacción; ADN: control positivo para el PCR utilizando ADN genómico de la cepa 6 de *klspS* como plantilla; ADN dH<sub>2</sub>O: control negativo de PCR utilizando el agua como plantilla, peso del ADN: control negativo de PCR utilizando ADN genómico de *Synechocystis* de tipo silvestre como plantilla, (b) la transcripción de *SklspsS*. Líneas son: + RT: RT-PCR utilizando ARN de cepa *SklspsS* 1.2 como plantilla para la transcripción inversa, -RT-: al igual que con +RT pero sin la adición de la enzima RT en la reacción; ADN: control positivo para la PCR utilizando ADN genómico de cepa 1.2 *SklspsS* como plantilla, peso de ADN: control negativo de PCR utilizando ADN

000023

genómico de *Synechocystis* de tipo silvestre como plantilla; dH<sub>2</sub>O: control negativo para PCR utilizando el agua como plantilla; M: marcadores de tamaño molecular.

Figura 7 Análisis Western blot que muestra la expresión de la proteína klspS en cepas transformadas de *Synechocystis*. (a) Panel superior: análisis de Western blot, con anticuerpos klspS-específicos policlonales. Línea 1: peso de *Synechocystis*, líneas 2-4: tres líneas diferentes de transformantes *Synechocystis* que expresan klspS, línea 5-7: tres líneas diferentes de transformantes *Synechocystis* que expresan SklspS. Panel inferior: perfil SDS-PAGE teñido con Coomassie de proteínas correspondientes a Western blot anterior, se muestra como un control de la carga de proteínas iguales. 20 µg de proteína se carga en cada línea, (b) análisis Western blot que muestra inducción de expresión de SklspS en respuesta al tratamiento de alta luz de *Synechocystis*. Panel superior: análisis Western blot con anticuerpos específicos policlonales klspS. Línea 1: peso *Synechocystis*; líneas de 0.5-6h, transformante de *Synechocystis* que expresan SklspS: las muestras tomadas en t = 0 a t = 6 h después de un cambio del cultivo de luz baja (10 µmol de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) a alta (500 µmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) luz. Panel medio: las mismas muestras que en el panel superior, probadas con anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína AtpA, que se utiliza como un control para mostrar la expresión estable independiente del cambio en el régimen de la luz. Panel inferior: perfil SDS-PAGE teñido con Coomassie de proteínas correspondientes a Western blots anteriores, muestran como un control de carga de proteínas iguales. 20 µg de proteína se cargan en cada línea.

Figura 8 mediciones de la producción de isopreno. Un

000024

ejemplo de muestras de gas de las mediciones de GC se muestra. Panel izquierdo: perfil de GC de una muestra de la fase gaseosa por encima de un cultivo de tipo silvestre *Synechocystis*. Panel derecho: perfil de GC de una muestra de la fase gaseosa anterior del cultivo transformante *Synechocystis* que expresan KispS. El pico de isopreno se muestra con un tiempo de elución de alrededor de 4-5 minutos.

Figura 9 alineación de secuencias de proteínas IspS (SEQ ID NOS: 17-20).

10

### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

#### Definiciones

Un "hidrocarburo de isopreno volátil" en el contexto de la presente invención se refiere a un isoprenoide de cadena corta, de 5 carbonos por ejemplo, isopreno.

Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan como sinónimos y se refieren a un solo polímero o de doble cadena de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídos de los extremos 5' y 3'. Un ácido nucleico de la presente invención generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, análogos de ácidos nucleicos se pueden utilizar como que tienen cadenas principales alternas, que comprenden por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, o O-metilfosforamidita (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press); y cadenas principales de ácidos nucleico de péptido y enlaces. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales positiva, cadenas principales no iónicas, y cadenas principales de no ribosa. Por lo tanto, ácidos nucleicos o

. 000025

polinucleótidos también puede incluir nucleótidos modificados, que permiten la correcta lectura a través de una polimerasa. "Secuencia de polinucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" incluye tanto las cadenas sentido y antisentido de un ácido nucleico, ya sea como una sola cadena individual o en un dúplex. Como será apreciado por aquellos en la técnica, la descripción de una cadena sencilla también define la secuencia de la cadena complementaria, por lo que las secuencias descritas en este documento también proporcionan el complemento de la secuencia. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también, implícitamente, incluye sus variantes (por ejemplo, sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico y ADNc, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo- y ribo- nucleótidos, y combinaciones de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocytosina, isoguanina, etc.

La frase "codificación de secuencia de ácido nucleico" se refiere a un ácido nucleico que contiene información de secuencia de un ARN estructural, o la secuencia primaria de aminoácidos de una proteína específica o un péptido, o un sitio de unión para un agente regulador de trans-acción. Esta frase específicamente incluye codones degenerados (es decir, diferentes codones que codifican un solo aminoácido) de la secuencia nativa o secuencias que se pueden introducir para cumplir con la preferencia de codón en una célula huésped específica. En el contexto de esta invención, el término "región de codificación de IspS" cuando se utiliza con referencia a una secuencia de ácido

nucleico de referencia tales como SEQ ID NO: 1 o 3 se refiere a la región del ácido nucleico que codifica la proteína IspS.

Un "gen" de IspS en el contexto de esta invención se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína de IspS, o su fragmento. Así, dicho gen a menudo es una secuencia de ADNc que codifica lspS. En otras modalidades, un gen de IspS puede incluir secuencias, tales como intrones, que no están presentes en un ADNc.

El término "promotor" o "elemento regulador" se refiere a una región o determinantes de secuencia situada corriente arriba o corriente abajo del inicio de la transcripción que dirige la transcripción. Como se usa aquí, un promotor incluye secuencias de ácidos nucleicos necesarios cerca del lugar de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor tipo II de polimerasa, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos distales, que pueden ser localizados hasta varios miles de pares de base del sitio de inicio de transcripción. A promotor "constitutivo" es un promotor que se activa bajo condiciones más ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo en la regulación ambiental o de desarrollo. El término "enlazado operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia control de expresión de ácido nucleico (tal como un promotor) y una segunda secuencia de ácido nucleico, tal como un gen IspS, en donde la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia. Un "promotor de cianobacterias" es un promotor capaz de iniciar la transcripción en las células de cianobacterias, respectivamente. Dicho promotor es por lo tanto activo en una célula de cianobacterias, pero no tiene su origen en ese

000027

organismo. Se entiende que modificaciones limitadas se pueden hacer sin destruir la función biológica de un elemento regulador y que las modificaciones limitadas pueden resultar en elementos reguladores de cianobacterias que tienen una función sustancialmente equivalente o incrementada en comparación con un elemento regulador de cianobacterias tipo silvestre. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida de sitio, o pueden ser accidentales tal como a través de mutación en huéspedes que albergan el elemento regulador de cianobacterias reguladoras, siempre y cuando la capacidad de conferir expresión en las cianobacterias unicelulares y multicelulares se retienen sustancialmente.

Un "promotor PsbA2" se refiere a una región promotora que regula la expresión de psbA2. La región promotora del gen psbA2 ha sido bien caracterizada (Eriksson et al, Mol Cell Biol. Res Commun 3: 292-298, 2000; Mohamed et al, Mol Gen Genet 238: 161-168, 1993; Mohamed and Jansson, Plant Mol Biol 13: 693-700, 1989). A menudo, el promotor PsbA2 que está unido operativamente a un gen IspS de esta invención es el promotor de las cianobacterias endógenas, sino un promotor PsbA2 heterólogo también se puede emplear. Tales secuencias promotoras suelen incluir secuencias reguladoras 1 (HLR1) de alta luz que se involucran en fotorregulación así como secuencias promotoras mínimas (véase, por ejemplo, Eriksson et al, supra, 2000).

"Expresión" de un gen IspS en el contexto de esta invención se refiere por lo general a la introducción de un gen IspS en las células de cianobacterias, en que normalmente no se expresa. En consecuencia, un "incremento" en la actividad o expresión de IspS se determina generalmente en relación con cianobacterias tipo silvestre que no tienen la actividad IspS.

000028

Una secuencia de polinucleótidos es "heteróloga a" una segunda secuencia de polinucleótidos si se origina en una especie extranjera, o bien, si de la misma especie, se modifica por la acción humana en su forma original. Por ejemplo, un promotor  
 5 enlazado operativamente a una secuencia de codificación heteróloga se refiere a una secuencia de codificación de una especie diferente a la que el promotor se deriva, o, si las mismas especies, una secuencia de codificación que es diferente de las variantes alélicas de origen natural.

10 Un "polinucleótido IspS" como se usa aquí se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 2, o a la región de codificación IspS de SEQ ID NO: 1 o a SEQ ID NO: 3, o una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente similar a la región de codificación IspS de SEQ ID NO: 1 o a SEQ ID NO: 3,  
 15 o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que es sustancialmente similar a SEQ ID NO: 2, o su fragmento o dominio. Por lo tanto, un polinucleótido IspS: 1) comprende una región de aproximadamente 15 a aproximadamente 50, 100, 150, 200, 300, 500, 1000, 1500 o  
 20 1700 o más nucleótidos, a veces de aproximadamente 20 o aproximadamente 50, a aproximadamente 1800 nucleótidos y, a veces de aproximadamente 200 a aproximadamente 600 o de aproximadamente 1700 nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o 2) hibrida a SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO: 3, o sus complementos, bajo condiciones  
 25 estrictas, o 3) codifica un polipéptido o fragmento IspS de al menos 50 aminoácidos contiguos, por lo general de al menos aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 ó 550, o más residuos contiguos de un polipéptido IspS, por ejemplo, SEQ ID NO: 2, o 4) codifica un polipéptido o fragmento de IspS que  
 30 tiene al menos 55%, frecuentemente por lo menos 60%, 65%, 70%,

000029

75%, 80%, 85%, 90% , 95%, o una mayor identidad con SEQ ID NO: 2 o más de una ventana de comparación de al menos 100, 200, 300, 400, 500, o 550 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, o 5) tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene más de 5 aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, por lo menos 80%, 85%, 90%, o al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de una ventana de comparación de por lo menos aproximadamente 50, 100, 200, 500, 10 1000, 1500, 2000, o más nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o 6) es amplificada por los iniciadores de SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO: 3. El término "polinucleótido IspS" se refiere a ácidos nucleicos de doble cadena o de cadena sencilla. Los ácidos nucleicos IspS para su uso en la invención codifica un IspS 15 activo que cataliza la conversión de un sustrato difosfato dimetilalil a isopreno.

Una "variante ajustada de codón de un ácido nucleico IspS" por ejemplo, una variante de codón-ajustada de SEQ ID NO: 1, en el contexto de esta invención se refiere a una variante que 20 codifica la misma proteína, por ejemplo, SEQ ID NO: 2, sino que contiene sustituciones de nucleótidos basadas en la frecuencia de la ocurrencia de codón en las cianobacterias.

Un "polipéptido IspS" es una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o es 25 sustancialmente similar a SEQ ID NO: 2, o un fragmento o dominio del mismo. Por lo tanto, un polipéptido IspS puede: 1) tener por lo menos 55% de identidad, por lo general al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de identidad para SEQ ID NO: 2 o más de una ventana de comparación de al menos 100, 200, 250, 300, 30 250, 400, 450, 500, o 550 aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o 2)

000030

comprender al menos 100, por lo general al menos 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, o más aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2, o 3) unido a anticuerpos producidos contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Un  
5 polipéptido IspS en el contexto de esta invención es una proteína funcional, que cataliza la conversión de un sustrato difosfato de dimetilalilo a isopreno.

Como se usa aquí, un homólogo u ortólogo de un gen IspS particular (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) es un segundo gen en el  
10 mismo tipo de planta o en diferente tipo de planta que es sustancialmente idéntico (determinado como se describe a continuación) a una secuencia en el primer gen.

En el caso de expresión de unos transgenes reconocerán que la secuencia de polinucleótidos insertado no necesita ser  
15 idéntica y puede ser "sustancialmente idéntica" a una secuencia del gen del que se derivó. Como se explica más adelante, estas variantes están específicamente cubiertas por este término.

En el caso donde la secuencia de polinucleótido insertada se transcribe y traduce para producir un polipéptido  
20 funcional, una persona con experiencia reconocerá que debido a la degeneración un número de secuencias de polinucleótidos codificarán el mismo polipéptido. Estas variantes están específicamente cubiertas por el término "secuencia de polinucleótidos IspS" o "gen de IspS".

25 Dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos se dice que son "idénticos" si la secuencia de nucleótidos o los residuos de aminoácidos, respectivamente, en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para la correspondencia máxima tal como se describe a continuación. El término "complementario a" se  
30 utiliza aquí en el sentido de que la secuencia es complementaria

a la totalidad o una parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede ser conducida por el algoritmo de homología local de Smith and Waterman Add. APL. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por la búsqueda para el método de similitud de Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI).

"Porcentaje de identidad de secuencia" se determina mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácidos nucleicos idénticos o residuo de aminoácido se produce en ambas secuencias para obtener el número de posiciones igualadas, dividiendo el número de posiciones igualadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa aquí, incluye una referencia a un segmento de uno de los número de posiciones contiguas, por ejemplo, 20 a 600, por lo general aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más generalmente de aproximadamente 100 a

aproximadamente 150 en el que una secuencia puede ser comparada con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias están perfectamente alineadas.

5 "Porcentaje de identidad de secuencia" se determina mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en  
10 comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácidos nucleico idéntica o residuo de aminoácido se produce en ambas secuencias para obtener  
15 el número de posiciones igualadas, dividiendo el número de posiciones compensadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa aquí, incluye una referencia a un  
20 segmento de uno de los número de posiciones contiguas, por ejemplo, 20 a 600, por lo general aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que una secuencia puede ser comparada con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones  
25 contiguas después de dos secuencias son óptimamente alineadas.

