

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-154203-00000-0000

Fecha: 2013-06-28 16:19:53
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 4

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

13-154203

54. TÍTULO **"MICROORGANISMOS RESISTENTES A
ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO".**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C12N 1/20**

71. SOLICITANTE **JOULE UNLIMITED TECHNOLOGIES, INC**

DOMICILIO **BEDFORD, ESTADO DE
MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. _____



No. 13-154203-00000-0000

Fecha: 2013-06-28 16:19:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

adicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL-PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/071250	Fecha 21/12/12
Publicación Internacional No.			Fecha
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:		
"MICROORGANISMOS RESISTENTES A ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO"			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
C12N 1/20			
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
4. JOULE UNLIMITED TECHNOLOGIES, INC			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		18 Crosby Drive, Bedford, MA 01730, Estados Unidos de América.	No. TELÉFONO 3264270
CIUDAD		Bedford	E-MAIL notificacionespatentes@lloredacamacho.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		Massachusetts	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. CONNOR 2. SKRALY		Michael Frank, A.	Estados Unidos de América
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Estados Unidos de América	Massachusetts	Bedford	c/o Joule Unlimited Technologies, Inc, 18 Crosby Drive, Bedford, Massachusetts 01730, Estados Unidos de América.
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	(74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE		ALICIA	C.C 39.690.713 T.P .53.215
DIRECCIÓN		Calle 72 No 5-83 Piso 5to	No. TELÉFONO 3264270
CIUDAD		Bogotá	E-MAIL notificacionespatentes@lloredacamacho.com
PAÍS		Colombia	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América		US	61/580,094	11/12/23
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro	
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.			☐ Hoja de información complementaria.	
			☐ Otros, especificar	
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de Internet.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-0061817	Fecha 25-06-13	
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
				
ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante				
C.C. 39.690.713 T.P. 53.215 Apoderado				
16	ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica		Documentación Jurídica		
Solicitud Internacional en castellano				
1. ☒ Descripción N° de folios: 57		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 32		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 4		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.		
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
8. ☒ Anexo formato digital.		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

•

VER ANEXO CD

•

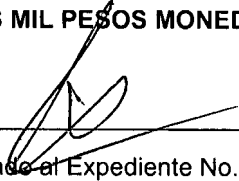
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0061817
		Bogotá D.C., Junio 25 de 2013 - 07:49:17

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.					NI 830.022.145	
*** Soporte del Pago ***						
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO	
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	534292846	24/06/2013	18.408.000.00	

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
**
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-154203- -00000-0000
Fecha: 2013-06-28 16:19:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



No. 13-154203-00000-0000

Fecha: 2013-06-28 16:19:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI)
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO

☐	Indicación que se solicita una pater.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

MICROORGANISMOS RESISTENTES A ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente divulgación identifica rutas y mecanismos para conferir resistencia a especies reactivas de oxígeno, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, a organismos fotoautotróficos. Está contemplado el uso de tales organismos en sistemas de cultivo de célula hospedera con altos niveles de especies reactivas de oxígeno, tales como sistemas de cultivo de célula hospedera descontaminados con peróxido de hidrógeno.

SECTOR: Industria química y farmacéutica, específicamente un método para producir un producto a base de carbono mediante organismos fotoautotróficos modificados para resistir especies reactivas de oxígeno, así como también un método para conferir a dichos organismos resistencia al peróxido de hidrógeno.

MICROORGANISMOS RESISTENTES A ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 61/580,094, presentada el 23 de Diciembre de 2011, cuya divulgación se incorpora a la presente mediante referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contienen un Listado de Secuencias que ha sido presentado en formato ASCII via EFS-Web y se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 20 de Diciembre de 2012, se ha denominado 21978PCT_CRF_SecuenciaListing.txt y es de 14,384 bytes en tamaño.

ANTECEDENTES

[0003] Los microorganismos fotosintéticos recombinantes han sido modificados mediante ingeniería genética para producir productos de interés a base de carbono. Para maximizar los rendimientos de los microorganismos fotosintéticos recombinantes, su productividad y viabilidad deben ser optimizadas. El control de la contaminación del cultivo de microorganismo también es crucial, dado que los contaminantes pueden competir directamente por los nutrientes o consumir el producto final deseado. Adicionalmente, la contaminación puede inhibir la producción de hidrocarburos realizada por los microorganismos fotosintéticos recombinantes. Por lo tanto, se necesitan un sistema para inhibir la contaminación, y un microorganismo fotosintético recombinante

modificado mediante ingeniería genética para maximizar la viabilidad en este sistema.

RESUMEN

[0004] En el presente documento se revelan composiciones y métodos para producir un producto de interés a base de carbono. En una realización, se proporciona un método para producir un producto de interés a base de carbono, que comprende cultivar una célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética en un cultivo celular en la presencia de CO₂ y luz bajo condiciones adecuadas para producir un producto de interés a base de carbono, en donde la célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una enzima clasificada bajo un número de la Comisión Enzimática seleccionado a partir de EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, y EC 1.11.1.21.

[0005] En otra realización, la enzima codificada por el ácido nucleico recombinante tiene actividad de catalasa. En otra realización, la enzima tiene actividad de peroxidasa. En algunas realizaciones, la enzima se selecciona a partir de KatG y KatE. En otra realización, la enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones, la enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, al menos 99.1%, al menos 99.2%, al menos 99.3%, al menos 99.4%, al menos 99.5%, al menos 99.6%, al menos 99.7%, al menos 99.8%, o al menos 99.9% idéntica a la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 4. En otras realizaciones, la enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos

99%, al menos 99.1%, al menos 99.2%, al menos 99.3%, al menos 99.4%, al menos 99.5%, al menos 99.6%, al menos 99.7%, al menos 99.8%, o al menos 99.9% idéntica a la SEQ ID NO: 4.

[0006] En algunas realizaciones, el cultivo celular comprende adicionalmente peróxido de hidrógeno. En ciertas realizaciones, el peróxido de hidrógeno en el cultivo celular está a una concentración de desde 0.1 hasta 50 mM. En otras realizaciones, el cultivo celular comprende un reactivo para mitigar la contaminación del cultivo celular. En algunas realizaciones, el cultivo celular está expuesto a condiciones de luz diurna.

[0007] En una realización, la célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética tiene una tasa de producción de etanol en el cultivo celular igual o más alta que una célula cianobacteriana de cualquier otra forma idéntica que carece del ácido nucleico recombinante. En una realización, la tasa de producción de etanol de un cultivo de células cianobacterianas modificadas mediante ingeniería genética es mayor que una tasa seleccionada a partir de: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, y 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$. En algunas realizaciones, la tasa de producción de etanol de un cultivo de células cianobacterianas modificadas mediante ingeniería genética varía desde 50-100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$, 100-150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$, 150-200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$, 250-300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$, 300-350 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$, o 350-400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$. En una realización, la tasa de producción de etanol de un cultivo de las células cianobacterianas modificadas mediante ingeniería genética es mayor que una tasa seleccionada a partir de: 13, 14, 15, y 16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. En algunas realizaciones, la tasa de producción de etanol de un cultivo de las células cianobacterianas modificadas mediante ingeniería genética está entre: 13-14 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 14-15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 15-16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, y 16-17 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. En algunas realizaciones, la masa de etanol producida mediante un cultivo de células cianobacterianas modificadas

mediante ingeniería genética por volumen del cultivo es mayor que una cantidad seleccionada a partir de: 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, y 8 g/L. En algunas realizaciones, la masa de etanol producida mediante un cultivo de células cianobacterianas modificadas mediante ingeniería genética por volumen del cultivo varía desde 1.5-2 g/L, 2-2.5 g/L, 2.5-3 g/L, 3-3.5 g/L, 3.5-4 g/L, 4-4.5 g/L, 4.5-5 g/L, 5-5.5 g/L, 5.5-6 g/L, 6-6.5 g/L, 6.5-7 g/L, 7-7.5 g/L, 7.5-8 g/L, o 8-8.5 g/L. En algunas realizaciones, esta cantidad de etanol se produce durante hasta 30 días de cultivo. En algunas realizaciones, esta cantidad de etanol se produce durante el curso de 15-20 días, 20-25 días, 25-30 días, o 30-35 días.

[0008] En una realización, la célula cianobacteriana es un etanológeno. En algunas realizaciones, la célula cianobacteriana es una especie de *Synechococcus*. En ciertas realizaciones, la especie de *Synechococcus* es *Synechococcus* PCC 7002.

[0009] En la presente también se proporciona un método para conferir resistencia al peróxido de hidrógeno a una célula cianobacteriana original, el método comprende transformar la célula cianobacteriana original con un ácido nucleico que codifica una enzima seleccionada de KatG y KatE, resultando en una célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética, y cultivar la célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética en un medio que comprende peróxido de hidrógeno.

[0010] En una realización, el peróxido de hidrógeno en dicho medio está en una concentración de 0.1 a 50 mM. En una realización, la célula cianobacteriana original es un etanológeno. En algunas realizaciones, la célula cianobacteriana original es una especie de *Synechococcus*. En ciertas realizaciones, la especie de *Synechococcus* es *Synechococcus* PCC 7002.

[0011] En una realización, la enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3. En otra realización, la enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética tiene una tasa de producción de etanol incrementada o idéntica comparada con la célula cianobacteriana original.

[0012] En el presente documento también se revela una célula hospedera modificada mediante ingeniería genética que comprende un gen recombinante que codifica una primera enzima clasificada bajo un número de Comisión Enzimática seleccionado a partir de EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, y EC 1.11.1.21, en donde dicha célula hospedera comprende adicionalmente una piruvato descarboxilasa recombinante o una alcohol deshidrogenasa recombinante.

[0013] En algunas realizaciones, la célula hospedera es una cianobacteria. En ciertas realizaciones, la cianobacteria es *Synechococcus* PCC 7002. En algunas realizaciones, la primera enzima se selecciona de KatG y KatE. En una realización, la primera enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3. En otra realización, la primera enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 4.

[0014] Estas y otras realizaciones de la invención se describen adicionalmente en las Figuras, Descripción, Ejemplos y Reivindicaciones, aquí presentadas.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0015] La **Figura 1** muestra el crecimiento (A) y la producción de etanol (B) en cultivos de cepas de JCC1510 (original) y JCC2979 (modificada mediante ingeniería genética para expresar katG heteróloga) de cianobacterias etanologénicas expuestas a luz continua.

[0016] La **Figura 2** muestra el crecimiento (A) y la producción de etanol (B) en cultivos de cepas de JCC1510 (original) y JCC2979 (modificada mediante ingeniería genética para expresar katG heteróloga) de cianobacterias etanologénicas expuestas a condiciones naturales de luz (ciclos de 12 horas luz/oscuridad).

[0017] La **Figura 3** muestra el crecimiento en cultivos de cepas de JCC1581 (original) y JCC3351 (modificada mediante ingeniería genética para expresar katG heteróloga) de cianobacterias etanologénicas expuestas a niveles seleccionados de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los paneles A y B muestran el resultado del crecimiento del cultivo desde un punto de partida de $\text{OD}_{730} = 0.1$. Los paneles C y D muestran el resultado del crecimiento del cultivo desde un punto de partida de $\text{OD}_{730} = 3.0$. Los paneles B y D muestran los valores normalizados de OD_{730} calculados dividiendo cada valor medido de OD_{730} después de 24 horas por el valor absoluto más alto de OD_{730} después de 24 horas.

[0018] La **Figura 4** muestra el crecimiento (A) y la producción de etanol (B) en cultivos de cepas de JCC1581 (original) y JCC3351 (modificada mediante ingeniería genética para expresar katG heteróloga) de cianobacterias etanologénicas expuestas a condiciones naturales de luz (ciclos de 12 horas luz/oscuridad).

DESCRIPCION DETALLADA

[0019] A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos tendrán los significados que son comúnmente comprendidos por aquellos normalmente versados en la materia. Adicionalmente, a menos que sea requerido lo contrario por el contexto, los términos en singular incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular. De manera general, las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y las técnicas de, bioquímica, enzimología, biología molecular y celular, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la materia.

[0020] Los métodos y técnicas de la presente divulgación son realizados generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en el estado de la técnica y como se han descrito en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente descripción a menos que se indique lo contrario. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992, y Suplementos hasta 2002); Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990); Taylor y Drickamer, *Introduction to Glycobiology*, Oxford Univ. Press (2003); *Worthington Enzyme Manual*, Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.; *Handbook of Biochemistry: Section A Proteins*, Vol I, CRC Press (1976); *Handbook of Biochemistry: Section A Proteins*, Vol II, CRC Press (1976); *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999).

[0021] Una persona versada en la materia también reconocería, a la luz de las enseñanzas aquí presentadas, que los métodos y las composiciones descritas aquí para uso en organismos particulares, por ejemplo, cianobacterias, también son aplicables a otros organismos, por ejemplo, bacterias Gram-negativas tales como *E. coli*. Por ejemplo, podría diseñarse una proteína integral de membrana plasmática quimérica para facilitar el eflujo de alcanos en *E. coli* fusionando una secuencia pseudo líder derivada de *E. coli* o una bacteria relacionada a una proteína integral de membrana plasmática heteróloga.

[0022] Se entenderá que los siguientes términos tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario:

[0023] El término “polinucleótido” o “molécula de ácido nucleico” hace referencia a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud. El término incluye moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico o sintético) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm o ARN sintético), así como también análogos de ADN o ARN que contengan análogos de nucleótidos no naturales, enlaces internucleósidos no nativos, o ambos. El ácido nucleico puede estar en cualquier conformación topológica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser de hebra sencilla, de doble hebra, de triple hebra, de cuádruplex, parcialmente de doble hebra, ramificado, de horquilla, circular, o en una conformación encadenada.

[0024] A menos que se indique lo contrario, y como un ejemplo para todas las secuencias descritas en el presente documento bajo el formato general “SEQ ID NO:”, “ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:1” hace referencia a un ácido nucleico, del cual al menos una porción tiene bien sea (i) la secuencia de la SEQ ID NO:1, o (ii) una secuencia complementaria a la SEQ ID NO:1. La elección entre las dos está

determinada por el contexto. Por ejemplo, si el ácido nucleico se utiliza como una sonda, la elección entre las dos está dictada por el requerimiento de que la sonda sea complementaria al a la diana deseada.

[0025] Un ARN, ADN o un polímero mezclado “aislado” es uno que está sustancialmente separado de otros componentes celulares que acompañan de forma natural al polinucleótido nativo en su célula hospedera natural, por ejemplo, ribosomas, polimerasas y secuencias genómicas con las cuales está asociado naturalmente.

[0026] Tal como se utiliza en el presente documento, una molécula orgánica “aislada” (por ejemplo, un alcano, alqueno, o alcanal) es una que está sustancialmente separada de otros componentes celulares (lípidos de membrana, cromosomas, proteínas) de la célula hospedera a partir de la cual se originó, o del medio en el cual la célula hospedera se cultivó. El término no requiere que la biomolécula haya sido separada de todos los otros compuestos químicos, aunque ciertas biomoléculas aisladas pueden ser purificadas hasta casi homogeneidad.

[0027] El término “recombinante” hace referencia a una biomolécula, por ejemplo, un gen o una proteína, que (1) ha sido removida de su entorno de origen natural, (2) no está asociada con el todo o una porción de un polinucleótido en el cual el gene se encuentra en la naturaleza, (3) está enlazada operativamente a un polinucleótido al cual no está enlazada en la naturaleza, o (4) no se produce en la naturaleza. El término “recombinante” puede ser utilizado en referencia a ADNs clonados aislados, análogos de polinucleótidos químicamente sintetizados, o análogos de polinucleótidos que son sintetizados biológicamente mediante sistemas heterólogos, así como también por proteínas y/o ARNms codificados por tales ácidos nucleicos.

[0028] Tal como se utiliza en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico endógena en el genoma de un organismo (o la proteína codificada producto de esa secuencia) es considerada “recombinante” en el presente documento si una secuencia heteróloga está ubicada adyacente a la secuencia de ácido nucleico endógena, de forma tal que la expresión de esta secuencia de ácido nucleico endógena está alterada. En este contexto, una secuencia heteróloga es una secuencia que no es naturalmente adyacente a la secuencia de ácido nucleico endógena, así la secuencia heteróloga sea en sí misma endógena o no (procedente de la misma célula hospedera o progenie de la misma) o exógena (procedente de una célula hospedera diferente o progenie de la misma). A manera de ejemplo, una secuencia promotora puede ser sustituida (por ejemplo, mediante recombinación homóloga) por el promotor nativo de un gen en el genoma de una célula hospedera, de forma tal que este gen tiene un patrón de expresión alterado. Este gen puede convertirse ahora en “recombinante” debido a que está separado de al menos algunas de las secuencias que naturalmente lo flanquean.

[0029] Un ácido nucleico también es considerado “recombinante” si contiene cualquier modificación que no se produce naturalmente para el ácido nucleico correspondiente en un genoma. Por ejemplo, una secuencia codificante endógena se considera “recombinante” si contiene una inserción, delección o un punto de mutación introducida artificialmente, por ejemplo, mediante la intervención humana. Un “ácido nucleico recombinante” también incluye un ácido nucleico integrado dentro del cromosoma de una célula hospedera en un sitio heterólogo y un constructo de ácido nucleico presente como un episoma.

[0030] Tal como se utiliza en el presente documento, la frase “variante degenerada” de una secuencia de ácido nucleico de referencia abarca secuencias de ácidos nucleicos que pueden ser traducidas, de acuerdo

con el código genético estándar, para proporcionar una secuencia de aminoácido idéntica a aquella traducida a partir de la secuencia de ácido nucleico de referencia. El término “oligonucleótido degenerado” o “cebador degenerado” se utiliza para definir un oligonucleótido capaz de hibridación con secuencias de ácidos nucleicos diana que no son necesariamente idénticas en secuencia pero que son homólogas entre sí dentro de uno o más segmentos particulares.

[0031] El término “porcentaje de identidad de secuencia” o “idéntico(a)” en el contexto de secuencias de ácidos nucleicos hace referencia a los residuos en las dos secuencias que son los mismos cuando están alineadas para correspondencia máxima. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede estar por encima de un tramo de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, usualmente al menos aproximadamente 20 nucleótidos, más usualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 32 nucleótidos, y en algunos casos al menos aproximadamente 36 o más nucleótidos. Existe un número de algoritmos diferentes conocidos en el estado de la técnica que pueden ser utilizados para medir la identidad de secuencia de nucleótido. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótido pueden ser comparadas utilizando FASTA, Gap o Bestfit, los cuales son los programas en Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wis. FASTA proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y búsqueda. Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990) (incorporado al presente documento mediante referencia en su totalidad). Por ejemplo, puede determinarse el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácidos nucleicos utilizando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de clasificación) o

utilizando Gap con sus parámetros por defecto tal como son proporcionados en GCG Version 6.1, incorporado al presente documento mediante referencia. De manera alternativa, las secuencias pueden compararse utilizando el programa de computador, BLAST (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Gish y States, Nature Genet. 3:266-272 (1993); Madden *et al.*, Meth. Enzymol. 266:131-141 (1996); Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997); Zhang y Madden, Genome Res. 7:649-656 (1997)), especialmente blastp o tblastn (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)).

[0032] El término “homología sustancial” o “similitud sustancial,” cuando se hace referencia a un ácido nucleico o un fragmento del mismo, indica que, cuando está alineado óptimamente con inserciones de nucleótido apropiadas o deleciones con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótido en al menos aproximadamente 76%, 80%, 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las bases del nucleótido, tal como se ha medido mediante cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tales como FASTA, BLAST o Gap, como se ha discutido previamente.

[0033] De manera alternativa, existe homología o identidad sustancial cuando un ácido nucleico o un fragmento del mismo se hibrida a otro ácido nucleico, a una hebra de otro ácido nucleico, o a la hebra complementaria de la misma, bajo condiciones de hibridación rigurosas. Las “condiciones de hibridación rigurosas” y “condiciones de lavado rigurosas” en el contexto de experimentos de hibridación de ácido nucleico dependen de un número de diferentes parámetros físicos. La hibridación del ácido nucleico se verá afectada por condiciones tales como concentración de sal, temperatura, solventes, la composición de

bases de las especies de hibridación, la longitud de las regiones complementarias, y el número de desapareamientos de bases de nucleótidos entre los ácidos nucleicos de hibridación, como será fácilmente apreciado por aquellos versados en la materia. Una persona que tenga habilidades ordinarias en la materia sabe cómo variar éstos parámetros para alcanzar una rigurosidad de hibridación particular.

[0034] En general, la “hibridación rigurosa” es llevada a cabo a aproximadamente 25°C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para el híbrido de ADN específico bajo un conjunto particular de condiciones. El “lavado riguroso” es llevado a cabo a temperaturas inferiores aproximadamente 5°C que el T_m para el híbrido de ADN específico bajo un conjunto particular de condiciones. El T_m es la temperatura a la cual el 50% de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente emparejada. Ver Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), página 9.51, incorporada al presente documento mediante referencia. Para los propósitos del presente documento, las “condiciones rigurosas” son definidas para la hibridación en fase de solución como la hibridación acuosa (*i.e.*, libre de formamida) en 6xSSC (donde 20xSSC contiene 3.0 M de NaCl y 0.3 M de citrato de sodio), 1% SDS a 65°C durante 8-12 horas, seguido por dos lavados en 0.2xSSC, 0.1% SDS a 65°C durante 20 minutos. Será apreciado por la persona versada en la materia que la hibridación a 65°C ocurrirá a diferentes tasas dependiendo de un número de factores que incluyen la longitud y el porcentaje de identidad de las secuencias que se están hibridando.