El término "identidad sustancial" en el contexto de polinucleótidos o secuencias de aminoácidos significa que un polinucleótido o polipéptido comprende una secuencia que tiene al menos un 50% identidad de secuencia con una secuencia de  
30 referencia. Por otra parte, el porcentaje de identidad puede ser

- 000033

cualquier número entero de 50% a 100%. Modalidades ejemplares, incluyen al menos: 55%, 57%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad en comparación con una secuencia de referencia usando programas descritos aquí, de preferencia BLAST  
5 usando parámetros estándar por defecto, como se describe a continuación. En consecuencia, las secuencias IspS de la invención incluyen secuencias de ácidos nucleicos que tienen una identidad sustancial a la región de codificación IspS de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. Como se nota anteriormente, secuencias de  
10 polipéptido IspS polipéptido de la invención incluyen secuencias de polipéptido que tienen identificación sustancial a SEQ ID NO: 2.

Polipéptidos que son "sustancialmente similares" tienen secuencias como se nota anteriormente excepto que las posiciones  
15 de residuos que no son idénticas pueden diferir por cambios de aminoácido conservadores. Sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la capacidad de intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es  
20 glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es  
25 fenilalanina, tirosina y triptófano, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina, y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos de sustitución de aminoácidos conservativos ejemplares son: valina-leucina-  
30 isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-

- 000034

valina, ácido aspártico-ácido glutámico y asparagina-glutamina.

Otra indicación de que secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es que si dos moléculas hibridan entre sí, o un tercer ácido nucleico, bajo condiciones estrictas. La frase "condiciones de hibridación astringentes" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará con su subsecuencia objetivo, normalmente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no en otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridan específicamente a altas temperaturas. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). En general, condiciones rigurosas se seleccionan para ser de aproximadamente 5-10°C más baja que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica en un pH fuerza iónica definido. La  $T_m$  es la temperatura (bajo fuerza iónica definida, pH y concentración de nucleicos) en los cuales 50% de las sondas complementarias al objetivo hibrida a la secuencia objetivo en equilibrio (como las secuencias objetivo están presentes en exceso, en  $T_m$ , 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor de aproximadamente 1.0 M de iones de sodio, por lo general aproximadamente 0.01 a 1.0 M de concentración de iones de sodio (u otras sales) a un pH de 7.0 a 8.3 y la temperatura es por lo menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Las condiciones

000035

rigurosas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizadores tal como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es por lo menos dos veces de fondo, opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo.

5 Condiciones de hibridación astringentes ejemplares pueden ser como sigue: 50% de formamida, 5X SSC y 1% de SDS, incubando a 42°C, o 5X SSC, 1% de SDS, incubando a 65°C, con lavado en 0.2 X SSC y 0.1% de SDS a 55°C, 60°C, o 65°C. Dichos lavados se pueden realizar durante 5, 15, 30, 60, 120, o más minutos.

10 Ácidos nucleicos que no hibridan entre sí bajo condiciones rigurosas son todavía sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando una copia de un ácido nucleico se crea con la degeneración de codones máxima permitida por el

15 código genético. En dichos casos, los ácidos nucleicos hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente severas. Por ejemplo, unos polinucleótidos IspS, también se pueden identificar por su capacidad de hibridar bajo condiciones muy rigurosas (por ejemplo,  $T_m \sim 40^\circ\text{C}$ ) a las sondas de ácido nucleico que tienen la

20 secuencia de SEQ ID NO: 3. Como una secuencia de ácido nucleico IspS puede tener, por ejemplo, aproximadamente 25-30% de par de base igualado o menos en relación con la sonda de ácido nucleico seleccionada. SEQ ID NO: 3 es una secuencia de polinucleótido IspS ejemplar. "Condiciones de hibridación moderadamente

25 rigurosas" ejemplares incluyen una hibridación en un regulador de pH de 40% de formamida, 1 M NaCl, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en 1X SSC a 45°C. Dichos lavados se pueden realizar durante 5, 15, 30, 60, 120, o más minutos. Una hibridación positiva es por lo menos dos veces de fondo. Aquellos de experiencia ordinaria

30 reconocerán fácilmente que la hibridación alterna y

condiciones de lavado se pueden utilizar para proporcionar condiciones de rigor similar.

El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, indica que el ácido nucleico o proteína es esencialmente libre de otros componentes celulares con los que se asocia en el estado natural. Es de preferencia en un estado homogéneo y puede ser ya sea en una solución acuosa o seca. La pureza y homogeneidad son típicamente determinados utilizando técnicas de química analítica tal como electroforesis en gel de poliacrilamida o la cromatografía líquida de alto desempeño. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación es sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado se separa de los marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína que no sea el gen de interés.

Como se usa aquí, "cultivo de masa" se refiere al crecimiento de grandes cantidades de cianobacterias, que han sido modificadas para expresar un gen IspS. Una "gran cantidad" está generalmente en el intervalo de aproximadamente 100 litros a aproximadamente 1,500,000 litros, o más. En algunas modalidades, los organismos se cultivan en grandes cantidades en bio-reactores modulares, cada una con una capacidad de aproximadamente 1,000 a aproximadamente 1,000,000 litros.

Un "bio-reactor" en el contexto de esta invención es cualquier recipiente de gran capacidad cerrado en los que las cianobacterias se cultivan. Un "recipiente de gran capacidad" en el contexto de esta invención puede contener cerca de 100 litros, a menudo aproximadamente 500 litros, o aproximadamente 1,000 litros a aproximadamente 1,000,000 litros, o más.

Como se usa aquí, "recolectar" hidrocarburos isoprenicos volátiles se refiere a la captura y secuestro de

000037

dichos hidrocarburos en un ambiente cerrado o contenido.

#### Secuencias de ácidos nucleicos IspS

La invención emplea diversas técnicas de ácidos  
 5 nucleicos recombinantes de rutina. En general, la nomenclatura y  
 los procedimientos de laboratorio en tecnología de ADN  
 recombinante descritos a continuación son aquellos bien conocidos  
 y comúnmente empleados en la técnica. Muchos manuales que  
 proporcionan la dirección para llevar a cabo manipulaciones de  
 10 ADN recombinante están disponibles, por ejemplo, Sambrook &  
 Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3a Ed., 2001); y  
 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al, eds,  
 1994-1999).

Secuencias de ácido nucleico y polipéptido IspS se  
 15 conocen en la técnica. Genes IspS se han aislado y secuenciado a  
 partir de chopo y álamo temblón (dos árboles relacionados), y  
 kudzu (una vid). Las especies involucradas y las secuencias  
 disponibles en la base de datos NCBI se indican a continuación  
 por el número de acceso, cada uno de los cuales se incorpora por  
 20 referencia:

Populus alba (álamo blanco) isopreno sintasa (IspS) No.  
 de ACCESO AY341431 (cds completo);

ARNm de IspS Populus alba x Populus tremula No. de  
 ACCESO AJ294819;

25 ARNm de Populus nigra (álamos de Lombardía) para  
 isopreno sintasa (gen IspS); No. de ACCESO AM410988;

Pueraria montana var. Lobata (vid kudzu) isopreno  
 sintasa (IspS); No. de ACCESO AY316691 (cds. Completo).

El examen de estas secuencias de IspS revela un alto  
 30 grado de identidades de secuencia de nucleótidos y aminoácidos,

000038

por ejemplo, secuencias de ADNc de chopo y álamo híbrido son 98% idénticas en el nivel de nucleótidos y polipéptidos (véase, por ejemplo, Sharkey et al, Plant Physiol. 137:700-712, 1995). La secuencia de codificación de nucleótido de isopreno nucleasa de álamo 65% idéntica a la del gen de kudzu, mientras las secuencias de proteínas (sin el péptido de tránsito al cloroplasto) son 57% idénticos.

La proteína IspS de álamo tiene una alta densidad de aminoácidos de cisteína e histidina en la mitad de carboxi-terminal de la proteína. Por ejemplo, teniendo en cuenta la secuencia de 591 aminoácidos de la proteína Cr-IspS, radicales de cisteína se encuentran en las posiciones 34, 326, 378, 413, 484, 505 y 559, es decir, seis de las siete cisteínas se encuentran en menos de 45% de la proteína. Agrupación adicional de histidinas en varias posiciones de la mitad C-terminal de la proteína también se observa. Aminoácidos de cisteína e histidina son conocidos por participar en el plegado apropiado y estructura del sitio catalítico de proteínas y pueden ser componentes importantes para la actividad enzimática. Una alineación de cuatro proteínas conocidas IspS que muestra la alta conservación de Cys en la parte C-terminal de la molécula se proporciona en la figura 9. En un caso, la proteína de kudzu ha sustituido una Cys conservada de otro modo con secuencia Ser (Cys-509-Ser de Alba o nigra o tremuloides) en la alineación clustal en la figura 9). Serina es una sustitución altamente conservadora de cisteína, ya que la única diferencia entre los dos aminoácidos es un grupo -OH en el lugar del grupo -SH. De hecho, el examen de las cuatro secuencias IspS revela la característica adicional de muchas serinas conservadas en la mitad C-terminal de la proteína. En consecuencia, en algunas modalidades, un ácido nucleico para su

uso en la invención codifica un polipéptido IspS que comprende carboxilo-terminal 45% de SEQ ID NO: 2 y retiene la actividad catalítica en convertir DMAPP a isopreno. Existen otros ejemplos donde una proteína relacionada en un microorganismo, tales como microalgas verdes, carece de una parte sustancial de la porción N-terminal de la proteína (en relación con la forma de la proteína presente en otro microorganismo como bacterias) sin efectos adversos en la actividad (véase, por ejemplo, Melis y Happe, *planta Physiol.* 127:740-748, 2001). En consecuencia, en algunas modalidades, un ácido nucleico de IspS para su uso en la invención codifica un polipéptido que comprende desde aproximadamente 300 residuos de aminoácido a través de la C-terminal de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades el polipéptido IspS codificado por el ácido nucleico IspS comprende desde aproximadamente 300 residuos de aminoácido a través de C-terminal de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, la secuencia de IspS puede además carecen de los últimos 10, 15 o 20 residuos de SEQ ID NO: 2.

El péptido de tránsito de la proteína IspS incluye, mínimamente, 1-37 aminoácidos para poplar y aspen y 1-39 para kudzu (sin incluir una metionina codificada por el comienzo ATG). Secuencias de ácido nucleico IspS para su uso en la invención típicamente no incluyen secuencias que codifican un polipéptido de tránsito y además pueden omitir secuencia de N-terminal adicional.

En algunas modalidades de la invención, se puede utilizar una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido poplar o aspen IspS. En modalidades típicas, se utiliza una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IspS kudzu (por ejemplo, SEQ ID NO: 2). Los

000040

polipéptidos de IspS codificados por los ácidos nucleicos empleados en los métodos de la invención tienen la actividad catalítica de convertir DMAPP a isopreno. Normalmente, el nivel de actividad es equivalente a la actividad exhibida por un  
5 polipéptido de IspS kudzu natural (por ejemplo, codificado por SEQ ID NO: 1).

Aislamiento o generación de secuencias de polinucleótido IspS puede realizarse mediante técnicas conocidas, incluyendo técnicas de amplificación y/o clasificación de  
10 genoteca.

Iniciadores y sondas apropiadas para generar un gen IspS pueden diseñarse basándose en principios conocidos mediante, por ejemplo, las secuencias de IspS proporcionadas aquí. Para una visión general de PCR ver los protocolos PCR: A Guide to Methods  
15 and Applications. (Innis, M, Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T., eds.), Academic Press, San Diego (1990). En los ejemplos se proporciona un PCR ejemplar para amplificar una secuencia de ácido nucleico IspS.

El género de las secuencias de ácido nucleico IspS para  
20 su uso en la invención incluye genes y los productos génicos identificados y caracterizados por técnicas como la hibridación y/o análisis de secuencia utilizando secuencias de ácido nucleico ejemplar, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

#### 25 Preparación de vectores recombinantes

Para utilizar secuencias aisladas en las técnicas anteriores, se preparan vectores ADN recombinantes adecuados para la transformación de las cianobacterias. Técnicas de transformación son bien conocidas y descritas en la literatura  
30 científica y técnica. Por ejemplo, una secuencia de ADN de

000041

codificación de un gen de IspS (se describe con más detalle a continuación), se puede combinar con secuencias transcripcionales y otras secuencias reguladoras que dirigirán la transcripción de la secuencia de los genes en las células previstas de las cianobacterias transformadas. En algunas modalidades, un vector de expresión que comprende un cartucho de expresión que comprende además el gen IspS comprende un promotor operablemente relacionado con el gen IspS. En otras modalidades, un promotor y/o otros elementos reguladores que dirigen la transcripción de los genes IspS son endógenos para el microorganismo y el cartucho de expresión que comprende el gen IspS es introducido, por ejemplo, por recombinación homóloga, tales que el gen IspS heterólogo operablemente enlazado a un promotor endógeno y la expresión activada por el promotor endógeno.

Secuencias reguladoras incluyen promotores, que pueden ser constitutivos o inducibles. En algunas modalidades, un promotor puede utilizarse para dirigir la expresión de los ácidos nucleicos IspS bajo la influencia de los cambios en las condiciones ambientales. Ejemplos de condiciones ambientales que pueden afectar la transcripción por los promotores inducibles incluyen condiciones anaerobias, temperatura elevada o la presencia de la luz. Promotores que son inducibles a la exposición a los reactivos químicos se utilizan también para expresar los ácidos nucleicos IspS. Otros elementos reguladores inducibles útiles incluyen elementos reguladores inducibles por cobre (Mett et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:4567-4571 (1993); Furst et al, Cell 55:705-717 (1988)); elementos reguladores inducibles por tetraciclina y clor-tetraciclina (Gatz et al., Plant J. 2:397-404 (1992); Röder et al, Mol. Gen. Genet. 243:32-38 (1994); Gatz, Meth. Cell Biol. 50:411-424 (1995)); elementos

reguladores inducibles por ecdysone (Christopherson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6314-6318 (1992); Kreutzweiser et al, Ecotoxicol. Environ. Safety 28:14-24 (1994)); promotores inducibles por choque térmico, tales como aquellos de los genes hsp70/dnaK (Takahashi et al, Plant Physiol 99:383-390 (1992); Yabe et al, Plant Cell Physiol. 35:1207-1219 (1994); Ueda et al, MoI Gen. Genet. 250:533-539 (1996)); y elementos de operon lac, que se usan en combinación con un represor lac expresado constitutivamente para conferir, por ejemplo, expresión inducible por IPTG (Wilde et al, EMBO J. 11: 1251-1259 (1992)). Un elemento regulador inducible también puede ser, por ejemplo, un promotor inducible por nitrato, por ejemplo, derivado del gen nitrito reductasa de espinaca (Back et al, Plant MoI Biol. 17:9 (1991)), o un promotor inducible por luz, tal como aquel asociado con la subunidad pequeña de RuBP carboxilasa o las familias del gen LHCP (Feinbaum et al, MoI. Gen. Genet. 226:449 (1991); Lam and Chua, Science 248:471 (1990)), una luz.