[0035] Los ácidos nucleicos (también referidos como los polinucleótidos) de esta presente divulgación pueden incluir tanto hebras sentido y antisentido de ARN, ADNc, ADN genómico, y formas sintéticas y polímeros mezclados de los anteriores. Pueden ser modificados

químicamente o bioquímicamente o pueden contener bases de nucleótido no naturales o derivadas, tal como será fácilmente apreciado por aquellos versados en la materia. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótido tales como uniones no cargadas (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, *etc.*), uniones cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, *etc.*), mitades pendientes (por ejemplo, polipéptidos), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, *etc.*), quelantes, alquilantes, y modificadores de uniones (por ejemplo, ácido nucleicos alfa anoméricos, *etc.*) También están incluidas las moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada a través de enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Tales moléculas son conocidas en el estado de la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas en las cuales se sustituyen uniones peptídicas por uniones de fosfato en el esqueleto de la molécula. Otras modificaciones pueden incluir, por ejemplo, análogos en los cuales el anillo de ribosa contiene una mitad que puentea u otra estructura tal como las modificaciones encontradas en los ácidos nucleicos “bloqueados”.

[0036] El término “mutado” cuando se aplica a la secuencia de ácidos nucleicos significa que los nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico se pueden insertar, eliminar o cambiar en comparación con una secuencia de ácido nucleico de referencia. Una alteración única puede ser hecha en un locus (un punto de mutación) o múltiples nucleótidos pueden ser insertados, eliminados o cambiados en un solo locus. Adicionalmente, una o más alteraciones pueden ser hechas en cualquier número de locus dentro de una secuencia de ácido nucleico. Una secuencia de ácido nucleico puede ser mutada por cualquier método conocido en el estado de la técnica incluyendo pero no limitado a técnicas de mutagénesis tales

como un “PCR propensa a error” (un proceso para llevar a cabo una PCR bajo condiciones donde la fidelidad de la copia de la polimerasa de ADN es baja, de tal forma que se obtiene una tasa alta de puntos de mutación a lo largo de la longitud completa del producto de la PCR; ver, por ejemplo, Leung *et al.*, *Technique*, 1:11-15 (1989) y Caldwell y Joyce, *PCR Methods Applic.* 2:28-33 (1992)); y “mutagénesis dirigida por oligonucleótidos” (un proceso que permite la generación de mutaciones de sitio específico en cualquier segmento de interés de ADN clonado; ver, por ejemplo, Reidhaar-Olson y Sauer, *Science* 241:53-57 (1988)).

[0037] El término “atenuar” tal como se utiliza en el presente documento generalmente se refiere a una delección funcional, incluyendo una mutación, delección parcial o completa, inserción, u otra variación hecha a una secuencia de genes o a una secuencia que controla la transcripción de una secuencia de genes, la cual reduce o inhibe la producción del producto de gen, o vuelve al producto de gen no funcional. En algunos casos una delección funcional es descrita como una mutación knockout. La atenuación también incluye cambios en la secuencia de aminoácidos mediante alteración de la secuencia de ácido nucleico, poniendo el gen bajo el control de un promotor menos activo, baja regulación, expresando ARN de interferencia, ribozimas o secuencias antisentido que se dirigen al gen de interés, o a través de cualquier otra técnica conocida en el estado de la técnica. En un ejemplo, la sensibilidad de una enzima particular a inhibición por retroalimentación o inhibición causada por una composición que no es un producto o un reactivo (retroalimentación de ruta no específica) es disminuida de tal forma que la actividad de la enzima no es impactada por la presencia de un compuesto. En otros casos, una enzima que ha sido alterada para ser menos activa puede ser referida como atenuada.

[0038] El término “deleción” se refiere a la remoción de uno o más nucleótidos a partir de una molécula de ácido nucleico o uno o más aminoácidos a partir de una proteína, estando unidas entre sí las regiones a cada lado].

[0039] El término “knock out” se refiere a un gen cuyo nivel de expresión o actividad ha sido reducido a cero. En algunos ejemplos, un gen es knocked-out a través de la deleción de algunas o todas de sus secuencias codificantes. En otros ejemplos, un gen es knocked-out a través de la introducción de uno o más nucleótidos en su marco de lectura abierto, el cual resulta en la traducción de un producto de proteína sin sentido o de cualquier forma un no funcional.

[0040] El término “vector” tal como se utiliza en el presente documento está previsto para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido unido. Un tipo de vector es un “plásmido,” el cual generalmente se refiere a un lazo de ADN de doble hebra circular dentro del cual pueden estar ligados segmentos adicionales de ADN, pero también incluyen moléculas lineares de doble hebra tales como aquellas resultantes de una amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o a partir del tratamiento de un plásmido circular con una enzima de restricción. Otros vectores incluyen cósmidos, cromosomas bacterianos artificiales (BAC) y cromosomas artificiales de levadura (YAC). Otro tipo de vector es un vector viral, en donde segmentos adicionales de ADN pueden estar ligados dentro del genoma viral (discutido con mayor detalle más adelante). Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedera dentro de la cual son introducidos (por ejemplo, vectores teniendo un origen de replicación que funciona en la célula hospedera). Otros vectores pueden estar integrados dentro del genoma de una célula hospedera después de la introducción dentro de la célula hospedera, y de

éste modo son replicados junto con el genoma del hospedero. Adicionalmente, algunos vectores son capaces de direccionar la expresión de genes a los cuales están enlazados operativamente. Tales vectores son referidos en el presente documento como “vectores de expresión recombinante” (o simplemente “vectores de expresión”).

[0041] Las secuencias de control de expresión “enlazadas operativamente” o “enlazadas operablemente” hacen referencia a una unión en la cual la secuencia de control de expresión es contigua con el gen de interés para controlar el gen de interés, así como también las secuencias de control de expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés.

[0042] El término “secuencia de control de expresión” tal como se utiliza en el presente documento hace referencia a secuencias de polinucleótido que son necesarias para afectar la expresión de las secuencias codificantes a las cuales están enlazadas operativamente. Las secuencias de control de expresión son secuencias que controlan la transcripción, los eventos post-transcripcionales y la traducción de la secuencia de ácido nucleicos. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias apropiadas de inicio de transcripción, terminación, promotoras y potenciadoras; señales de procesamiento eficiente de ARN tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (por ejemplo, sitios de unión de ribosomas); secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedero; en las procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión ribosomal, y secuencias de terminación de la transcripción. El término “secuencias de control” está

previsto para incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de fusión compañeras.

[0043] El término “célula hospedera recombinante” (o simplemente “célula hospedera”), tal como se utiliza en el presente documento, está previsto para hacer referencia a una célula dentro de la cual se ha introducido un vector recombinante. Se debe entender que tales términos están previstos para hacer referencia no solamente a la célula objeto particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden aparecer en generaciones sucesivas dado bien sea a mutación o influencias ambientales, dicha progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula original, pero sigue estando incluida dentro del alcance del término “célula hospedera” tal como se utiliza en el presente documento. Una célula hospedera recombinante puede ser una célula aislada o una línea celular que crece en un cultivo o puede ser una célula que reside en un tejido u organismo vivo.

[0044] El término “péptido” tal como se utiliza en el presente documento hace referencia a un polipéptido corto, por ejemplo, uno que es típicamente menor de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud y más típicamente menos de aproximadamente 30 aminoácidos de longitud. El término tal como se utiliza en el presente documento abarca análogos y miméticos que imitan la función estructural y, por ende, biológica.

[0045] El término “polipéptido” abarca tanto proteínas de origen natural y de origen no natural, y fragmentos, mutantes, derivados y análogos de las mismas. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico. Adicionalmente, un polipéptido puede comprender un número de dominios diferentes cada uno de los cuales tiene una o más actividades distintas.

[0046] El término “proteína aislada” o “polipéptido aislado” es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociado con componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado nativo, (2) existe en una pureza no encontrada en la naturaleza, donde la pureza puede ser juzgada con respecto a la presencia de otro material celular (por ejemplo, está libre de otras proteínas de la misma especie) (3) es expresada por medio de una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza (por ejemplo, es un fragmento de un polipéptido producido en la naturaleza o incluye análogos de aminoácidos o derivados que no se producen en la naturaleza o uniones diferentes a los enlaces peptídicos estándar). Por lo tanto, un polipéptido que es sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula a partir de la cual se origina naturalmente estará “aislado” de sus componentes naturalmente asociados. Un polipéptido o proteína también puede ser proporcionado sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados mediante aislamiento, utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en el estado del arte. Tal como se ha definido, “aislado” no requiere necesariamente que la proteína, polipéptido, péptido u oligopéptido así descritos hayan sido removidos físicamente de su ambiente nativo.

[0047] El término “fragmento de polipéptido” tal como se utiliza en el presente documento hace referencia a un polipéptido que ha tenido una deleción, por ejemplo, una deleción amino-terminal y/o carboxi-terminal en comparación con un polipéptido de longitud completa. En un aspecto, el fragmento de polipéptido es una secuencia contigua en la cual la secuencia de aminoácido del fragmento es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia que se produce naturalmente. Típicamente los fragmentos son al menos 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos

de longitud, preferiblemente al menos 12, 14, 16 ó 18 aminoácidos de longitud, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente al menos 25, 30, 35, 40 ó 45, aminoácidos, incluso más preferiblemente al menos 50 ó 60 aminoácidos de longitud, e incluso aún más preferiblemente al menos 70 aminoácidos de longitud.

[0048] Un “derivado modificado” hace referencia un polipéptidos o fragmentos de los mismos que son sustancialmente homólogos en la secuencia primaria estructural pero el cual incluye, por ejemplo, modificaciones químicas y bioquímicas in vivo o in vitro o el cual incorpora aminoácidos que no se encuentran en el polipéptido nativo. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, marcado, por ejemplo, con radionúclidos, y variadas modificaciones enzimáticas, tal como será fácilmente apreciado por aquellos versados en la materia. En el estado de la técnica son bien conocidos una variedad de métodos para la marcación de polipéptidos y de sustituyentes o marcadores útiles para tales propósitos, e incluyen isótopos radioactivos tales como ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S , y ^3H , ligandos que se unen a los antiligandos marcados (por ejemplo, anticuerpos), fluoróforos, agentes quimioluminescentes, enzimas, y antiligandos que pueden servir como miembros de pares de unión específica para un ligando marcado. La elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, facilidad de conjugación con el cebador, requerimientos de estabilidad, e instrumentación disponible. Los métodos para la marcación de polipéptidos son bien conocidos en el estado del arte. Ver, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992, y Suplementos hasta 2002) (incorporada al presente documento mediante referencia).

[0049] El término “proteína de fusión” hace referencia a un polipéptido que comprende un polipéptido o fragmento acoplado a secuencias

heterólogas de aminoácido. Las proteínas de fusión son útiles porque pueden ser construidas para contener dos o más elementos funcionales deseados a partir de dos o más proteínas diferentes. Una proteína de fusión comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de un polipéptido de interés, más preferiblemente al menos 20 ó 30 aminoácidos, incluso más preferiblemente al menos 40, 50 ó 60 aminoácidos, aún más preferiblemente al menos 75, 100 ó 125 aminoácidos. Las fusiones que incluyen la totalidad de las proteínas de la presente divulgación tienen utilidad particular. El polipéptido heterólogo incluido dentro de la proteína de fusión de la presente divulgación es de al menos 6 aminoácidos de longitud, a menudo de al menos 8 aminoácidos de longitud, y útilmente de al menos 15, 20, y 25 aminoácidos de longitud. Las fusiones que incluyen polipéptidos más grandes, tales como una región Fc de IgG, e incluso proteínas enteras, tales como las proteínas que contienen el cromóforo proteína fluorescente verde ("GFP"), tienen utilidad particular. Las proteínas de fusión se pueden producir recombinantemente mediante la construcción de una secuencia de ácido nucleico que codifique el polipéptido o un fragmento del mismo en el marco con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o péptido diferente y expresando posteriormente la proteína de fusión. De manera alternativa, una proteína de fusión puede ser producida químicamente mediante entrecruzamiento del polipéptido o un fragmento del mismo con otra proteína.

[0050] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" hace referencia a un polipéptido, del cual al menos una porción es codificada por al menos un gen de inmunoglobulina, o un fragmento del mismo, y que se puede unir específicamente a una molécula diana deseada. El término incluye formas de origen natural, así como también fragmentos y derivados.

[0051] Los fragmentos dentro del alcance del término “anticuerpo” incluyen aquellos producidos mediante digestión con diversas proteasas, aquellos producidos mediante escisión química y/o disociación química y aquellos producidos recombinantemente, siempre y cuando el fragmento sigue siendo capaz de unirse específicamente a una molécula diana. Dentro de tales fragmentos están Fab, Fab', Fv, F(ab')₂, y fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv).

[0052] Los derivados dentro del alcance del término incluyen anticuerpos (o fragmentos de los mismos) que han sido modificados en su secuencia, pero siguen siendo capaces de unirse específicamente a una molécula diana, incluyendo: interespecies quiméricas y anticuerpos humanizados; fusiones de anticuerpo; complejos de anticuerpo heteromérico y fusiones de anticuerpo, tales como diacuerpos (anticuerpos biespecíficos), diacuerpos de cadena sencilla, e intracuerpos (ver, por ejemplo, *Intracellular Antibodies: Research and Disease Applications*, (Marasco, ed., Springer-Verlag New York, Inc., 1998), cuya divulgación está incorporada en el presente documento mediante referencia en su totalidad).

[0053] Tal como se utiliza en el presente documento, los anticuerpos se pueden producir por medio de cualquier técnica conocida, incluyendo cosecha a partir de cultivo celular de linfocitos B nativos, cosecha a partir de cultivos de hibridomas, sistemas de expresión recombinante y exposición a fagos.

[0054] El término “análogo no peptídico” hace referencia a un compuesto con propiedades que son análogas a aquellas de un polipéptido de referencia. Un compuesto no peptídico también puede ser denominado un “péptido mimético” o un “peptidomimético.” Ver, por ejemplo, Jones, *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford University

Press (1992); Jung, *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries: A Handbook*, John Wiley (1997); Bodanszky *et al.*, *Peptide Chemistry--A Practical Textbook*, Springer Verlag (1993); *Synthetic Peptides: A Users Guide*, (Grant, ed., W. H. Freeman y Co., 1992); Evans *et al.*, *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987); Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber y Freidinger, *Trends Neurosci.*, 8:392-396 (1985); y las referencias situadas en cada uno de los anteriores, que se incorporan en el presente documento mediante referencia. Tales compuestos son a menudo desarrollados con la ayuda de modelamiento molecular computarizado. Los péptidos miméticos que son estructuralmente similares a los péptidos útiles de la presente divulgación pueden ser utilizados para producir un efecto equivalente y por lo tanto están concebidos para ser parte de la presente divulgación.

[0055] Un “polipéptido mutante” o “muteína” hace referencia a un polipéptido cuya secuencia contiene una inserción, duplicación, delección, reorganización o sustitución de uno o más aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácido de una proteína nativa o de tipo salvaje. Una muteína puede tener uno o más puntos de sustitución de aminoácido, en los cuales se ha cambiado un aminoácido sencillo en una posición por otro aminoácido, una o más inserciones y/o delecciones, en las cuales uno o más aminoácidos se insertan o eliminan, respectivamente, en la secuencia de la proteína de origen natural, y/o truncamientos de la secuencia de aminoácido en uno o ambos de los extremos amino o carboxilo. Una muteína puede tener la misma actividad biológica pero preferiblemente tiene una diferente en comparación con la proteína de origen natural.

[0056] Una muteína tiene al menos 85% de homología de secuencia total respecto a su equivalente de tipo salvaje. Aún más preferidas son las

muteínas que tienen al menos 90% de homología de secuencia total respecto a la proteína de tipo salvaje.

[0057] En un aspecto incluso aún más preferido, una muteína exhibe al menos 95% de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente 98%, incluso más preferiblemente 99% e incluso más preferiblemente 99.9% de identidad de secuencia total.

[0058] La homología de la secuencia puede medirse mediante cualquier algoritmo de análisis de secuencia común, tal como Gap o Bestfit.

[0059] Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para la formación de complejos de proteína, (4) alteran la afinidad de unión o la actividad enzimática, y (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos.

[0060] Tal como se utilizan en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaciones siguen el uso convencional. Ver *Immunology-A Synthesis* (Golub y Gren eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass., 2nd ed. 1991), el cual se incorpora al presente documento mediante referencia. Los estereoisómeros (por ejemplo, los D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales tales como los aminoácidos α,α -disustituidos, los N-alkil aminoácidos, y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente divulgación. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-

formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptido utilizada en el presente documento, el extremo de la izquierda corresponde al extremo amino terminal y el extremo de la derecha corresponde al extremo carboxi-terminal, en concordancia con el uso y la convención estándar.

[0061] Una proteína tiene “homología” o es “homóloga” a una segunda proteína si la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína tiene una secuencia similar a la secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda proteína. De manera alternativa, una proteína tiene homología hacia una segunda proteína si las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos “similares”. (Por lo tanto, el término “proteínas homólogas” se define para significar que las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos similares.) Tal como se utiliza en el presente documento, la homología entre dos regiones de secuencia de aminoácidos (especialmente con respecto a las similitudes estructurales predichas) se interpreta en el sentido de similitud en la función.

[0062] Cuando se utiliza “homólogo” en referencia a proteínas o péptidos, se reconoce que las posiciones de residuos que no son idénticos a menudo difieren en las sustituciones de aminoácido conservativas. Una “sustitución de aminoácido conservativa” es una en la cual un residuo de aminoácido es sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos donde dos o más secuencias de aminoácidos difieren una de la otra mediante sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de homología puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza

conservativa de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por aquellos versados en la materia. Ver, por ejemplo, Pearson, 1994, *Methods Mol. Biol.* 24:307-31 y 25:365-89 (incorporado al presente documento mediante referencia).

[0063] Cada uno de los siguientes seis grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido Aspártico (D), Ácido Glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Alanina (A), Valina (V), y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

[0064] La homología de secuencia para los polipéptidos, a la cual también se hace referencia como el porcentaje de identidad de secuencia, se mide típicamente utilizando software de análisis de secuencia. Ver, por ejemplo, el Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group (GCG), University of Wisconsin Biotechnology Center, 910 University Avenue, Madison, Wis. 53705. El software de análisis de proteínas empareja secuencias similares utilizando una medida de la homología asignada a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones conservativas de aminoácidos. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como “Gap” y “Bestfit” los cuales pueden ser utilizados con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos cercanamente relacionados, tales como los polipéptidos homólogos de especies diferentes de organismos o entre una proteína de tipo salvaje y una muteína de la misma. Ver, por ejemplo, GCG Versión 6.1.

[0065] Un algoritmo que puede ser utilizado cuando se compara una secuencia de polipéptido particular con una base de datos que contiene un gran número de secuencias a partir de organismos diferentes es el

programa de computador BLAST (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Gish y States, *Nature Genet.* 3:266-272 (1993); Madden *et al.*, *Meth. Enzymol.* 266:131-141 (1996); Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997); Zhang y Madden, *Genome Res.* 7:649-656 (1997)), especialmente blastp o tblastn (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)).

[0066] La longitud de las secuencias de polipéptido comparadas por homología generalmente será de al menos aproximadamente 16 residuos de aminoácidos, usualmente al menos aproximadamente 20 residuos, más usualmente al menos aproximadamente 24 residuos, típicamente al menos aproximadamente 28 residuos, y preferiblemente más de aproximadamente 35 residuos. Cuando se busca una base de datos que contiene secuencias a partir de un gran número de organismos diferentes, puede ser preferible comparar secuencias de aminoácidos. La búsqueda de base de datos utilizando secuencias de aminoácidos puede ser medida mediante algoritmos diferentes del blastp conocido en el estado del arte. Por ejemplo, las secuencias de polipéptido se pueden comparar utilizando FASTA, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA proporciona alineamientos y el porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda. Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990) (incorporada mediante referencia al presente documento). Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 2 y la matriz de clasificación PAM250), tal como se proporciona en GCG Versión 6.1, incorporado al presente documento mediante referencia.

[0067] La “unión específica” hace referencia a la capacidad de dos moléculas para unirse entre sí en preferencia a unirse con otras moléculas

en el ambiente. Típicamente, la “unión específica” discrimina sobre la unión accidental en una reacción por al menos dos veces, más típicamente por al menos 10 veces, a menudo al menos 100 veces. Típicamente, la afinidad o aidez de una reacción de unión específica, cuantificada mediante una constante de disociación, es aproximadamente 10^{-7} M o más fuerte (por ejemplo, aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M o incluso más fuerte).