En algunas modalidades, el promotor puede ser de un gen asociado a la fotosíntesis en las especies que se transforman u otras especies. Por ejemplo, dicho promotor de una especie puede utilizarse para dirigir la expresión de una proteína en las células transformadas cianobacterias. Promotores adecuados pueden ser aislados o sintetizados basados en secuencias conocidas de otros organismos fotosintéticos. Promotores preferidos son aquellos para genes de otras especies fotosintéticos, u otro organismo fotosintético donde el promotor es activo en las cianobacterias.

En algunas modalidades, un promotor usado para activar la expresión de un gen IspS heterólogo es un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores fuertes constitutivos para

su uso en las cianobacterias incluyen, por ejemplo, el gen psbDI o el promotor basal del gen psbDII. También se conocen varios otros promotores que están activos en las cianobacterias. Estos incluyen los promotores inducibles ligeros de los genes psbA y psbA3 en las cianobacterias y promotores como aquellos establecidos en la Publicación de Solicitud de Patente No. 20020164706, que es incorporada por referencia. También se pueden emplear otros promotores que están operativos en las plantas, por ejemplo, promotores derivados de virus de plantas, tales como los promotores de CaMV35S, en las cianobacterias. Para obtener una descripción de promotores fuertes y regulados, por ejemplo, activo en la cepa cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120, véase por ejemplo, Elhai, FEMS Microbiol Lett 114:179-184, 1993).

En algunas modalidades, promotores se identifican mediante el análisis de las secuencias 5' de un clon genómico correspondiente a un gen de IspS. Característica de secuencias de secuencias promotoras pueden utilizarse para identificar el promotor.

Por ejemplo, un promotor puede evaluarse por probar la capacidad del promotor para activar la expresión en cianobacterias en donde es conveniente introducir un constructo de expresión IspS.

Un vector que comprende secuencias de ácido nucleico IspS normalmente comprenderá un gen marcador que confiere un fenotipo seleccionable en cianobacterias transformadas con el vector. Estos marcadores son conocidos. Por ejemplo, el marcador puede codificar resistencia a los antibióticos, tales como resistencia a kanamicina, G418, bleomicina, higromicina y similares.

Secuencias de ácido nucleico IspS de la invención se

expresan recombinantemente en cianobacterias. Los constructos de expresión pueden ser diseñados teniendo en cuenta dichas propiedades como las frecuencias de uso de codón del organismo en donde el ácido nucleico IspS es expresado. Frecuencias de uso  
 5 codón pueden ser tabuladas utilizando métodos conocidos (véase, por ejemplo, Nakamura et al. Nucl. Acids Res. 28:292, 2000). Cuadros de frecuencia de uso codón, incluyendo las de cianobacterias, también están disponibles en la técnica (por ejemplo, en las bases de datos de uso de codón del departamento  
 10 de investigación de genoma vegetal, Kazusa ADN Research Institute disponible en la web mundial kazusa.or.jp/codon.).

En algunas modalidades, la invención proporciona un gen IspS que codifica una proteína IspS kudzu, donde el gen es una variante ajustada de codón de un gen IspS kudzu, por ejemplo, una  
 15 variante ajustada de codón de SEQ ID NO: 1. En modalidades preferidas, codones de SEQ ID NO: 1 que se utilizaría con una frecuencia promedio de menos de 12% por la cianobacteria de interés son reemplazados por codones más frecuentes usados.

Métodos de transformación de células y marcadores  
 20 seleccionables para cianobacterias son bien conocidos en la técnica (Wirth, MoI Gen Genet 1989 marzo; 216 (1): 175-7; Koksharova, Appl Microbiol Biotechnol febrero de 2002; 58:123-37; Thelwell). Métodos de transformación y marcadores seleccionables también son bien conocidos (ver, por ejemplo, Sambrook et al,  
 25 supra).

#### Microorganismos que pueden dirigirse

IspS puede expresarse en cualquier número de cianobacterias donde es deseable producir isopreno.  
 30 Cianobacterias unicelulares adecuadas incluyen *Synechocystis* sp.,

000045

tales como la cepa *Synechocystis* PCC 6803; y *Synechococcus* sp., por ejemplo, los termófilos *Synechococcus lividus*; el mesófilo *Synechococcus elongatus* o *Synechococcus* 6301. Cianobacterias multicelulares incluyendo filamentosas, también pueden diseñarse para expresar IspS de conformidad con esta invención. Cianobacterias multicelulares que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, *Gloeocapsa*, así como cianobacterias filamentosas como *Nostoc* sp., por ejemplo, *Nostoc* sp. PCC 7120, *Nostoc sphaeroides*); *Anabaena* sp., por ejemplo, *Anabaena variabilis*; y *Arthrospira* SP ("espirulina"), como *Arthrospira platensis* y *Arthrospira maxima*.

Cianobacterias transformadas que expresan un gen IspS heterólogo se cultivan bajo condiciones de cultivo de masa para la producción de hidrocarburos, por ejemplo, para ser utilizado como una fuente de combustible o como materia prima en química sintética. Los organismos transformados crecen en bio-reactores o fermentadores que proporcionan un ambiente cerrado para contener hidrocarburos. En modalidades típicas para el cultivo de masa, las cianobacterias se cultivan en reactores cerrados en cantidades de al menos aproximadamente 500 litros, a menudo de por lo menos aproximadamente 1000 litros o más y en algunas modalidades en cantidades de aproximadamente 1,000,000 litros o más. Una persona con experiencia entiende que ese cultivo a gran escala de las cianobacterias transformadas que forman parte de un gen isopreno sintasa donde la expresión es activada por un promotor sensible a la luz como un promotor de *PsbA2* se lleva a cabo normalmente en condiciones donde se expone el cultivo a la luz natural. En consecuencia, en tales modalidades adecuadas se utilizan reactores cerrados apropiados que permiten a la luz llegar al cultivo de las cianobacterias.

000046

Condiciones para el cultivo de cianobacterias que expresan IspS para fines ejemplares ilustrados anteriormente son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las referencias ejemplares citadas en el presente documento). Hidrocarburos volátiles de isopreno producidos por las cianobacterias modificadas pueden recogerse mediante técnicas conocidas. Hidrocarburos de isopreno no son miscibles en agua y se elevan y flotan en la superficie del medio de crecimiento del microorganismo. Son extraídos de la superficie y secuestrados en contenedores adecuados. Además y dependiendo de la temperatura imperante durante el cultivo de masa de las cianobacterias, isopreno puede existir en forma de vapor por encima de la media de agua en el contenedor de bio-reactor (temperatura de ebullición de isopreno  $T = 34^{\circ}\text{C}$ ). Vapor de isopreno es conducido fuera del contenedor de bio-reactor y condensado en forma de combustible líquido durante enfriamiento o compresión de bajo nivel.

#### Cultivo de organismos cianobacterias y expresión de isopreno sintasa

Cianobacterias de la invención en cuya expresión de IspS es activado por un promotor de PsbA2 pueden cultivarse en una gama de condiciones de iluminación, por ejemplo, 100% luz solar, por ejemplo, unos  $2,000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  bajo luz solar directa, o en condiciones de menor intensidad de la luz. Por lo tanto, estos cultivos de cianobacterias generalmente están expuestas a condiciones de luz que van desde unos  $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a aproximadamente  $2,500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . En modalidades típicas de la invención, cultivos de cianobacterias de la invención producen al menos aproximadamente 2 microgramos de

isopreno por litro de cultivo por hora bajo condiciones de iluminación limitantes, por ejemplo, en una intensidad luminosa de aproximadamente  $100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y más, por ejemplo al menos aproximadamente 40 microgramos o más, de isopreno por litro de cultivo por hora, por ejemplo, bajo luz solar 100%. Para propósitos de los ejemplos anteriores de rendimientos, las cantidades por litro se refieren a los cultivos que se desarrollan a una densidad de aproximadamente  $\text{OD}_{730} = \sim 0.5$ , que se aproxima a aproximadamente 1.6 mg de clorofila por litro de cultivo o aproximadamente 0.12 g de peso de célula seca por litro de cultivo.

En modalidades típicas, cianobacterias se transforman con un vector de expresión que comprende un gen IspS y un gen de resistencia a los antibióticos. Transformantes son cultivados en medios selectivos que contienen un antibiótico al cual una célula hospedera no transformada es sensible. Cianobacterias normalmente tienen hasta 100 copias de ADN circular en cada célula. Transformación exitosa con un vector de expresión que comprende un gen IspS y un gen de resistencia a los antibióticos normalmente ocurre en sólo uno, o sólo algunos, de las muchas copias de cianobacterias de ADN. Por lo tanto, la presencia del antibiótico es necesaria para alentar la expresión de la o las copias transgénicas del ADN para la producción de isopreno. En ausencia del marcador seleccionable (antibiótico), la o las copias transgénicas del ADN serían perdidas y reemplazadas por copias de tipo silvestre del ADN.

En algunas modalidades, transformantes de cianobacterias IspS son cultivados en el laboratorio en condiciones de presión selectiva continua (presencia de antibiótico durante muchas generaciones) para lograr homoplasma

000048

de ADN en el organismo hospedero transformado. Uno de habilidad en la técnica es consciente de que el número de generaciones y tiempo de cultivo varían dependiendo de las condiciones de cultivo particular empleadas. Por ejemplo, homoplasma puede determinarse, por ejemplo, mediante la supervisión del cultivo para determinar la presencia de copias tipo salvaje del ADN cianobacterial.

"Logrando homoplasma" se refiere a un reemplazo cuantitativo de la mayoría, por ejemplo, el 70% o más, o normalmente todas, las copias tipo silvestre del ADN cianobacterial en la célula con la copia de ADN recombinante que lleva el transgen IspS. Esto normalmente se logra con el tiempo, en las condiciones (antibiótico) continuas de presión selectiva aplicada y conlleva el gradual durante el reemplazo de crecimiento de las copias tipo silvestre del ADN con las copias de transgénicas, hasta que no se deje ninguna copia tipo silvestre del ADN cianobacterial en cualquiera de las células transformantes. Lograr homoplasma normalmente es verificado por métodos cuantitativos de amplificación como PCR ADN-genómico usando iniciadores y/o sondas específicos para la copia tipo silvestre del ADN cianobacterial. En algunas modalidades, la presencia de ADN cianobacterial tipo salvaje puede detectarse mediante iniciadores específicos para el ADN cianobacterial tipo silvestre y detectar la presencia del gen PsbA2. ADN transgénico es generalmente estable en condiciones homoplasma y presente en todas las copias del ADN cianobacterial.

En algunas modalidades, cultivos de cianobacterias pueden ser cultivados bajo condiciones en las que la intensidad de la luz es muy variada. Así, por ejemplo, cuando el promotor apsbA2 se utiliza como un promotor para activar la expresión de

000049

isopreno sintasa, cultivos cianobacteriales transformados puede cultivarse en condiciones de baja intensidad de la luz (por ejemplo,  $10\text{--}50\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), pasó luego a condiciones mayor intensidad de la luz (por ejemplo,  $500\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

5 El promotor psbA2 responde al cambio en la intensidad de la luz por sobre-regulación de la expresión del gen IspS en *Synechocystis*, normalmente al menos aproximadamente 10 veces. En otras modalidades, cultivos de cianobacterias pueden estar expuestos a aumentar las condiciones de la intensidad de la luz  
10 (por ejemplo, de  $50\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  a  $2,500\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) correspondiente a un aumento diurno en la intensidad de la luz hasta luz solar plena. El promotor psbA2 responde al aumento gradual en la intensidad de la luz por sobre-regulación de la expresión del gen IspS en *Synechocystis* en paralelo con el  
15 aumento en la intensidad de la luz.

En algunas modalidades, expresión de genes de IspS se mide por análisis cuantitativos Western blot, donde se cuantifica la cantidad de la proteína IspS presente en la célula. En otras modalidades, expresión de genes de IspS se mide por la cantidad  
20 de producto de isopreno acumulado en los espacios vacíos del cultivo como una función del tiempo (velocidad y rendimiento de la producción de isopreno).

### EJEMPLOS

25 Los ejemplos descritos aquí se proporcionan a título de ilustración sólo y no a manera de limitación. Aquellos de experiencia en la técnica reconocerán fácilmente una gran variedad de parámetros no críticos que podrían ser cambiados o  
30 modificados esencialmente producen similares resultados. 000050

EJEMPLO 1Diseño y expresión de un klspS y un gen SklspS para la producción de hidrocarburos de isopreno en cianobacterias

5

Materiales y métodosCepas y condiciones de crecimiento

Escherichia coli cepa XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA), fue utilizado para la propagación de subclonación y  
10 plásmido de rutina. Cepa de e. coli Rosetta (Novagen (EMD), San Diego, CA, USA), se utilizó para sobreexpresión de la proteína recombinante para servir como antígeno para la generación de anticuerpos. Todas las cepas de e. coli fueron cultivadas en medio LB con adición de antibióticos adecuados a 37°C, de acuerdo  
15 con protocolos estándar. Sobreexpresión de proteínas recombinantes se realizó a 15°C.

Synechocystis sp. PCC 6803 (en lo sucesivo denominado "Synechocystis") fue cultivada rutinariamente en medio BG11 (Stanier et al., 1971) a 25°C y a una intensidad luminosa de  
20 aproximadamente 40  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Para el crecimiento de cepas transformadas, se agregó medio líquido de BG11 kanamicina 5  $\mu\text{g/ml}$  (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para el mantenimiento de las cepas en placas de agar, medio BG11 fue complementado con 1.5% (p/v) agar, tiosulfato de sodio 0.3% (p/v) y regulador de pH  
25 con 10 mM TES NaOH pH 8.0.

Determinación de clorofila

Las mediciones de clorofila (ChI), pigmentos se extrajeron en 90% de metanol, los desechos de células eliminados  
30 por centrifugación a 20,000 g durante 5 minutos, y la absorbancia

. 000051

del sobrenadante fue medida utilizando un espectrofotómetro de UV160U Shimadzu. Chl una concentración se calcula según Meeks y Castenholz (1971).

#### 5            Síntesis de ajuste y gen de codón

La secuencia del gen *Pueraria montana* (kudzu) isopreno sintasa (IspS) (en lo sucesivo denominados klspS) se ajustó a la utilización de codón preferido de *Synechocystis* utilizando el software GeneDesigner (ADN 2.0, Menlo Park, California, EU) y una  
10    tabla de uso de *Synechocystis* codón de la base de datos de uso de codón Kazusa (Nakamura et al., 2000). El kudzu nativo (klspS) y genes kudzu IspS ajustado con *Synechocystis* codón (Sklsps) fueron aumentados por sitios de restricción adecuados y sintetizados para su uso en este trabajo por ADN 2.0 (Menlo Park, California,  
15    EU).

#### Construcción de plásmidos para la transformación de *Synechocystis* con el gen de isopreno sintasa

Expresión heteróloga del gen isopreno sintasa en  
20    *Synechocystis*, se generaron constructos de plásmido, que permite sustituir el gen psbA2 de *Synechocystis* con genes klspS o Sklsps mediante recombinación homóloga doble. Dos regiones del ADN genómico *Synechocystis* que contiene 500 bp de secuencia situada inmediatamente aguas arriba y aguas abajo, respectivamente, del  
25    gen psbA2 fueron amplificados por PCR. Los iniciadores utilizados fueron A2us\_Eco\_F, 5'-GAGAGAGAATTCAGCGTTCCAGTGGAT 3' (SEQ ID NO: 4) y A2us\_NdeI\_Bam\_R, 5' GTTGGATCCGTCGTTGTCATATGGTTATAA 3' (SEQ ID NO: 5), para amplificación de la región corrientes arriba; y A2ds\_Bam\_F, 5' GAGAGAGAGGATCCTTGGTGTAATGCC 3' (SEQ ID NO: 6) y  
30    A2ds\_SacI\_R, 5' GAGAGAGAGAGCTCGATCGCCTTGGCAAAACAA 3' (SEQ ID NO:

. 000052

7) para amplificación de la región corrientes abajo. El fragmento corrientes arriba fue clonado en los sitios de EcoRI y BamHI de pBluescript KS + (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Posteriormente fue clonado el fragmento corrientes abajo en los sitios BamHI y  
 5 SacI del vector resultante para formar pBA2A2. Posteriormente, los genes sintéticos klspS o SklspS se introdujeron en los sitios de restricción NdeI y BamHI de pBA2A2, formando plásmidos pBA2kIA2 y pBA2SkIA2, respectivamente. El sitio NdeI permite la clonación de los genes de IspS en el marco con el sitio de inicio  
 10 de traducción de psbA2 sustituido. La etapa final en la generación de los constructos de plásmido es la clonación de un cartucho de resistencia a los antibióticos que tiene el gen npt, que confiere resistencia a kanamicina, en el único sitio BamHI de pBA2kIA2 y pBA2SkIA2, para formar pBA2kIKmA2 y pBA2SkIKmA2 (ver  
 15 la figura a continuación). Estos dos vectores se utilizaron para transformar Synechocystis, tal como se describe a continuación.

#### Transformación de Synechocystis

20 Cultivos de Synechocystis crecieron en medio líquido de BG11 2-3 días hasta que la densidad celular alcance aproximadamente  $3 \times 10^7$  células/ml ( $OD_{730} = 0.3$ ). Las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspenden en BG11 fresco una densidad de  $10^9$  células/ml. Un  $\mu$ g de ADN plásmido fue  
 25 agregado a 100  $\mu$ l de suspensión de células en un tubo de microcentrífuga y mezclado. La mezcla se incubó a 25°C bajo condiciones de poca luz por 4-6 horas antes de dispersarse en filtros de nitrocelulosa (HAWG, Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos), que se colocaron por encima de las placas de agar BG11.  
 30 Tras la incubación durante 24 horas en agar BG11, los filtros se

. 000053

trasladaron a medios selectivos sobre placas de agar BG11 que contienen kanamicina 5 µg/ml. Colonias sencillas fueron aisladas tras incubación de alrededor de dos semanas y que crecieron en cultivo líquido para su análisis.

5

#### Generación de anticuerpos policlonales IspS

La secuencia de isopreno kudzu nativo ADNc sintasa (klspS) ((Sharkey et al 2005), No. de acceso a GenBank AY316691) fue clonada en un vector de expresión llevando un His-tag, que posteriormente fue utilizada para transformar la E. coli (Rosetta, Novagen (EMD), San Diego, CA, USA). Después de la expresión, la proteína recombinante fue purificada en una columna de agarosa Superflow Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína purificada fue usada como antígeno para la generación de anticuerpos policlonales específicos (Covance, Princeton, Nueva Jersey, Estados Unidos).

#### Transcripción inversa (RT-) PCR

Para experimentos RT-PCR, ARN total fue extraído de 10 ml del cultivo celular, utilizando reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. RT-PCR se realizó mediante 0.25 µg de ARN total como material de inicio para la generación de ADNc a partir de la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguido de amplificación por PCR. Se utilizaron los iniciadores de genes específicos siguientes: RT\_kIspS\_F, 5' TCTTGGCTTTGAGGGAGAAA 3' (SEQ ID NO: 8) y RT\_klspS\_R, 5' CCACCACCTTGACAGGTCTT 3' (SEQ ID NO: 9), para amplificación de klspS;

- 000054

RT\_SklspS\_F, 5' CGGTCCTTAACGGACTTTCA 3' (SEQ ID NO: 10)

y

RT\_SklspS\_R, 5' ATCGCCGTATTGGTAAGTGC 3' (SEQ ID NO: 11),

para amplificación de SklspS;

5 RT\_rbcL\_F, 5' GTATCACCATGGGCTTCGTT 3' (SEQ ID NO: 12),

y

RT\_rbcL\_R, 5' ACCAAGCTTCCAAAGCAACA3' (SEQ ID NO: 13),

para amplificación del rbcL, que fue utilizado como un control positivo de la transcripción.

10

#### Análisis Southern blot

ADN genómico de cepas de *Synechocystis* se extrajo como se describe anteriormente (Tamagnini et al. 1997). Para Southern blots, 1 µg de cada muestra de ADN fue digerido con una  
15 combinación de dos enzimas de restricción; XbaI y SacI, o XbaI y NdeI. Las muestras de ADN digeridas fueron separadas en gel de agarosa y manchadas en una membrana de nylon (Amersham Hybond N+, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Detección de fragmentos de ADN se  
20 realizó mediante el sistema de marcado directo y detección Amersham gene Images AlkPhos (GE Healthcare, Little Chalfont, RU). La sonda usada para detección fue generada por PCR, usando iniciadores:

A2us\_probe\_R, 5' GAGTTTTGTAAAGCTTTGTAACAGGA 3' (SEQ ID  
25 NO: 14) y

A2us\_Eco\_F, 5'-GAGAGAGAATTCAGCGTTCCAGTGGAT 3' (SEQ ID NO: 15), con ADN genómico *Synechocystis* como plantilla para la reacción y etiquetado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30

000055

SDS-PAGE y análisis Western blot

Para análisis Western blot análisis, extractos crudos  
Synechocystis fueron preparados por un baño de ultrasonidos de  
celdas de regulador de pH Tris-EDTA-NaCl (TEN) (50 pH mM Tris-HCl  
5 8, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl) con la adición de una mezcla de  
inhibidores de proteasa (P2714, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,  
Estados Unidos). Después de un baño de ultrasonidos, material  
insoluble fue removido por centrifugación y la concentración de  
proteínas del sobrenadante se determino mediante el ensayo de  
10 Bio-Rad DC (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, USA). Los  
extractos de proteína soluble fueron separados en 8-12% SDS-PAGE  
según Laemmli (Laemmli 1970), manchados en membranas PVDF  
(Millipore, Billerica, MA, USA), de acuerdo al procedimiento  
estándar y sondeado secuencialmente con anticuerpos policlonales  
15 específicos primarios y anticuerpos secundarios conjugados con  
peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA,  
USA). Reacciones cruzadas entre bandas de proteínas y anticuerpos  
se visualizan mediante el kit de detección de Supersignal ECL  
(Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)  
20 siguiendo las instrucciones del fabricante. El antisuero contra  
la proteína AtpA se describe previamente (Park and Rodermeil 2004).

Ensayos de actividad de producción IspS e isopreno

Para la determinación de actividad de isopreno sintasa,  
25 gas desde el espacio superior de cultivos sellados fue muestreado  
y analizado por cromatografía de gases utilizando un Shimadzu 8A  
GC (Shimadzu, Columbia, MD, USA) equipado con un detector de  
ionización de llama (FID) y una columna seleccionada para  
detectar hidrocarburos de cadena corta. Cantidades de isopreno  
30 producido se calcularon en comparación con un estándar de

000056

isopreno puro (Acros Organics, Fair Lawn, Nueva Jersey, Estados Unidos).

#### Expresión de E. coli y Synechocystis

5 El gen isopreno sintasa IspS la Pueraria montana vino (kudzu) fue utilizado para la expresión de la enzima en E. coli y Synechocystis. La secuencia de ADNc nativa primero fue empleada (No. de acceso a GenBank AY316691) (Sharkey et al, 2005, supra). La secuencia de nucleótidos de codificación del aminoácido 39  
10 (sin contar la metionina codificada por el ATG de inicio) se quitó el péptido de tránsito cloroplasto (sin incluir la metionina de inicio), resultando en una secuencia de ADNc de codificación de la secuencia de IspS madura solamente. Este gen IspS nativo kudzu modificado fue clonado en un vector de  
15 expresión que incluye también un 6xHis (SEQ ID NO: 16) etiqueta epitope. La proteína recombinante etiquetada se expresó en E. coli y podría resolverse en SDS-PAGE teñido por Coomassie de extractos de célula entera. La figura 2 muestra un análisis SDS-PAGE donde se prepararon muestras de proteína de extractos de  
20 célula completa de E. coli no inducido (carril 1; no expresa His-klspS) e inducido (carril 2; expresando His-klspS). La proteína sobre-expresada His-klspS se muestra como una banda dominante 65 kD en extracto celular inducido solamente (Figura 2, carril 2). Utilizando el epítipo His-tag, la proteína klspS fue purificada y  
25 posteriormente utilizada para la generación de anticuerpos policlonales específicos contra la proteína de isopreno sintasa.

Ya que la secuencia de ADNc kudzu nativa tiene un uso de codón distinto al preferido por Synechocystis, una versión de codón ajustado de novo del gen fue diseñada y sintetizada. En  
30 esta versión ajustada del gen, mencionada aquí como SklspS, el

. 000057

uso de codón fue adaptado para eliminar codones raros en el organismo hospedero receptor. Primero se definieron codones raros, usando una tabla de uso de codón derivado del genoma secuenciado de *Synechocystis* (Nakamura et al., 2000). Figura 3 presenta una ilustración gráfica de la diferencia en el uso de codón entre el klspS original y el gen SklspS de codón ajustado. Grafica la frecuencia prevista del uso de cada codón de IspS (klspS o SklspS) por *Synechocystis*. Se ve que, en la secuencia nativa kudzu IspS (Figura 3, klspS), un número considerable de codones se utilizaría con una frecuencia inferior al 12% por *Synechocystis*. En el gen codón-ajustado (Figura 3, SklspS), codones que iban a ser utilizados con una frecuencia media de menos de 12% por *Synechocystis* fueron reemplazados por codones más frecuentemente usados. Para probar la eficacia del ajuste de codón en la expresión del gen IspS, la secuencia de kudzu nativa (klspS), así como la secuencia de SklspS codón-ajustado fueron usadas para la expresión en *Synechocystis*.

Las dos versiones del gen de isopreno sintasa kudzu, klspS y SklspS, cada uno fueron clonados en un constructo de plásmido, donde el gen respectivo se colocó, junto con un cartucho de resistencia a los antibióticos, entre las secuencias inmediatamente flanquean el gen psbA2 en *Synechocystis* (figura 4). Los plásmidos resultantes, que contienen klspS o SklspS, respectivamente, fueron usados para doble recombinación homóloga en el ADN genómico *Synechocystis*, produciendo transformantes mediante el gen psbA2 fue reemplazado por klspS o SklspS, respectivamente (Figura 5a). La inserción correcta de los nuevos genes en el ADN circular *Synechocystis* y segregación de la copia de ADN transformada desde todas las copias tipo silvestre, fue confirmada por PCR (no aparece) e hibridaciones Southern.

. 000058

Después del subcultivo de las cepas transformantes en medios selectivos, ninguna copia tipo silvestre del ADN *Synechocystis* fueron detectadas por hibridación Southern con una sonda específica (Figura 5a, mapa superior).