[0068] El “porcentaje en peso seco de célula” hace referencia a una medida de la producción de hidrocarburo obtenida tal como sigue: un volumen definido de cultivo se centrifuga para sedimentar las células. Posteriormente, las células deshumificadas mediante al menos un ciclo de microcentrifugación y aspiración. Los sedimentos celulares son liofilizados durante la noche, y el tubo que contiene la masa celular seca es pesado nuevamente de tal forma que la masa del sedimento celular puede ser calculada dentro de ± 0.1 mg. Al mismo tiempo que las células son procesadas para la determinación del peso seco de célula, una segunda muestra del cultivo en cuestión es cosechada, lavada, y deshumificada. El sedimento celular resultante, correspondiente a 1-3 mg de peso seco de célula, es extraído posteriormente mediante agitación vortex en aproximadamente 1 ml de acetona más hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante y un estándar interno, por ejemplo, *n*-eicosano. Los restos celulares son posteriormente sedimentados mediante centrifugación y se toma el sobrenadante (extractante) para análisis mediante GC. Para una cuantificación precisa de *n*-alcanos, se utiliza detección por ionización de llama (FID) en lugar del conteo total de iones mediante MS. Las concentraciones de *n*-alcano en los extractos biológicos son calculados utilizando relaciones de calibración entre el área de pico GC-FID y concentraciones conocidas de estándares auténticos de *n*-alcano. Conociendo el volumen del extractante, las concentraciones resultantes de las especies de *n*-alcano en el extractante, y el peso seco

de célula del sedimento celular extraído, se puede determinar el porcentaje de peso seco de célula que comprende *n*-alcanos.

[0069] El término “región” tal como se utiliza en el presente documento hace referencia a una porción físicamente contigua de la estructura primaria de una biomolécula. En el caso de las proteínas, se define una región mediante una porción contigua de la secuencia de aminoácidos de esa proteína.

[0070] El término “dominio” tal como se utiliza en el presente documento hace referencia a una estructura de una biomolécula que contribuye a una función conocida o sospechada de la biomolécula. Los dominios pueden ser coextensivos con las regiones o porciones de los mismos; los dominios también pueden incluir regiones distintas, no contiguas de una biomolécula. Ejemplos de dominios de proteína incluyen, pero no están limitados a, un dominio Ig, un dominio extracelular, un dominio de transmembrana, y un dominio citoplásmico.

[0071] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “molécula” significa cualquier compuesto, incluyendo, pero no limitado a, una molécula pequeña, péptido, proteína, azúcar, nucleótido, ácido nucleico, lípido, etc., y tal compuesto puede ser natural o sintético.

[0072] Los “Productos de Interés a base de carbono” incluyen alcoholes tales como etanol, propanol, isopropanol, butanol, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, ésteres de ceras; hidrocarburos y alcanos tales como propano, octano, diesel, Propulsor de Jet 8 (JP8); polímeros tales como tereftalato, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol, polioles, Polihidroxialcanoatos (PHA), poli-beta-hidroxibutirato (PHB), acrilato, ácido adípico, ϵ -caprolactona, isopreno, caprolactama, caucho; materias primas químicas tales como lactato, ácido docosahexaenoico (DHA),

3-hidroxipropionato, γ -valerolactona, lisina, serina, aspartato, ácido aspártico, sorbitol, ascorbato, ácido ascórbico, isopentenol, lanosterol, omega-3 DHA, licopeno, itaconato, 1,3-butadieno, etileno, propileno, succinato, citrato, ácido cítrico, glutamato, malato, ácido 3-hidroxipropionico (HPA), ácido láctico, THF, gamma butirolactona, pirrolidonas, hidroxibutirato, ácido glutámico, ácido levulínico, ácido acrílico, ácido malónico; productos químicos especializados tales como carotenoides, isoprenoides, ácido itacónico; productos farmacéuticos e intermediarios farmacéuticos tales como ácido 7-aminodeacetoxicefalosporánico (7-ADCA)/cefalosporina, eritromicina, policétidos, estatinas, paclitaxel, docetaxel, terpenos, péptidos, esteroides, ácidos grasos omega y otros productos de interés adecuados. Tales productos son útiles en el contexto de biocombustibles, productos químicos industriales y especializados, como intermediarios utilizados para hacer productos adicionales, tales como suplementos nutricionales, neutraceuticos, polímeros, reemplazos de parafina, productos de cuidado personal y productos farmacéuticos.

[0073] Biocombustible: un biocombustible hace referencia a cualquier combustible que se deriva de una fuente biológica. Un biocombustible puede hacer referencia a uno o más hidrocarburos, uno o más alcoholes, uno o más ésteres grasos o una mezcla de los mismos.

[0074] Hidrocarburo: El término hace referencia generalmente a un compuesto químico que consiste de los elementos carbono (C), hidrógeno (H) y opcionalmente oxígeno (O). Existen esencialmente tres tipos de hidrocarburos, por ejemplo, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos saturados e hidrocarburos insaturados tales como alquenos, alquinos, y dienos. El término también incluye combustibles, biocombustibles, plásticos, ceras, solventes y aceites. Los hidrocarburos abarcan biocombustibles, así como también plásticos, ceras, solventes y aceites.

[0075] A lo largo de esta descripción y reivindicaciones, se entenderá que la palabra “comprender” o variaciones tales como “comprende” o “comprendiendo”, implican la inclusión de un número entero indicado o grupo de números enteros pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

[0076] En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de proteína proporcionadas en las SEQ ID NOs del listado de secuencias. En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación codifica una secuencia de polipéptido de al menos 50%, 60, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con una de las secuencias de proteína mostradas en las SEQ ID NOs en el listado de secuencias y la identidad puede incluso ser más preferiblemente 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9% o incluso mayor.

[0077] La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que se hibridan bajo condiciones rigurosas a las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas. Tal como se definió anteriormente, y como es bien sabido en el estado del arte, las hibridaciones rigurosas son llevadas a cabo a aproximadamente 25°C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para el híbrido de ADN específico bajo un conjunto particular de condiciones, donde el T_m es la temperatura a la cual el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente coincidente. El lavado riguroso se lleva a cabo a temperaturas aproximadamente 5°C por debajo del T_m para el híbrido de ADN específico bajo un conjunto particular de condiciones.

[0078] También se proporcionan las moléculas de ácido nucleico que comprenden un fragmento de una cualquiera de las secuencias de ácido

nucleicos anteriormente descritas. Estos fragmentos contienen preferiblemente al menos 20 nucleótidos contiguos. Más preferiblemente los fragmentos de las secuencias de ácidos nucleicos contienen al menos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o incluso más nucleótidos contiguos.

[0079] Los fragmentos de secuencia de ácido nucleico de la presente divulgación exhibe utilidad en una variedad de sistemas y métodos. Por ejemplo, los fragmentos pueden ser utilizados como sondas en diversas técnicas de hibridación. Dependiendo del método, las secuencias de ácidos nucleicos diana pueden ser bien sea ADN o ARN. Las secuencias de ácidos nucleicos diana pueden ser fraccionadas (por ejemplo, mediante electroforesis en gel) antes de la hibridación, o la hibridación puede llevarse a cabo sobre muestras in situ. Una persona versada en la materia apreciará que las sondas de ácido nucleico de secuencia conocida encuentran utilidad en la determinación de la estructura cromosómica (por ejemplo, mediante transferencia de tipo Southern) y en la medición de la expresión de gen (por ejemplo, mediante transferencia de tipo Northern). En tales experimentos, los fragmentos de secuencia son marcados de manera detectable preferiblemente, de tal forma que su hibridación específica a las secuencias diana pueda ser detectada y opcionalmente cuantificada. Una persona versada en la materia apreciará que los fragmentos de ácido nucleico de la presente divulgación pueden utilizarse en una amplia variedad de técnicas de transferencia no específicamente descritas en el presente documento.

[0080] También podrá apreciarse que los fragmentos de la secuencia de ácido nucleico revelados en el presente documento también encuentran utilidad como sondas cuando se inmovilizan sobre microarreglos. Los métodos para la creación de microarreglos mediante deposición y fijación de ácidos nucleicos sobre sustratos de soporte son

bien conocidos en el estado del arte. Revisado en *DNA Microarrays: A Practical Approach* (Practical Approach Series), Schena (ed.), Oxford University Press (1999) (ISBN: 0199637768); *Nature Genet.* 21(1)(suppl):1-60 (1999); *Microarray Biochip: Tools and Technology*, Schena (ed.), Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000) (ISBN: 1881299376), cuyas divulgaciones son incorporadas en el presente documento mediante referencia en sus totalidades. El análisis de, por ejemplo, la expresión de gen utilizando microarreglos que comprenden fragmentos de secuencia de ácido nucleico, tales como los fragmentos de secuencia de ácido nucleico divulgados en el presente documento, es una utilidad bien establecida para los fragmentos de secuencia en el campo de la biología celular y molecular. Otros usos para fragmentos de secuencia inmovilizados sobre microarreglos son descritos en Gerhold *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 24:168-173 (1999) y Zweiger, *Trends Biotechnol.* 17:429-436 (1999); *DNA Microarrays: A Practical Approach* (Practical Approach Series), Schena (ed.), Oxford University Press (1999) (ISBN: 0199637768); *Nature Genet.* 21(1)(suppl):1-60 (1999); *Microarray Biochip: Tools and Technology*, Schena (ed.), Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000) (ISBN: 1881299376), las divulgaciones de cada uno de los cuales se incorporan al presente documento mediante referencia en su totalidad.

[0081] Como es bien sabido en el estado de la técnica, las actividades de enzima pueden ser medidas de diversas formas. Por ejemplo, la pirofosforólisis de OMP puede ser seguida espectroscópicamente (Grubmeyer *et al.*, (1993) *J. Biol. Chem.* 268:20299-20304). De manera alternativa, la actividad de la enzima puede ser seguida utilizando técnicas cromatográficas, tal como por cromatografía líquida de alta (Chung y Sloan, (1986) *J. Chromatogr.* 371:71-81). Como otra alternativa la actividad puede ser medida indirectamente mediante la determinación de los niveles del producto hecho a partir de la actividad de la enzima. Estos

niveles pueden medirse con técnicas que incluyen la extracción acuosa cloroformo/metanol como es conocido y descrito en el estado del arte (Cf. M. Kates (1986) *Techniques of Lipidology; Isolation, analysis and identification of Lipids*. Elsevier Science Publishers, New York (ISBN: 0444807322)). Técnicas más modernas incluyen la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Niessen, W. M. A. (2001). *Current practice of gas chromatography--mass spectrometry*. New York, N.Y: Marcel Dekker. (ISBN: 0824704738)). Técnicas modernas adicionales para la identificación de la actividad y los productos de proteína recombinante incluyen cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), electroforesis capilar, Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz tiempo de vuelo-espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), resonancia magnética nuclear (NMR), espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), viscosimetría (Knothe, G (1997) *Am. Chem. Soc. Symp. Series*, 666: 172–208), titulación para la determinación de ácidos grasos libres (Komers (1997) *Fett/Lipid*, 99(2): 52–54), métodos enzimáticos (Bailer (1991) *Fresenius J. Anal. Chem.* 340(3): 186), métodos basados en propiedades físicas, métodos de química húmeda, etc. pueden ser utilizados para analizar los niveles y la identidad del producto producido por los organismos de la presente divulgación. Otros métodos y técnicas también pueden ser adecuados para la medición de la actividad de la enzima, como sería conocido por una persona versada en la materia.