5           En los transformantes *Synechocystis* que llevan el constructo SklspS, digestión del ADN genómico con SacI (S) y XbaI (X) (Figura 5a, mapa inferior) dio una señal de hibridación correspondiente a una banda de aproximadamente 3.4 kb (Figura 5C, panel izquierdo, carril 2-5), en lugar del fragmento 2.9 kb en el  
10 tipo salvaje. Por el contrario, cuando las enzimas de restricción XbaI (X) y NdeI (N) fueron empleadas en la digestión de los transformantes *Synechocystis* SklspS (Figura 5 c, panel derecho) fragmentos de ADN genómico de aproximadamente 4.5 kb de tamaño fueron generados (Figura 5c, panel de la derecha, carriles 2-5),  
15 en lugar del fragmento de 5.8 kb en el tipo silvestre. Esto fue debido a la presencia de un sitio de restricción NdeI (N) en estos transformantes (Figura 5a, mapa inferior).

La conveniencia de los transformantes klspS y SklspS, relativa a aquel de tipo silvestre, fue probada por las  
20 mediciones comparativas de la tasa de crecimiento, en condiciones de limitación de iluminación a temperatura ambiente. En esas condiciones de crecimiento, se pueden detectar diferencias de crecimiento significativo entre las cepas transformantes y el tipo salvaje (resultados no mostrados), sugiriendo que  
25 transformación de la expresión del gen IspS y reemplazo del gen psbA2, no afectan el crecimiento y fisiología celular de manera adversa.

RT-PCR se utilizó para probar si los genes de IspS, clonados aguas abajo y en el marco con el promotor psbA2, fueron  
30 transcritos en *Synechocystis*. Cultivos de líneas celulares tipo

. 000059

salvaje y transformante, que llevan los constructos klspS o SklspS fueron cosechados en la fase de crecimiento exponencial y ARN extraídos para su análisis. El análisis RT-PCR mostró que de hecho se expresaron ambas versiones del gen (klspS y SklspS).

5 Esto se muestra en la figura 6a (carril + RT) para klspS y Figura 6b (carril + RT) para SklspS, donde productos de amplificación de IspS fueron visualizados en geles de agarosa, demostrando la presencia de klspS y SklspS ARNm en estos diferentes transformantes. En carriles de control (Figuras 6a y 6b, carriles  
10 marcados por -RT, ADN wt y dH<sub>2</sub>O) es decir, cuando no se añade enzima RT, ADN tipo silvestre fue utilizado como plantilla, o agua fue utilizado en lugar de enzima, no podían verse productos de amplificación de la reacción PCR. Por el contrario, cuando ADN genómico fue empleado como una plantilla en la reacción de PCR  
15 (Figura 6, ADN), una banda del mismo tamaño como en el análisis de RT-PCR (Figura 6, +RT) fue evidente, en los transformantes klspS y SklspS.

Análisis Western blot e inmunodetección de la enzima isopreno sintasa, utilizando anticuerpos policlonales específicos  
20 planteados contra la proteína recombinante expresada por E. coli, confirmó la presencia de la proteína IspS en Synechocystis (Figura 7a). Los IspS se ha predicho que sea una proteína soluble (Sharkey et al., 2005, supra), y de acuerdo con esta predicción, fue localizado en la fracción soluble de extractos de células  
25 enteras Synechocystis. Figura 7a, carril de control wt, muestra falta de reacción cruzada entre los anticuerpos policlonales IspS y cualquier proteína del extracto soluble tipo silvestre Synechocystis. Figura 7a, carriles 1-3, muestran una reacción cruzada específica entre los anticuerpos policlonales IspS y una  
30 banda de proteína en aproximadamente 65 kD de extractos solubles

000050

de tres líneas independientes de clon de transformantes *Synechocystis* que llevan el constructo klspS. Una reacción cruzada similar pero más fuerte fue detectada entre los anticuerpos policlonales IspS y una banda de proteína en unos 65 kD de extractos de tres líneas independientes de clon de transformantes *Synechocystis* llevando el constructo SklspS (Figura 7a, carriles 4-6). Estos resultados muestran claramente la presencia de la proteína recombinante IspS en el transformante *Synechocystis*. Lo importante, constantemente se observó que el nivel de la proteína IspS presente en los transformantes SklspS fue sustancialmente mayor (por un factor de aproximadamente 10) que en las líneas klspS transformantes (Figura 7a), sugiriendo un sustancial efecto positivo en la expresión de genes y muestra claramente un fuerte efecto positivo del ajuste de uso codón sobre el nivel de expresión de genes.

Para probar la eficacia del promotor psbA2 en la expresión del gen IspS en *Synechocystis*, los experimentos se realizaron según el cual los cultivos de transformantes *Synechocystis*, expresando el gen de ISP, fueron sometidos a un régimen de cambio de la luz, es decir, un cambio de baja luz ( $10 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) a condiciones de crecimiento con luz alta ( $500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Se conoce por estudios previos del promotor psbA2 que condiciones altas de iluminación mejoran la expresión del gen psbA2 (Mohamed y Jansson, plant Mol Biol 13:693-700, 1989). En consecuencia, solubles extractos de las muestras de *Synechocystis* fueron recogidos entre 0 y 6 horas después de un cambio de condiciones de poca luz a luz alta y se analizaron por inmunodetección y análisis Western blot. Los niveles de la proteína de la subunidad  $\alpha$  del ATP sintasa (AtpA) sirvió como un control de la expresión génica. Figura 7b (panel

000061

superior) muestra que la expresión del gen IspS fue inducida en función del tiempo bajo la luz alta, constantemente, con los niveles de la proteína de IspS en constante aumento entre 0 y 6 horas de incubación de luz de alta. Contrariamente a esta inducción, niveles de expresión de la proteína control AtpA fueron estables y no afectados por el cambio de intensidad de la luz de los cultivos (Fig. 7b, panel central). Estos resultados demuestran que el promotor psbA2 es capaz de regular la expresión del gen IspS expresado heterológamente en respuesta a los cambios de condiciones de iluminación. En consecuencia, el uso del promotor psbA2 en buenas condiciones de iluminación es una herramienta muy eficaz para la sobreexpresión del gen IspS.

## **EJEMPLO 2**

### **Producción de isopreno**

Los experimentos en el ejemplo 1 demostraron que cepas *Synechocystis* y *E. coli* son aptas para la transformación heteróloga con el gen IspS, y que expresan y acumulan la proteína respectiva en su citosol. Para confirmar que la proteína expresada de IspS es metabólicamente competente en estas bacterias diversas, muestras de gas fueron obtenidas de los espacios superiores de los cultivos de transformantes tipo silvestre e IspS y analizados por cromatografía de gases adecuada. En todos esos transformantes, pero no en sus contrapartes de tipo salvaje, un pico de isopreno fue claramente evidente, mostrando que la enzima expresada es realmente activa en las cepas recombinantes. Figura 8 muestra un ejemplo de un análisis comparativo de GC de gases de espacios superiores de transformante *Synechocystis* tipo silvestre (izquierda) e IspS

000062

(derecha) fotosintéticamente desarrollados, mostrando el pico de isopreno en unos 5 minutos después de la inyección de muestra en GC en el transformante pero no en el tipo silvestre. La identidad y la cantidad de isopreno representado por el pico observado se establecieron en comparación con un estándar de isopreno.

Los resultados demuestran que isopreno fue producido en cianobacterias, por ejemplo, *Synechocystis*, utilizando una planta kudzu codón-ajustado. Las tasas de producción de isopreno con cultivos cianobacteriales IspS transformados fueron (intensidad de luz solar de 10%) aproximadamente 2 microgramos de isopreno por litro de cultivo por hora. Abajo del 100% de luz solar, las tasas fueron 40 microgramos de isopreno por litro de cultivo por hora. La densidad celular del cultivo fue OD730 = ~0.5, la concentración de clorofila fue de aproximadamente 1-2 mg/L y biomasa celular seca en el cultivo fue de 0.10-0.15 g/L.

Cianobacterias fueron cultivadas en medio mínimo BG11 complementado con CO<sub>2</sub> en cultivos de 1 litro a 25°C, en una intensidad luminosa de aproximadamente 100  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  en el laboratorio, o 2,000  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  bajo luz solar directa. Para la selección y el crecimiento de cepas transformadas, 5  $\mu\text{g/ml}$  del antibiótico kanamicina se agregó a medio BG11 líquido. La densidad celular del cultivo fue mínimamente OD730 = ~0.5 y la concentración de clorofila era mínimamente 1-2 mg/l. tasas de producción de isopreno con cultivos cianobacteriales IspS transformados fueron (intensidad de luz solar de 10%) aproximadamente 2 microgramos de isopreno por litro de cultivo por hora. Bajo 100% de luz solar, las tasas fueron 20 microgramos de isopreno por litro de cultivo por hora.

En constructos de plásmido empleados para la expresión del isopreno sintasa en *Synechocystis* en este trabajo, optamos

000063

por utilizar el locus del gen psbA2 para la inserción de los transgenes. De esta manera, la secuencia codificante del gen psbA2 fue reemplazada por el gen de la IspS y el promotor psbA2 fue utilizado para impulsar la expresión de (S)klspS. El gen psbA2 es uno de los tres genes, los otros dos son psbA1 y psbA3, que codifican la proteína 32 kD/D1 de centro de reacción del fotosistema II en *Synechocystis*. La región promotora y regulación de la expresión del gen psbA2 se ha caracterizado también (Eriksson et al., *Mol Cell Biol Res Commun* 3:292-298, 2000; Mohamed et al., *Mol Gen Genet* 238:161-168, 1993; Mohamed y Jansson, *plant Mol Biol* 13:693-700, 1989). También se ha demostrado que un mutante de knock-out en psbA2 o psbA3 es capaz de crecer fotoautotróficamente, mientras el otro gen es todavía activo, mientras que psbA1 por sí solo no era capaz de compensar la pérdida de psbA2 y psbA3 (Mohamed y Jansson, 1989, supra). En este estudio demostramos que el reemplazo del gen psbA2 por el gen de IspS no afectó significativamente la fotosíntesis normal y el crecimiento de los transformantes y provistas para la expresión altamente eficaz de IspS activo.

Todas las publicaciones, números de acceso y las solicitudes de patente citadas en esta especificación están aquí incorporadas por referencia como si cada publicación individual o solicitud de patente fueron individualmente y específicamente indicados para ser incorporados por referencia.

25

Secuencias de IspS ejemplares:

SEQ ID NO: 1 Pueraria montana var. lobata (kudzu vino) isopreno sintasa ADNC (gen klspS) que codifica la proteína madura (sin el péptido de tránsito). Iniciar y detener los codones se indican en negritas.

000064

**ATGCCATGGCGAGTTATTTGTGCTACGAGCTCTCAATTTACCCAAATAACAGAAC**  
 ATAATAGTCGGCGTTTCAGCTAATTACCAGCCAAACCTCTGGAATTTTGAATTTCT  
 GCAGTCTCTGGAAAATGACCTTAAGGTGGAAAACTAGAAGAGAAGGCAACAA  
 AGCTAGAGGAGGAGGTACGATGCATGATCAACAGAGTAGACACACAACCATTA  
 5 GCTTACTAGAATTGATCGACGATGTCCAGCGTCTAGGATTGACCTACAAGTTTGA  
 GAAGGACATAATCAAAGCCCTTGAGAATATTGTTTTGCTGGATGAGAATAAGAA  
 AAATAAAAGTGACCTCCATGCTACTGCTCTCAGCTTCCGTTTACTTAGACAACAT  
 GGCTTTGAGGTTTCCCAAGATGTGTTTGAGAGATTTAAGGACAAGGAGGGAGGT  
 TTCAGTGGTGAACCTTAAAGGTGATGTGCAAGGGTTGCTGAGTCTATATGAAGCAT  
 10 CCTATCTTGGCTTTGAGGGAGAAAATCTCTTGGAGGAGGCAAGGACATTTTCAAT  
 AACACATCTCAAGAACAACCTAAAAGAAGGAATAAACACCAAAGTGGCAGAAC  
 AAGTTAGTCATGCACTGGAACTTCCCTATCATCAAAGATTGCATAGACTAGAAGC  
 ACGATGGTTCCTTGACAAATATGAACCAAAGGAACCCACCATCAGTTACTACTC  
 GAGCTTGCAAAGCTAGATTTCAATATGGTGCAAACATTGCACCAGAAAGAACTG  
 15 CAAGACCTGTCAAGGTGGTGGACGGAGATGGGGCTAGCAAGCAAGCTAGACTTT  
 GTCCGAGACAGATTAATGGAAGTGTATTTTTGGGCGTTGGGAATGGCACCTGATC  
 CTCAATTCGGTGAATGTCGTAAAGCTGTCACTAAAATGTTTGGATTGGTCACCAT  
 CATCGATGATGTATATGACGTTTATGGTACTTTGGATGAGCTACAACTCTTCACT  
 GATGCTGTTGAGAGATGGGACGTGAATGCCATAAACACACTTCCAGACTACATG  
 20 AAGTTGTGCTTCCTAGCACTTTATAACACCGTCAATGACACGTCTTATAGCATCCT  
 TAAAGAAAAAGGACACAACAACCTTTCCTATTTGACAAAATCTTGGCGTGAGTTA  
 TGCAAAGCATTTCCTTCAAGAAGCAAAATGGTCGAACAACAAAATCATTCAGCA  
 TTTAGCAAGTACCTGGAAAATGCATCGGTGTCCTCCTCCGGTGTGGCTTTGCTTG  
 CTCCTTCCTACTTCTCAGTGTGCCAACAACAAGAAGATATCTCAGACCATGCTCT  
 25 TCGTTCTTTAACTGATTTCCACGGCCTTGTGCGCTCCTCATGCGTCATTTTCAGAC  
 TCTGCAATGATTTGGCTACCTCAGCGGCTGAGCTAGAGAGGGGTGAGACGACAA  
 ATTCAATAATATCTTATATGCATGAGAATGACGGCACTTCTGAAGAGCAAGCACG  
 TGAGGAGTTGAGAAAATTGATCGATGCAGAGTGGAAGAAGATGAACCGAGAGC  
 GAGTTTCAGATTCTACACTACTCCCAAAGCTTTTATGGAAATAGCTGTTAACAT  
 30 GGCTCGAGTTTCGCATTGCACATACCAATATGGAGACGGACTTGGAAGGCCAGAG000065

CTACGCCACAGAGAATAGAATCAAGTTGCTACTTATAGACCCCTTTCCAATCAAT  
CAACTAATGTACGTG**TAA**

SEQ ID NO:2 Pueraria montana var. lobata (kudzu vino)  
isopreno sintasa maduro secuencia polipeptídica (que carece del  
5 péptido de tránsito)  
PWRVICATSSQFTQITEHNSRRS ANYQPNL WNFELQSLNDLKVEKLEEKATKLEEE  
VRCMINRVDTQPLSLLELIDDVQRLGLTYKFEKDIIKALENIVLLDENKKNKSDLHAT  
ALSFRLLRQHGFEVSQDVFERFKDKEGGFSGELKGDVQGLLSLYEASYLGFEGENLL  
EEARTFSITHLKNNLKEGINTKVAEQVSHALELPYHQRLHRLEARWFWDKYEPKEPH  
10 HQLLLELAKLDFNMVQTLHQKELQDLSRWWTMGLASKLDFVRDRLMEVYFWAL  
GMAPDPQFGECRKAVTKMFGGLVTIIDDVYDVYGTLDLDELQLFDAVERWDVNAINTL  
PDYMKLCFLALYNTVNDTSYSILKEKGHNLSYLTKS WRELCKAFLQEAKWSNNKII  
PAFSKYLENASVSSSGVALLAPSYFSVCQQQEDISDHALRSITDFHGLVRSSCVIFRLC  
NDLATSAAELERGETTNSIISYMHENDGTSEEQAREELRKLIDAEWKMMNRERVSDS  
15 TLLPKAFMEIAVNMARVSHCTYQYGDGLGRPDYATENRIKLLIDPFPINQLMYV

SEQ ID NO: 3 gen Synechocystis\_PCC6803\_optimizado\_kudzu  
IspS (gen S-k-ISP) de codificación de proteína madura (falta del  
péptido de tránsito). Codones de inicio e interrupción se indican  
en la fuente en negrita. Cuando se transforma en cianobacterias,  
20 esta secuencia optimizada de codón se expresó en 10-20 veces el  
nivel de la secuencia kudzu nativa no-optimizada de IspS.  
ATGCCCTGGCGTGTAATCTGTGCAACTTCTTCCCAATTTACTCAAATTACCGAGC  
ACAATTCCCGGCGTAGTGCCAACCTATCAACCCAATCTGTGGAACCTTGAGTTCTT  
ACAGAGCCTGGAAAATGATTTAAAGGTGAGAAATTGGAGGAGAAGGCCACTAA  
25 ATTGGAAGAGGAAGTGCGGTGTATGATTAATCGTGTAGACACCCAACCATTGAG  
TCTGTTAGAATTGATCGATGATGTGCAACGTCTCGGCCTGACATACAAATTCGAA  
AAAGATATCATTAAAGGCCCTAGAAAACATTGTCTTATTGGATGAAAACAAGAAA  
AATAAGTCTGACTTGCATGCCACCGCTTTAAGTTTCCGCTTGTTGCGGCAGCACG  
GCTTTGAAGTGTCCCAAGATGTTTTTGAACGGTTCAAAGACAAGGAGGGCGGCTT  
30 TTCCGGCGAACTCAAAGGGGATGTTTCAGGGCCTATTGTCTTTGTATGAAGCTAGT

. 0000066

TACTTGGGATTTGAAGGCGAGAATCTGTTAGAAGAAGCTCGCACTTTTTCCATTA  
CACATTTAAAGAACAACCTAAAGGAAGGGATTAACACAAAAGTGGCTGAGCAGG  
TGTCTCATGCTCTGGAGTTGCCGTATCATCAACGCTTACACCGGCTCGAAGCCCG  
CTGGTTTTTTGGATAAATATGAACCGAAAGAACCGCATCATCAATTACTGCTCGAA  
5 CTGGCGAAGCTGGACTTTAATATGGTCCAAACACTACATCAGAAAGAACTCCAG  
GACCTAAGTCGGTGGTGGACTGAAATGGGTCTGGCATCCAAGCTAGATTTTGTGC  
GCGACCGTTTGATGGAGGTGTACTTCTGGGCACTAGGCATGGCTCCCGACCCGCA  
GTTTGGTGAGTGTCGTAAGGCAGTGACCAAGATGTTTGGTTTAGTAACGATCATC  
GACGACGTTTACGATGTCTATGGCACCCCTAGACGAATTACAACCTCTTTACAGATG  
10 CCGTCGAACGTTGGGATGTTAATGCCATCAATACCTTACCTGATTACATGAAATT  
GTGCTTCCTCGCCTTGTATAATACCGTTAATGACACCAGCTATTCTATTCTGAAGG  
AAAAAGGCCACAATAACTTAAGCTACCTAACCAAAAGTTGGCGGGAATTGTGTA  
AGGCTTTCTTACAGGAAGCCAAATGGTCCAACAACAAAATTATCCCCGCATTTTC  
TAAATACCTGGAAAATGCCTCCGTGTCCTCTTCCGGGGTGGCTTTGCTAGCACCC  
15 AGCTACTTTTCTGTTTGTCTAGCAACAGGAGGACATCAGTGACCATGCCTTGCGGT  
CCTTAACGGACTTTCATGGCTTAGTGCGGAGTAGCTGCGTCATTTTTTCGTTTATGT  
AACGATTGGCTACAAGTGCTGCGGAATTGGAACGTGGGGAAACAACCAACAGC  
ATTATCAGTTATATGCACGAAAACGATGGCACCCAGTGAAGAGCAGGCACGGGAA  
GAACTGCGCAAATTAATCGACGCTGAATGGAAGAAGATGAATCGCGAACGTGTG  
20 TCTGATAGTACCTTATTACCTAAAGCCTTCATGGAAATTGCGGTGAATATGGCCC  
GCGTCAGTCATTGCACTTACCAATACGGCGATGGATTAGGTGCGCCCGATTACGC  
AACGGAAAATCGGATCAAATTGCTATTGATTGATCCGTTCCCAATTAATCAATTA  
ATGTACGTGTAA

. 000067

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

5

1.- Un método de producción de hidrocarburos de isopreno en una cianobacteria sp., el método que comprende:

introducción de un cartucho de expresión que comprende un ácido nucleico de codificación de isopreno sintasa en las cianobacterias sp., en donde el ácido nucleico de codificación de isopreno sintasa es operativamente enlazado a un promotor psbA2; y

cultivo de cianobacterias en condiciones en donde se expresa el ácido nucleico de codificación de isopreno sintasa.

15 2.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las cianobacterias son cultivadas en condiciones para lograr la homoplasma de ADN.

3.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el cartucho de expresión se introduce en el locus del gen PsbA2 y el promotor PsbA2 es el promotor de cianobacterias nativo.

4.- El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque las cianobacterias son cultivadas en condiciones en donde la expresión del gen isopreno sintasa es sensible a la intensidad de la luz.

5.- El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque las cianobacterias son cultivadas en una intensidad luminosa de aproximadamente  $50 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a aproximadamente  $2,500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

30 6.- El método de conformidad con la reivindicación 1,

000068

caracterizado porque las cianobacterias sp. son unicelulares.

7.- El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque cianobacterias sp. unicelulares son un *Synechocystis* sp. o un *Synechococcus* sp.

5 8.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las cianobacterias sp. son multicelulares.

9.- El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque las cianobacterias sp. multicelulares son *Gloeocapsa* sp.

10 10.- El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque las cianobacterias multicelulares sp son cianobacterias filamentosas sp.

11.- El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque las cianobacterias filamentosas sp son  
15 *Nostoc* sp, *Anabaena* sp o *Arthrospira* sp.

12.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el ácido nucleico codifica un isopreno sintasa que comprende aminoácido SEQ ID NO: 2.

13.- El método de conformidad con la reivindicación 12,  
20 caracterizado porque el ácido nucleico es una variante ajustado de codón de SEQ ID NO: 1 donde codones utilizados con una frecuencia promedio de menos de 12% por *Synechocystis* se reemplazan por codones más frecuentemente usados.

14.- El método de conformidad con la reivindicación 12,  
25 caracterizado porque el isopreno sintasa ácido nucléico comprende SEQ ID NO: 3.

15.- Una población celular de las cianobacterias, en donde las cianobacterias comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica isopreno sintasa y está vinculado operablemente a un  
30 promotor de *PsbA2*.

. 000069

16.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque las cianobacterias son cianobacteria unicelular sp.

5 17.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 16, caracterizada porque las cianobacterias unicelulares sp son *Synechocystis* sp o *Synechococcus* sp.

10 18.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque las cianobacterias son cianobacterias sp multicelulares.

19.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 18, caracterizada porque las cianobacterias multicelulares sp son *Gloeocapsa* sp.

15 20.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 18, caracterizada porque las cianobacterias multicelulares sp es una cianobacteria sp filamentosa.

20 21.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 20, caracterizada porque las cianobacterias filamentosas sp son *Nostoc* sp, *Anabaena* sp o *Arthrospira* sp.

25 22.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque el ácido nucleico heterólogo codifica un isopreno sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

23.- Un método de producción de hidrocarburos de isopreno en una cianobacteria que comprende un ácido nucleico heterólogo, el método que comprende:

30 cultivo de masa de una población celular de cianobacterias como se expone en la reivindicación 15 en un

000070

biorreactor cerrado en condiciones en donde se expresa el gen de isopreno sintasa; y

recolección de hidrocarburos volátiles de isopreno producidos por las cianobacterias.

5           24.- El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque las cianobacterias son una cianobacteria unicelular sp.

          25.- El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque las cianobacterias unicelulares sp son  
10   Synechocystis sp o Synechococcus sp.

          26.- El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque las cianobacterias son cianobacterias sp multicelulares.

          27.- El método de conformidad con la reivindicación 26,  
15   caracterizada porque las cianobacterias multicelulares sp son Gloeocapsa sp.

          28.- El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque las cianobacterias multicelulares sp es una cianobacteria sp filamentosa.

20           29.- El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque las cianobacterias filamentosas sp son Nostoc sp, Anabaena sp o Arthrospira sp.

          30.- Un ácido nucleico de codificación de un isopreno sintasa que comprende aminoácido SEQ ID NO: 2, en donde el ácido  
25   nucleico es una variante ajustada de codón de SEQ ID NO: 1 donde codones utilizados con una frecuencia promedio de menos de 12% por Synechocystis se reemplazan por codones más frecuentemente usados.

          31. El ácido nucleico de conformidad con la  
30   reivindicación 30, caracterizado porque el ácido nucleico

000071

comprende la secuencia enunciada en SEQ ID NO: 3.

32.- Un vector que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 30 o 31.

5 33.- Una población celular de cianobacterias, en donde las células en la población comprenden el ácido nucleico de la reivindicación 30 o 31 o un vector de la reivindicación 32.

34.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 33, caracterizada porque las cianobacterias es una especie unicelular.

10 35.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 34, caracterizada porque que las cianobacterias unicelulares sp es un sp *Synechocystis* o un sp *Synechococcus*.

15 36.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 33, caracterizada porque las cianobacterias es una cianobacteria sp multicelular.

37.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 36, caracterizada porque las cianobacterias multicelulares sp es una *Gloeocapsa* sp.

20 38.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 36, caracterizada porque que las cianobacterias multicelulares sp es una cianobacteria sp filamentosa.

25 39.- La población celular de cianobacterias de conformidad con la reivindicación 38, caracterizada porque las cianobacterias filamentosas sp es un *Nostoc* sp, una *Anabaena* sp o una *Arthrospira* sp.