[0082] La presente divulgación también proporciona vectores, incluyendo los vectores de expresión, que comprenden las moléculas de ácido nucleico ya mencionadas de la presente divulgación, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. En un primer aspecto, los vectores incluyen las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas anteriormente. En un aspecto alternativo, los vectores de la presente divulgación incluyen las moléculas de ácido nucleico

anteriormente descritas enlazadas operablemente a una o más secuencias de control de expresión. Los vectores de la presente divulgación pueden, por lo tanto, ser utilizados para expresar un polipéptido *katE* y/o *katG* que contribuye a la resistencia a H_2O_2 en una célula hospedera. En otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan las células hospederas transformadas con las moléculas de ácidos nucleicos o los vectores de la presente divulgación, y las descendencias de los mismos. En algunos aspectos de la presente divulgación, estas células portan las secuencias de los ácidos nucleicos de la presente divulgación sobre vectores, que pueden ser, o no, vectores libremente replicantes. En otros aspectos de la presente divulgación, los ácidos nucleicos han sido integrados dentro del genoma de las células hospederas.

[0083] En un aspecto preferido, la célula hospedera modificada mediante ingeniería genética comprende uno o más ácidos nucleicos codificantes *katE* o *katG* recombinantes que expresan *katE* (catalasa) o *katG* (catalasa/peroxidasa) en la célula hospedera.

[0084] El término “microorganismo” incluye especies microbianas procariotas y eucariotas de los Dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya*, incluyendo la última levadura y hongos filamentosos, protozoos, algas, o Protistas superiores. Los términos “células microbianas” y “microbios” se utilizan de manera intercambiable con el término microorganismo.

[0085] Una variedad de organismos hospederos pueden ser transformados para producir un producto de interés. Los organismos fotoautotróficos incluyen las plantas y algas eucariotas, así como también las cianobacterias procariotas, bacterias verdes del azufre, bacterias verdes no del azufre, bacterias púrpuras del azufre, y bacterias púrpuras no del azufre.

[0086] Los extremófilos también están contemplados como organismos adecuados. Tales organismos resisten diversos parámetros ambientales tales como la temperatura, radiación, presión, gravedad, vacío, desecación, salinidad, pH, tensión de oxígeno, y productos químicos. Ellos incluyen a los hipertermófilos, que crecen a o por encima de 80°C tal como *Pyrolobus fumarii*; los termófilos, que crecen entre 60-80°C tal como *Synechococcus lividis*; los mesófilos, que crecen entre 15-60°C y los psicrófilos, que crecen a o por debajo de 15°C tal como *Psychrobacter* y algunos insectos. Los organismos tolerantes a la radiación incluyen *Deinococcus radiodurans*. Los organismos tolerantes a la presión incluyen a los piezófilos, que pueden tolerar una presión de 130 MPa. Los organismos tolerantes al peso incluyen a los barófilos. Los organismos tolerantes a la hipergravedad (por ejemplo, >1g) e hipogravedad (por ejemplo, <1g) también están contemplados. Los organismos tolerantes al vacío incluyen a los tardígrados, insectos, microbios y semillas. Los organismos anhidrobióticos y tolerantes a la desecación incluyen a los xerófilos tal como *Artemia salina*; nemátodos, microbios, hongos y líquenes. Los organismos tolerantes a la sal incluyen a los halófilos (por ejemplo, 2-5 M NaCl) *Halobacteriaceae* y *Dunaliella salina*. Los organismos tolerantes al pH incluyen a los alcalífilos tales como *Natronobacterium*, *Bacillus firmus* OF4, *Spirulina spp.* (por ejemplo, pH > 9) y acidófilos tales como *Cyanidium caldarium*, *Ferroplasma sp.* (por ejemplo, pH bajo). También están contemplados los anaerobios, que no pueden tolerar el O₂ tal como *Methanococcus jannaschii*; microaerófilos, que pueden tolerar algo de O₂ tal como *Clostridium* y los aerobios, que requieren de O₂. Los organismos tolerantes a gases, que toleran el CO₂ puro incluyen *Cyanidium caldarium* y los organismos tolerantes a metal incluyen metalotolerantes tal como *Ferroplasma acidarmanus* (por ejemplo, Cu, As, Cd, Zn), *Ralstonia sp.* CH34 (por ejemplo, Zn, Co, Cd, Hg, Pb). Gross, Michael. *Life on the Edge: Amazing*

Creatures Thriving in Extreme Environments. New York: Plenum (1998) y Seckbach, J. "Search for Life in the Universe with Terrestrial Microbes Which Thrive Under Extreme Conditions." In Cristiano Batalli Cosmovici, Stuart Bowyer, y Dan Wertheimer, eds., *Astronomical and Biochemical Origins and the Search for Life in the Universe*, p. 511. Milán: Editrice Compositori (1997).

[0087] Las plantas incluyen pero no están limitadas a los siguientes géneros: *Arabidopsis*, *Beta*, *Glycine*, *Jatropha*, *Miscanthus*, *Panicum*, *Phalaris*, *Populus*, *Saccharum*, *Salix*, *Simmondsia* y *Zea*.

[0088] Las algas y cianobacterias incluyen pero no están limitadas a los siguientes géneros: *Acanthoceras*, *Acanthococcus*, *Acaryochloris*, *Achnanthes*, *Achnanthidium*, *Actinastrum*, *Actinochloris*, *Actinocyclus*, *Actinotaenium*, *Amphichrysis*, *Amphidinium*, *Amphikrikos*, *Amphipleura*, *Amphiprora*, *Amphithrix*, *Amphora*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aneumastus*, *Ankistrodesmus*, *Ankyra*, *Anomoeoneis*, *Apatococcus*, *Aphanizomenon*, *Aphanocapsa*, *Aphanochaete*, *Aphanothece*, *Apiocystis*, *Apistonema*, *Arthrodesmus*, *Artherospira*, *Ascochloris*, *Asterionella*, *Asterococcus*, *Audouinella*, *Aulacoseira*, *Bacillaria*, *Balbiania*, *Bambusina*, *Bangia*, *Basichlamys*, *Batrachospermum*, *Binuclearia*, *Bitrichia*, *Blidingia*, *Botrdiopsis*, *Botrydium*, *Botryococcus*, *Botryosphaerella*, *Brachiomonas*, *Brachysira*, *Brachytrichia*, *Brebissonia*, *Bulbochaete*, *Bumilleria*, *Bumilleriopsis*, *Caloneis*, *Calothrix*, *Campylodiscus*, *Capsosiphon*, *Carteria*, *Catena*, *Cavinula*, *Centrtractus*, *Centronella*, *Ceratium*, *Chaetoceros*, *Chaetochloris*, *Chaetomorpha*, *Chaetonella*, *Chaetonema*, *Chaetopeltis*, *Chaetophora*, *Chaetosphaeridium*, *Chamaesiphon*, *Chara*, *Characiochloris*, *Characiopsis*, *Characium*, *Charales*, *Chilomonas*, *Chlainomonas*, *Chlamydolepharis*, *Chlamydopapsa*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonopsis*, *Chlamydomyxa*, *Chlamydonephris*, *Chlorangiella*, *Chlorangiopsis*, *Chlorella*, *Chlorobotrys*, *Chlorobraxis*, *Chlorochytrium*,

Chlorococcum, *Chlorogloea*, *Chlorogloeopsis*, *Chlorogonium*,
Chlorolobion, *Chloromonas*, *Chlorophysema*, *Chlorophyta*, *Chlorosaccus*,
Chlorosarcina, *Choricystis*, *Chromophyton*, *Chromulina*,
Chroococcidiopsis, *Chroococcus*, *Chroodactylon*, *Chroomonas*,
Chrootheca, *Chrysamoeba*, *Chrysapsis*, *Chrysidiastrium*, *Chrysocapsa*,
Chrysocapsella, *Chrysochaete*, *Chrysochromulina*, *Chrysococcus*,
Chrysocrinus, *Chrysolepidomonas*, *Chrysolykos*, *Chrysonebula*,
Chrysophyta, *Chrysopyxis*, *Chrysosaccus*, *Chrysophaerella*,
Chrysostephanosphaera, *Clodophora*, *Clastidium*, *Closteriopsis*,
Closterium, *Coccomyxa*, *Cocconeis*, *Coelastrella*, *Coelastrum*,
Coelosphaerium, *Coenochloris*, *Coenococcus*, *Coenocystis*, *Colacium*,
Coleochaete, *Collodictyon*, *Compsogonopsis*, *Composopogon*,
Conjugatophyta, *Conochaete*, *Coronastrum*, *Cosmarium*, *Cosmioneis*,
Cosmocladium, *Crateriportula*, *Craticula*, *Crinalium*, *Crucigenia*,
Crucigeniella, *Cryptoaulax*, *Cryptomonas*, *Cryptophyta*, *Ctenophora*,
Cyanodictyon, *Cyanonephron*, *Cyanophora*, *Cyanophyta*, *Cyanotheca*,
Cyanothomonas, *Cyclonexis*, *Cyclostephanos*, *Cyclotella*, *Cylindrocapsa*,
Cylindrocystis, *Cylindrospermum*, *Cylindrotheca*, *Cymatopleura*, *Cymbella*,
Cymbellonitzschia, *Cystodinium*, *Dactylococcopsis*, *Debarya*, *Denticula*,
Dermatochrysis, *Dermocarpa*, *Dermocarpella*, *Desmatractum*, *Desmidium*,
Desmococcus, *Desmonema*, *Desmosiphon*, *Diacanthos*, *Diacronema*,
Diadesmis, *Diatoma*, *Diatomella*, *Dicellula*, *Dichothrix*, *Dichotomococcus*,
Dicranochaete, *Dictyochloris*, *Dictyococcus*, *Dictyosphaerium*,
Didymocystis, *Didymogenes*, *Didymosphenia*, *Dilabifilum*,
Dimorphococcus, *Dinobryon*, *Dinococcus*, *Diplochloris*, *Diploneis*,
Diplostauron, *Distrionella*, *Docidium*, *Draparnaldia*, *Dunaliella*,
Dysmorphococcus, *Ecballocystis*, *Elakatothrix*, *Ellerbeckia*, *Encyonema*,
Enteromorpha, *Entocladia*, *Entomoneis*, *Entophysalis*, *Epichrysis*,
Epipyxis, *Epithemia*, *Eremosphaera*, *Euastropsis*, *Euastrum*, *Eucapsis*,
Eucocconeis, *Eudorina*, *Euglena*, *Euglenophyta*, *Eunotia*,
Eustigmatophyta, *Eutreptia*, *Fallacia*, *Fischerella*, *Fragilaria*,

Fragilariforma, *Franceia*, *Frustulia*, *Curcilla*, *Geminella*, *Genicularia*,
Glaucocystis, *Glaucophyta*, *Glenodiniopsis*, *Glenodinium*, *Gloeocapsa*,
Gloeochaete, *Gloeochrysis*, *Gloeococcus*, *Gloeocystis*, *Gloeodendron*,
Gloeomonas, *Gloeoplax*, *Gloeotheca*, *Gloeotila*, *Gloeotrichia*,
Gloiodictyon, *Golenkinia*, *Golenkiniopsis*, *Gomontia*, *Gomphocymbella*,
Gomphonema, *Gomphosphaeria*, *Gonatozygon*, *Gongrosia*, *Gongrosira*,
Goniochloris, *Gonium*, *Gonyostomum*, *Granulochloris*, *Granulocystopsis*,
Groenbladia, *Gymnodinium*, *Gymnozyga*, *Gyrosigma*, *Haematococcus*,
Hafniomonas, *Hallassia*, *Hammatoida*, *Hannaea*, *Hantzschia*,
Hapalosiphon, *Haplotaenium*, *Haptophyta*, *Haslea*, *Hemidinium*,
Hemitoma, *Heribaudiella*, *Heteromastix*, *Heterothrix*, *Hibberdia*,
Hildenbrandia, *Hillea*, *Holopedium*, *Homoeothrix*, *Hormanthonema*,
Hormotila, *Hyalobrachion*, *Hyalocardium*, *Hyalodiscus*, *Hyalogonium*,
Hyalotheca, *Hydrianum*, *Hydrococcus*, *Hydrocoleum*, *Hydrocoryne*,
Hydrodictyon, *Hydrosera*, *Hydrurus*, *Hyella*, *Hymenomonas*,
Isthmochloron, *Johannesbaptistia*, *Juranyiella*, *Karayevia*, *Kathablepharis*,
Katodinium, *Kephyrion*, *Keratococcus*, *Kirchneriella*, *Klebsormidium*,
Kolbesia, *Koliella*, *Komarekia*, *Korshikoviella*, *Kraskella*, *Lagerheimia*,
Lagynion, *Lamprothamnium*, *Lemanea*, *Lepocinclis*, *Leptosira*,
Lobococcus, *Lobocystis*, *Lobomonas*, *Luticola*, *Lyngbya*, *Malleochloris*,
Mallomonas, *Mantoniella*, *Marssoniella*, *Martyana*, *Mastigocoleus*,
Gastogloia, *Melosira*, *Merismopedia*, *Mesostigma*, *Mesotaenium*,
Micractinium, *Micrasterias*, *Microchaete*, *Microcoleus*, *Microcystis*,
Microglana, *Micromonas*, *Microspora*, *Microthamnion*, *Mischococcus*,
Monochrysis, *Monodus*, *Monomastix*, *Monoraphidium*, *Monostroma*,
Mougeotia, *Mougeotiopsis*, *Myochloris*, *Myromecia*, *Myxosarcina*,
Naegeliella, *Nannochloris*, *Nautococcus*, *Navicula*, *Neglectella*, *Neidium*,
Nephroclamys, *Nephrocytium*, *Nephrodiella*, *Nephroselmis*, *Netrium*,
Nitella, *Nitellopsis*, *Nitzschia*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Ochromonas*,
Oedogonium, *Oligochaetophora*, *Onychonema*, *Oocardium*, *Oocystis*,
Opephora, *Ophiocytium*, *Orthoseira*, *Oscillatoria*, *Oxyneis*, *Pachycladella*,

Palmella, Palmodictyon, Pnadorina, Pannus, Paralia, Pascherina, Paulschulzia, Pediastrum, Pedinella, Pedinomonas, Pedinopera, Pelagodictyon, Penium, Peranema, Peridiniopsis, Peridinium, Peronia, Petroneis, Phacotus, Phacus, Phaeaster, Phaeodermatium, Phaeophyta, Phaeosphaera, Phaeothamnion, Phormidium, Phycopeltis, Phyllariochloris, Phyllocardium, Phyllomitas, Pinnularia, Pitophora, Placoneis, Planctonema, Planktosphaeria, Planothidium, Plectonema, Pleodorina, Pleurastrum, Pleurocapsa, Pleurocladia, Pleurodiscus, Pleurosigma, Pleurosira, Pleurotaenium, Pocillomonas, Podohedra, Poliblepharides, Polichaetophora, Poliedriella, Poliedriopsis, Poligoniochloris, Poliepidomonas, Politaenia, Politoma, Politomella, Porphyridium, Posteriochromonas, Prasinochloris, Prasinocladus, Prasinophyta, Prasiola, Prochlorophyta, Prochlorothrix, Protoderma, Protosiphon, Provasoliella, Prymnesium, Psammodictyon, Psammothidium, Pseudanabaena, Pseudenoclonium, Psuedocarteria, Pseudochate, Pseudocharacium, Pseudococcomyxa, Pseudodictyosphaerium, Pseudokephyrion, Pseudoncobyrsa, Pseudoquadrigula, Pseudosphaerocystis, Pseudostaurastrum, Pseudostaurosira, Pseudotetrastrum, Pteromonas, Punctastruata, Pyramichlamys, Pyramimonas, Pyrrophyta, Quadrichloris, Quadricoccus, Quadrigula, Radiococcus, Radiofilum, Raphidiopsis, Raphidocelis, Raphidonema, Raphidophyta, Peimeria, Rhabdoderma, Rhabdomonas, Rhizoclonium, Rhodomonas, Rhodophyta, Rhoicosphenia, Rhopalodia, Rivularia, Rosenvingiella, Rossithidium, Roya, Scenedesmus, Scherffelia, Schizochlamydeella, Schizochlamys, Schizomeris, Schizothrix, Schroederia, Scolioneis, Scotiella, Scotiellopsis, Scourfieldia, Scytonema, Selenastrum, Selenochloris, Sellaphora, Semiorbis, Siderocelis, Diderocystopsis, Dimonsenia, Siphononema, Sirocladium, Sirogonium, Skeletonema, Sorastrum, Spermatozopsis, Sphaerellocystis, Sphaerellopsis, Sphaerodinium, Sphaeroplea, Sphaerososma, Spiniferomonas, Spirogyra, Spirotaenia, Spirulina, Spondylomorom,

Spondylosium, Sporotetras, Spumella, Staurastrum, Stauerodesmus, Stauroneis, Staurosira, Staurosirella, Stenopterobia, Stephanocostis, Stephanodiscus, Stephanoporus, Stephanosphaera, Stichococcus, Stichogloea, Stigeoclonium, Stigonema, Stipitococcus, Stokesiella, Strombomonas, Stylochrysalis, Stylodinium, Styloxyis, Stylosphaeridium, Surirella, Sykidion, Symploca, Synechococcus, Synechocystis, Synedra, Synochromonas, Synura, Tabellaria, Tabularia, Teilingia, Temnogametum, Tetmemorus, Tetrachlorella, Tetracyclus, Tetradesmus, Tetraedriella, Tetraedron, Tetraselmis, Tetraspora, Tetrastrum, Thalassiosira, Thamniochaete, Thorakochloris, Thorea, Tolypella, Tolypothrix, Trachelomonas, Trachydiscus, Trebouxia, Trentepholia, Treubaria, Tribonema, Trichodesmium, Trichodiscus, Trochiscia, Tryblionella, Ulothrix, Uroglena, Uronema, Urosolenia, Urospora, Uva, Vacuolaria, Vaucheria, Volvox, Volvulina, Westella, Woloszynskia, Xanthidium, Xanthophyta, Xenococcus, Zygnema, Zygnemopsis, y Zygonium. Una lista parcial de cianobacterias que pueden ser modificadas mediante ingeniería genética para expresar el recombinante descrito en el presente documento incluye miembros de los géneros Chamaesiphon, Chroococcus, Cyanobacterium, Cyanobium, Cyanothece, Dactylococcopsis, Gloeobacter, Gloeocapsa, Gloeothece, Microcystis, Prochlorococcus, Prochloron, Synechococcus, Synechocystis, Cyanocystis, Dermocarpella, Stanieria, Xenococcus, Chroococcidiopsis, Myxosarcina, Arthrospira, Borzia, Crinalium, Geitlerinemia, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Planktothrix, Prochlorothrix, Pseudanabaena, Spirulina, Starria, Symploca, Trichodesmium, Tychonema, Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cyanospira, Cylindrospermopsis, Cylindrospermum, Nodularia, Nostoc, Scytonema, Calothrix, Rivularia, Tolypothrix, Chlorogloeopsis, Fischerella, Geitleria, Iyengariella, Nostochopsis, Stigonema y Thermosynechococcus.

[0089] Las bacterias verdes no del azufre incluyen pero no están limitadas a los siguientes géneros: *Chloroflexus*, *Chloronema*, *Oscillochloris*, *Heliothrix*, *Herpetosiphon*, *Roseiflexus*, y *Thermomicrobium*.

[0090] Las bacterias verdes del azufre incluyen pero no están limitadas a los siguientes géneros:

[0091] *Chlorobium*, *Clathrochloris*, y *Prosthecochloris*.

[0092] Las bacterias púrpuras del azufre incluyen pero no están limitadas a los siguientes géneros: *Allochrochromatium*, *Chromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Rhodovulum*, *Thermochromatium*, *Thiocapsa*, *Thiorhodococcus*, y *Thiocystis*,

[0093] Las bacterias púrpuras no del azufre incluyen pero no están limitadas a los siguientes géneros: *Phaeospirillum*, *Rhodobaca*, *Rhodobacter*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopila*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodothalassium*, *Rhodospirillum*, *Rhodovibrio*, y *Roseospira*.