000072

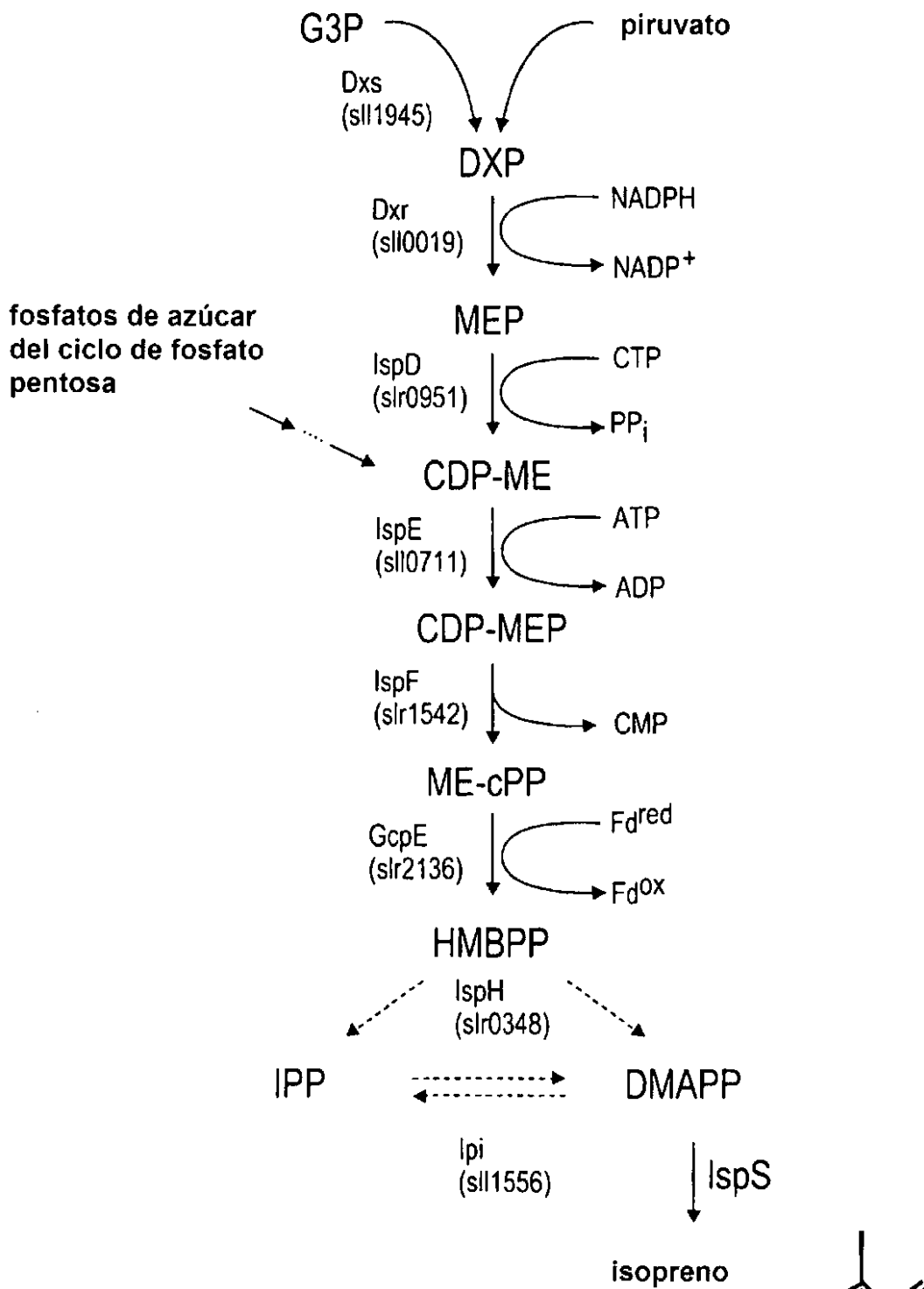
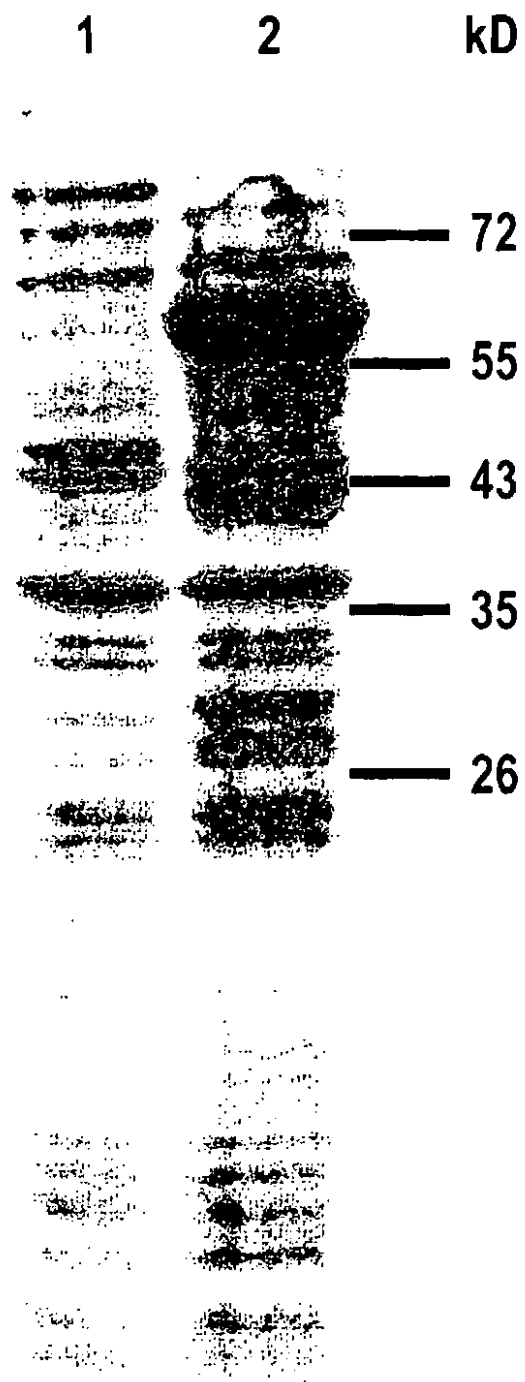


FIG. 1

000073

**FIG. 2**

000074

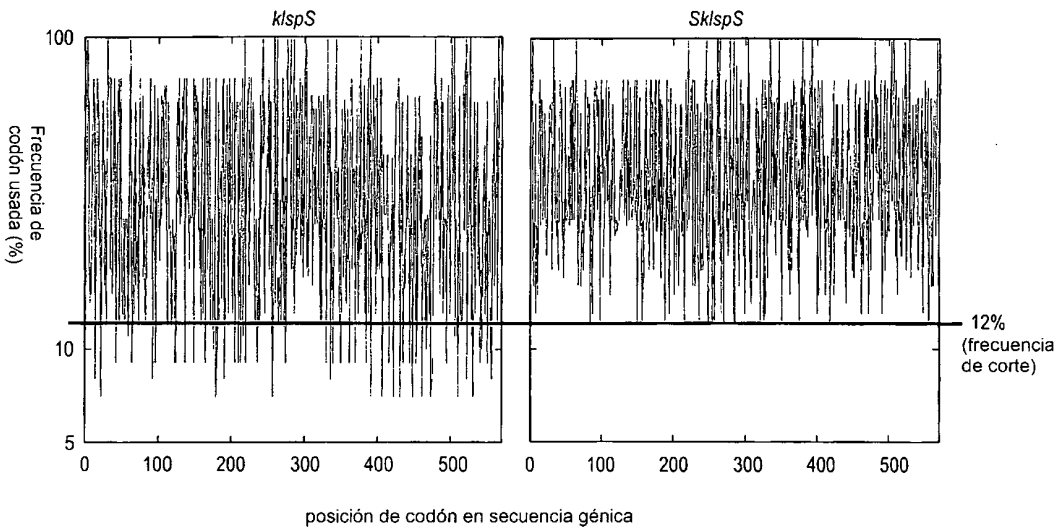


FIG. 3

000075

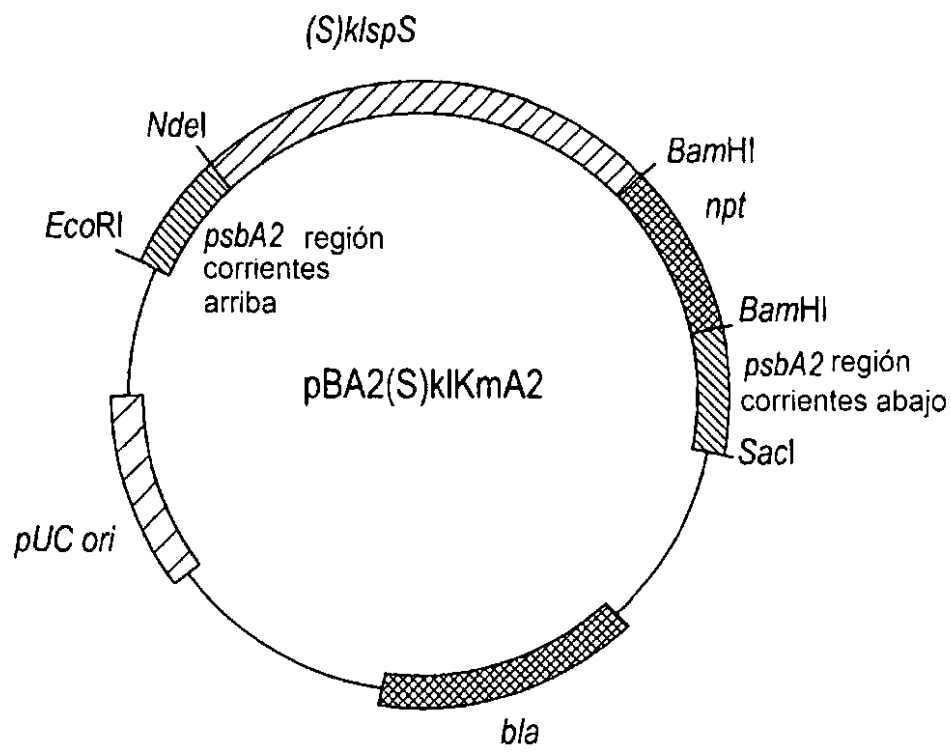


FIG. 4

000076

5

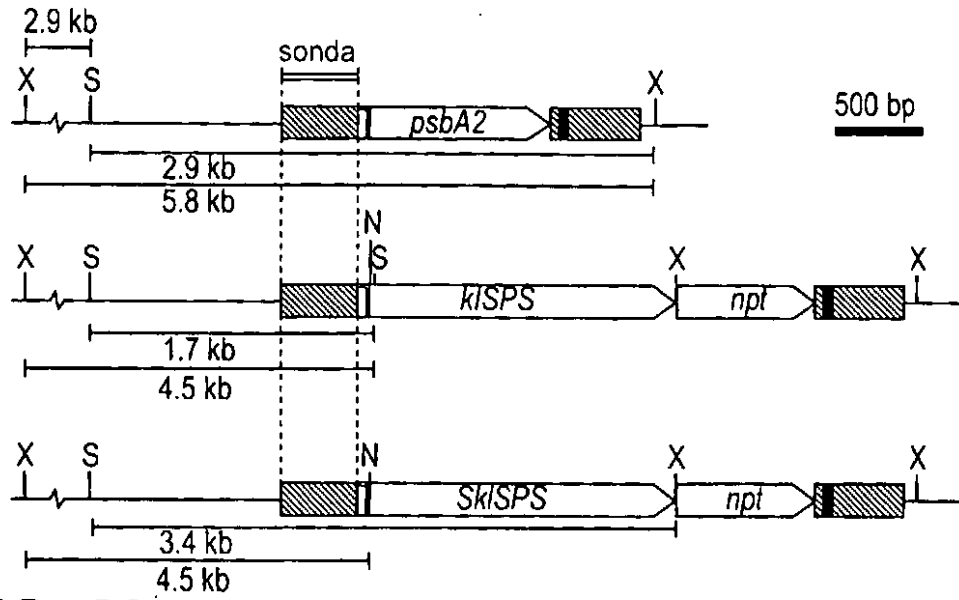


FIG. 5A

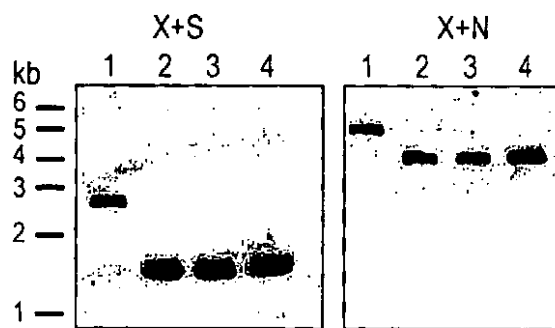


FIG. 5B

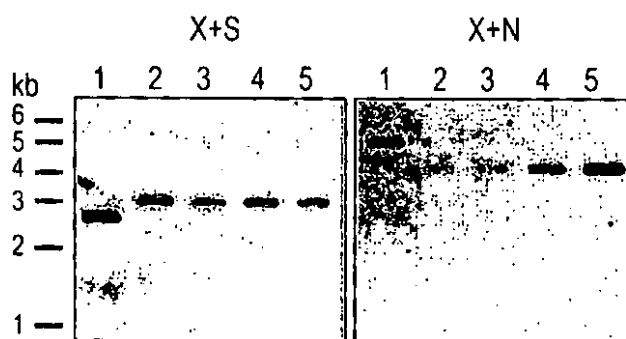


FIG. 5C

000077

**FIG. 6A** *klspS*

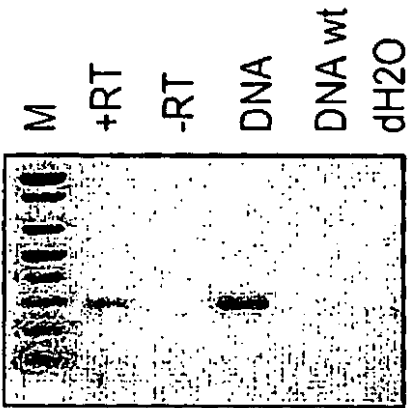
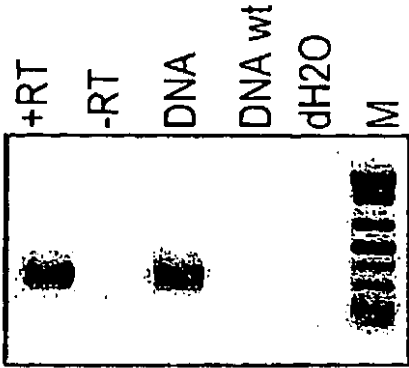


**FIG. 6B** *SklspsS*



000078

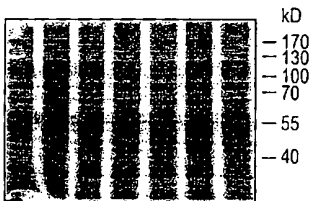
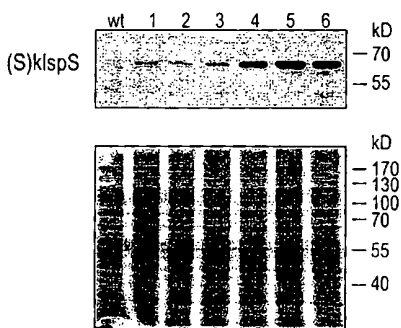


FIG. 7A

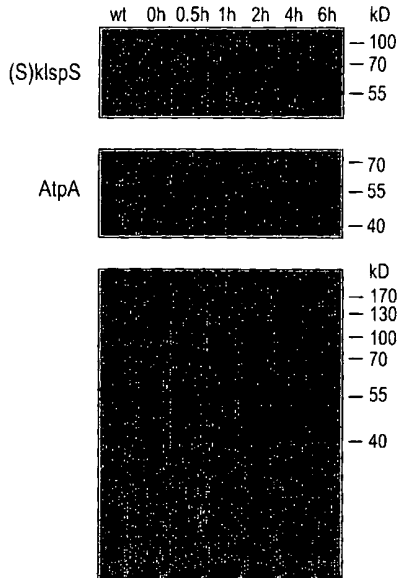


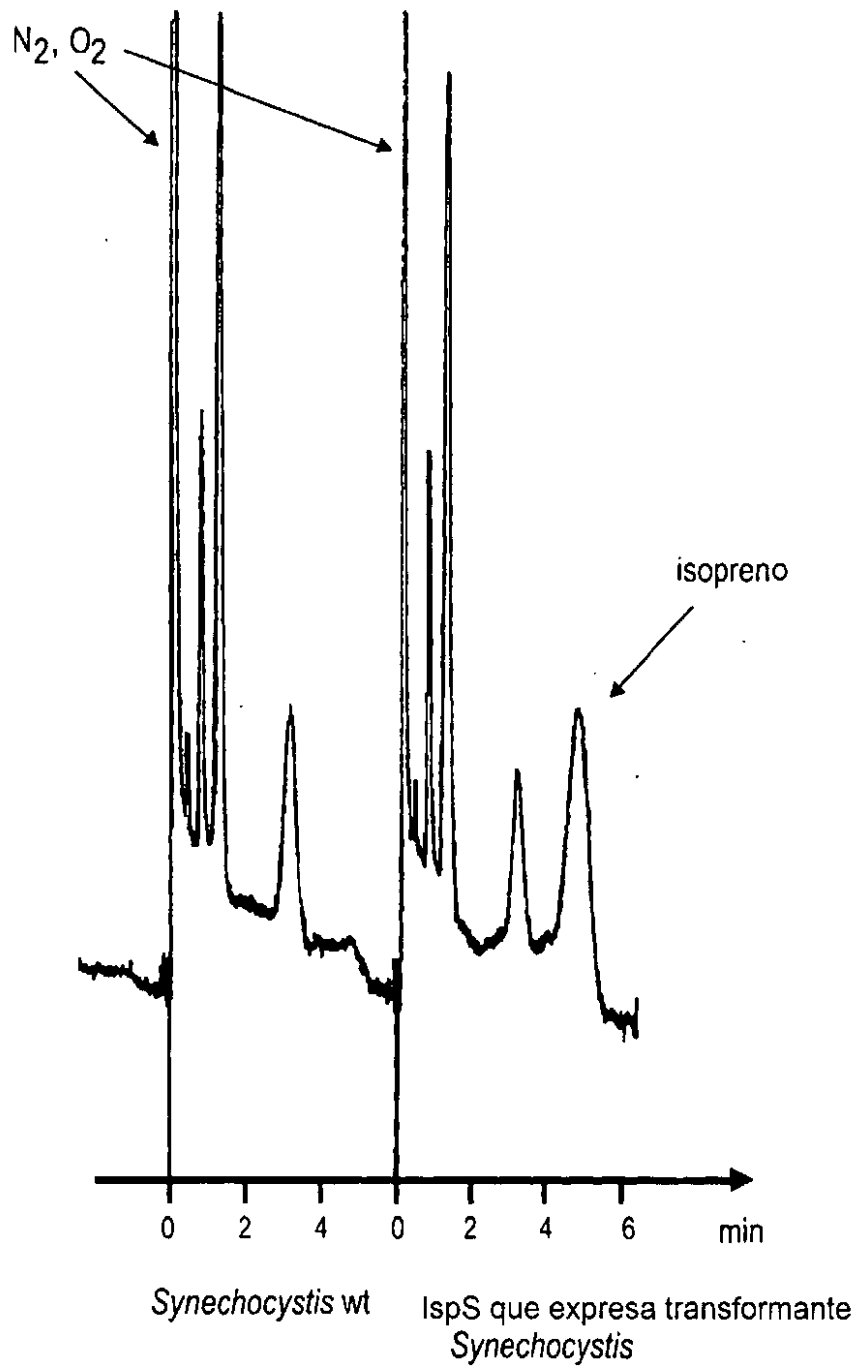
FIG. 7B

000079

5

10

15

**FIG. 8**

000080

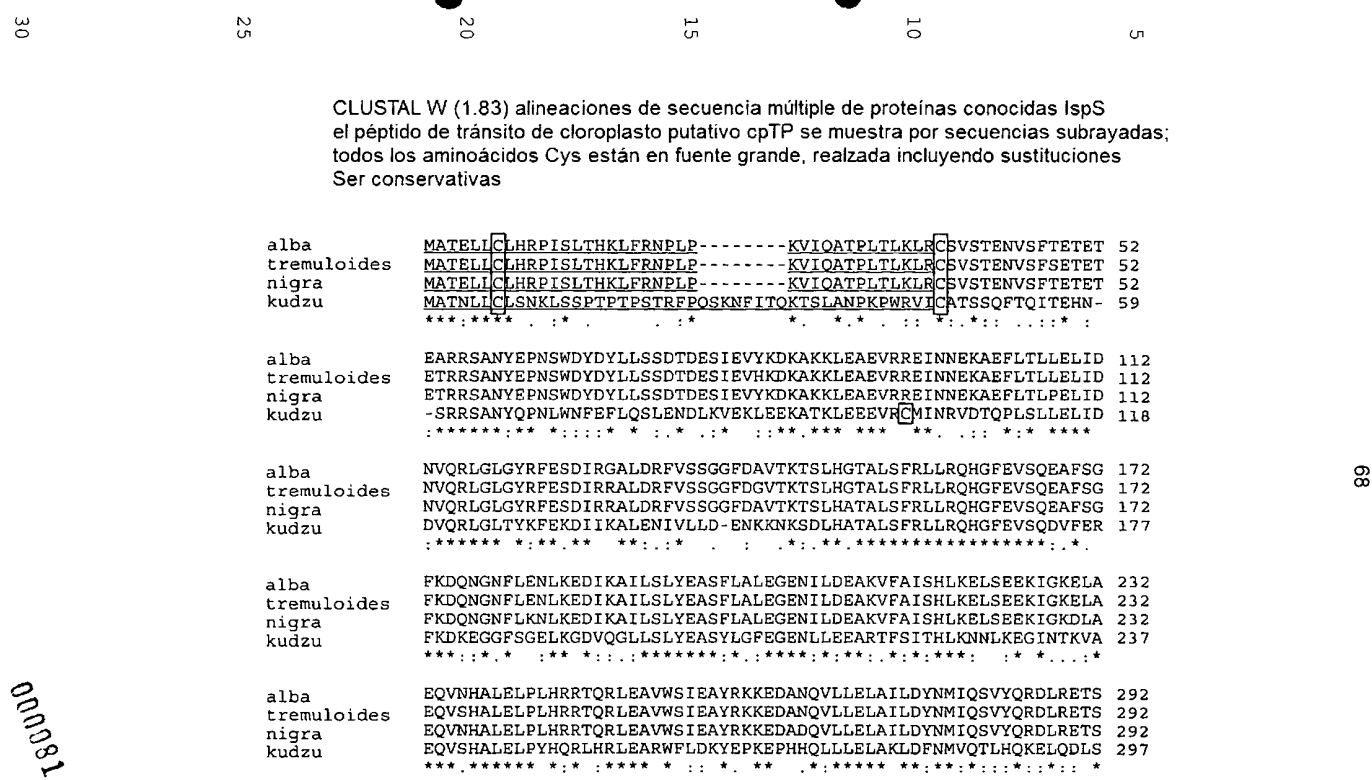


FIG. 9

000082

|             |                                                                   |     |
|-------------|-------------------------------------------------------------------|-----|
| alba        | RWRRVGLATKLHFARDRLIESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSFVTIIDDYDVYG        | 352 |
| tremuloides | RWRRVGLATKLHFARDRLIESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSFVTIIDDYDVYG        | 352 |
| nigra       | RWRRVGLATKLHFARDRLIESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSFVTIIDDYDVYG        | 352 |
| kudzu       | RWTEMGLASKLDFVRDRLEMEVYFWALGMAPDPQFGECKKAVTKMFGLVTIIDDYDVYG       | 357 |
|             | *** :;***;*.*.***;* :;***;* :;*:;*.***;*****;*****                |     |
| alba        | TLDELELFTDAVERWDVNAINDLDPYMKICFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILPYLTKA      | 412 |
| tremuloides | TLDELELFTDAVERWDVNAINDLDPYMKICFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILPYLTKA      | 412 |
| nigra       | TLDELELFTDAVERWDVNAINDLDPYMKICFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILPYLTKA      | 412 |
| kudzu       | TLDELQLFTDAVERWDVNAINTLDPYMKICFLALYNTVNDTSYSILKEKGHNLSYLTKS       | 417 |
|             | *****;*****;*****;*****;*. :;*. **;*. * .*****;                   |     |
| alba        | WADICNAFLQEAKWLYNKSTPTFDDYFGNAWKSSSGPLQLVFAYFAVVQN---IKKEEIE      | 469 |
| tremuloides | WADICNAFLQEAKWLYNKSTPTFDDYFGNAWKSSSGPLQLIFAYFAVVQN---IKKEEIE      | 469 |
| nigra       | WADICNAFLQEAKWLYNKSTPTFDEYFGNAWKSSSGPLQLVFAYFAVVQN---IKKEEID      | 469 |
| kudzu       | WREHCNAFLQEAKWSNNKIIPAFSKYLENASVSSSGVALLAPSYFSVCCQQQEDISDHALR     | 477 |
|             | * :;*.***** ** :;*. :; ** ***** * :;*. * :; * . . .               |     |
| alba        | NLQKYHDTISRHSIFRICNDLASASAEIARGETANSVSCYMR-TKGISEELATESVMNL       | 528 |
| tremuloides | NLQKYHDIISRHSIFRICNDLASASAEIARGETANSVSCYMR-TKGISEELATESVMNL       | 528 |
| nigra       | NLQKYHDIISRHSIFRICNDLASASAEIARGETANSVSCYMR-TKGISEELATESVMNL       | 528 |
| kudzu       | SLTDFHGLVRSQCIVIFRICNDLATSAEELERGETTNSIISYMHENDGTSEEQAREELRKL     | 537 |
|             | . * :;*. :; . . *****;*:;*: *****; . **; . . * * * * * . :; *     |     |
| alba        | IDETWKKMNKEKLGS-LFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVLSVIT       | 587 |
| tremuloides | IDETWKKMNKEKLGS-LFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVLSVIT       | 587 |
| nigra       | IDETWKKMNKEKLGS-LFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVLSVIT       | 587 |
| kudzu       | IDAEWKKMNRERVSDSTLLPKAFMEIAVNMARVSHCTYQYGDGLGRPDYATENRIKLLLI      | 597 |
|             | ** *****;*. :; * . :;*. * :;*. * * * * * *****; ** . ** * . :; :; |     |
| alba        | EPILPFER---                                                       | 595 |
| tremuloides | EPILPFER---                                                       | 595 |
| nigra       | EPILPFER---                                                       | 595 |
| kudzu       | DFFPINQLMYV                                                       | 608 |
|             | :* :                                                              |     |

FIG. 9 (CONT.)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau

(43) International Publication Date  
4 November 2010 (04.11.2010)

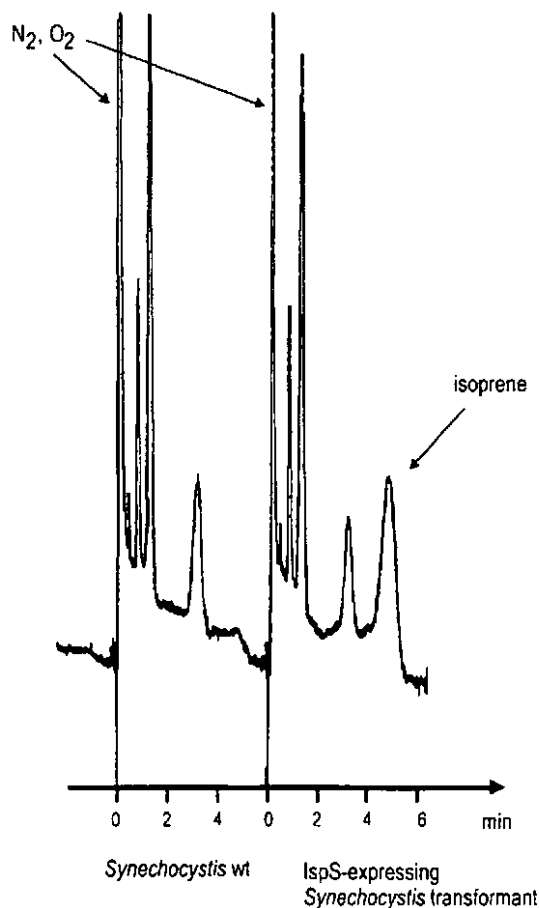


(10) International Publication Number  
**WO 2010/127290 A3**

- (51) International Patent Classification:  
*C12N 15/63* (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)  
*C12P 5/00* (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)  
*C12N 15/52* (2006.01)
- (21) International Application Number:  
PCT/US2010/033240
- (22) International Filing Date:  
30 April 2010 (30.04.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
61/174,729 1 May 2009 (01.05.2009) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, California 94607-5200 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): MELIS, Anastasios [US/US]; 2745 Del Monte Avenue, El Cerrito, California 94530 (US). LINDBERG, Pia [SE/SE]; Gropgrand 3 SE, 75310 Uppsala (SE).
- (74) Agents: LOCKYER, Jean M. et al.; Townsend and Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, California 94111-3834 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

[Continued on next page]

(54) Title: IMPROVED ISOPRENE HYDROCARBON PRODUCTION USING GENETICALLY ENGINEERED CYANOBACTERIA



(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for producing isoprene hydrocarbons from cyanobacteria.

FIG. 8

000083

WO 2010/127290 A3



AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) **Date of publication of the international search report:**

24 March 2011

000084



No. 11-147941- -00000-0000

Fecha: 2011-11-01 14:46:13  
Tra. 11 PATENTE/II  
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Eve: 378 FASENACIONAL  
Folios: 84

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

|                                   |                                                                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una patente.                                             |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud   |
| <input type="checkbox"/>          | Descripción de la invención                                                         |
| <input type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                    |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                 |

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

|                                   |                                                                                                                         |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una PCT                                                                                      |
| <input type="checkbox"/>          | Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) |
| <input type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                                                        |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                                     |

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita Diseño industrial                                                              |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                       |

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita un esquema de trazado                                  |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica de un esquema de trazado                                   |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                               |