[0094] Las bacterias aeróbicas quimiolitótrofas incluyen pero no están limitadas a bacterias nitrificantes tales como *Nitrobacteraceae* sp., *Nitrobacter* sp., *Nitrospina* sp., *Nitrococcus* sp., *Nitrospira* sp., *Nitrosomonas* sp., *Nitrosococcus* sp., *Nitrosospira* sp., *Nitrosolobus* sp., *Nitrosovibrio* sp.; bacterias de azufre sin color tal como, *Thiovulum* sp., *Thiobacillus* sp., *Thiomicrospira* sp., *Thiosphaera* sp., *Thermothrix* sp.; bacterias del hidrógeno obligadamente quimiolitótróficas tal como *Hidrógenoobacter* sp., bacterias oxidantes y/o depositantes de hierro y manganeso tal como *Siderococcus* sp., y bacterias magnetotácticas tal como *Aquaspirillum* sp.

[0095] Las arqueobacterias incluyen pero no están limitadas a arqueobacterias metanogénicas tales como *Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp., *Methanothermus* sp., *Methanococcus* sp., *Methanomicrobium* sp., *Methanospirillum* sp., *Methanogenium* sp., *Methanosarcina* sp., *Methanolobus* sp., *Methanothrix* sp., *Methanococcoides* sp., *Methanoplanus* sp.; Metabolizadores de S extremadamente termofílicos tales como *Thermoproteus* sp., *Pyrodictium* sp., *Sulfolobus* sp., *Acidianus* sp. y otros microorganismos tales como, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces* sp., *Ralstonia* sp., *Rhodococcus* sp., *Corynebacteria* sp., *Brevibacteria* sp., *Mycobacteria* sp., y levadura oleaginosas.

[0096] Los organismos preferidos para la fabricación de n-alcanos de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documentos incluyen: *Arabidopsis thaliana*, *Panicum virgatum*, *Miscanthus giganteus*, y *Zea mays* (plantas); *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina* (algas); *Synechococcus* sp PCC 7002, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (cianobacterias); *Chlorobium tepidum* (bacterias verdes del azufre), *Chloroflexus auranticus* (bacterias verdes no del azufre); *Chromatium tepidum* y *Chromatium vinosum* (bacterias púrpuras del azufre); *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, y *Rhodopseudomonas palustris* (bacterias púrpuras no del azufre).

[0097] Aún otros organismos adecuados incluyen células sintéticas o células producidas mediante genomas sintéticos tal como se ha descrito en Venter *et al.* US Pat. Pub. No. 2007/0264688, y sistemas tipo célula o células sintéticas tal como ha sido descrito en Glass *et al.* US Pat. Pub. No. 2007/0269862.

[0098] Aún otros organismos adecuados incluyen microorganismos que pueden ser modificados mediante ingeniería genética para fijar bacterias de dióxido de carbono tales como *Escherichia coli*, *Acetobacter aceti*, *Bacillus subtilis*, levadura y hongos tales como *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium thermocellum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens*, o *Zymomonas mobilis*.

[0099] Un organismo adecuado para seleccionar o modificar mediante ingeniería genética es la fijación autotrófica de CO₂ a los productos. Esto podría cubrir la fotosíntesis y metanogénesis. La acetogénesis, abarcando los tres tipos de fijación de CO₂; el ciclo de Calvin, la ruta de acetil-CoA y la ruta reductiva del TCA también está cubierta. La capacidad para utilizar dióxido de carbono como única fuente de carbono celular (autotrofia) se encuentra en casi todos los grupos principales de las procariotas. Las rutas de fijación de CO₂ difieren entre grupos, y no existe un patrón de distribución claro de las cuatro rutas autotróficas actualmente conocidas. Ver, por ejemplo, Fuchs, G. 1989. *Alternative pathways of autotrophic CO₂ fixation*, p. 365-382. In H. G. Schlegel, y B. Bowien (ed.), *Autotrophic bacteria*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. El ciclo reductivo de las pentosas fosfato (ciclo de Calvin-Bassham-Benson) representa la ruta de fijación de CO₂ en casi todas las bacterias aeróbicas autótrofas, por ejemplo, las cianobacterias.

Métodos Generales para Inhibir la Contaminación en un Sistema de Reactor y Generar una Célula Hospedera Resistente a Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

[0100] Los organismos fotosintéticos son cultivados en sistemas de reactores. Los sistemas de reactores son esterilizados utilizando vapor de peróxido de hidrógeno (VHP). El tratamiento con VHP requiere que el aire

en el sistema de reactor esté seco, de forma tal que el vapor de peróxido de hidrógeno no se condense en líquido existente en los reactores. El secado completo de los reactores, sin embargo, no es práctico, y debe ser asumido que existirá peróxido de hidrógeno líquido residual en los reactores antes de la inoculación. Este peróxido de hidrógeno residual es tóxico para las células y puede ocasionar la muerte del cultivo. Por lo tanto, es ventajoso desarrollar un hospedero cianobacteriano que sea resistente al peróxido de hidrógeno. La debida resistencia al peróxido de hidrógeno le permitirá al hospedero sobrevivir al desafío inicial debido a la condensación del VHP. La resistencia al peróxido de hidrógeno también le permitirá al hospedero sobrevivir selectivamente a los tratamientos de peróxido de hidrógeno periódicos cuyo objetivo es eliminar la contaminación.

[0101] Se puede lograr la resistencia al peróxido de hidrógeno, una especie reactiva de oxígeno (ROS), en un hospedero cianobacteriano mediante el incremento de la capacidad catalasa y/o peroxidasa del organismo hospedero. La catalasa y la catalasa/peroxidasa (EC 1.11.1.6 y EC 1.11.1.21, respectivamente) catalizan la conversión de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno de acuerdo con la siguiente ecuación:



y son codificadas por los genes *katE* (catalasa) y *katG* (catalasa/peroxidasa), respectivamente. En una realización, la resistencia al peróxido de hidrógeno se incrementó en una cepa etanológica de *Synechococcus* PCC 7002 (JCC1510) mediante sobreexpresión de *katG* a partir de *Synechocystis* sp PCC 6803.

[0102] Los siguientes ejemplos son para propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la divulgación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Sobreexpresión de *katG* en *Synechococcus* PCC 7002 en un etanológeno JCC2979

[0103] La capacidad catalasa y/o peroxidasa de un organismo hospedero es incrementada mediante la introducción de un gen recombinante *katG* (catalasa/peroxidasa) o *katE* (catalasa), incrementando la resistencia a especies reactivas de oxígeno, tal como H₂O₂. En el siguiente método, se introduce *katG* recombinante dentro de un etanológeno, JCC1510, para incrementar su resistencia al H₂O₂.

Construcción de la cepa JCC1510

[0104] La cepa JCC1510 etanológena se construyó mediante técnicas de recombinación homóloga estándar a partir de una cepa cianobacteriana. El material de partida fue *Synechococcus* sp. PCC7002 (JCC138) de tipo salvaje, el cual se obtuvo de la Colección Pasteur o la ATCC. La cepa modificada mediante ingeniería genética comprende un gen de piruvato descarboxilasa de *Z. mobilis* (*pdh*) bajo el control de un promotor P(*nir07*) (SEQ ID NO: 5), y un gen alcohol deshidrogenasa de *Moorella* (*adh*) a partir de *Moorella* bajo el control de un promotor lambda *cro* (SEQ ID NO: 6) (**Tabla 1**).

Tabla 1: genes recombinantes JCC1510

Cepa	Genes
JCC1510	Cromosoma: P(<i>nir07</i>)- <i>pdh</i> -kan-P(<i>cro</i>)- <i>adh</i>

Construcción de la cepa JCC2979

[0105] Se logró la sobreexpresión de *katG* (SEQ ID NO: 3) a partir de *Synechocystis* sp PCC 6803 en *Synechococcus* PCC 7002 de acuerdo con el siguiente método. Se amplificó la *katG* mediante PCR con KOD Polimerasa a partir de AND genómico de *Synechocystis* sp PCC 6803 utilizando cebadores MC10 (SEQ ID NO: 1) y MC11 (SEQ ID NO: 2). El producto de 2.3 kb de la PCR se digirió con NdeI y EcoRI y se ligó dentro de los sitios correspondientes del vector de expresión integrativo de *Synechococcus* PCC 7002 (pJB1591) (ver **Tabla 2**). La región promotora que contiene P_{aphII} se escindió con NotI y NdeI y se reemplazó con el fragmento promotor *Synechocystis* sp PCC 6803 *cpcB* de 600bp (coordenadas cromosómicas 728060 – 727470 (complemento)) a partir de pJB577 para formar el plásmido pJB1767 (ver Tabla 2).

[0106] Se integró el pJB1767 dentro del genoma de una cepa original, *Synechococcus* PCC 7002 (JCC1510), mediante transformación natural y selección sobre $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina. La cepa resultante se renombró como JCC2979.

[0107] Otra catalasa, tal como *katE* a partir de *E. coli*, puede ser utilizada de manera alternativa o en adición a la *katG*.

Tabla 2: Generación del plásmido pJB1767 a partir de pJB1591

Plásmido	Mapa Secuencia Plásmido
pJB1591	AquI UHR (NotI) P _{aphII} (NdeI) – <i>katG</i> – (EcoRI) Gent ^R AquI DHR Amp ^R pUC ori
pJB577	Amp ^R <i>ldhA</i> UHR (NotI) P _{cpcB} (NdeI) – <i>tesA</i> – <i>fadD</i> – <i>wax</i> – <i>dgat</i> Spec ^R pUC ori
pJB1767	AquI UHR (NotI) P _{cpcB} (NdeI) – <i>katG</i> – (EcoRI) Gent ^R AquI DHR Amp ^R pUC ori

Ejemplo 2: Viabilidad y productividad de etanol de JCC1510 y JCC2979 bajo condiciones estándar (luz continua)

[0108] Las cepas original (JCC1510) y modificada mediante ingeniería genética (JCC2979) se inocularon por triplicado a partir de colonias individuales en tubos de ensayo en medio A+ con 10 mM de urea y antibióticos y crecieron bajo condiciones estándar (luz continua ; $\sim 100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 37°C ; 2% CO₂ ; 150 rpm). Se utilizaron los precultivos de tubo para inocular frascos de cultivo de 30 mL con tapones de espuma hasta OD₇₃₀ = 0.1 en medio JB2.1 (**Tabla 3**) con 3 mM de urea y crecieron bajo condiciones estándar. Se tomaron muestras periódicamente para cuantificar el crecimiento (OD₇₃₀) y la producción de etanol (GC-FID). Se controlaron las pérdidas por evaporación pesando los frascos y adicionando Milli-Q H₂O según sea necesario. Se calculó la producción acumulativa de etanol mediante la integración del sistema de balance de masa y resolviendo para la constante de velocidad de producción:

$$\frac{d[EtOH]_{(liq)}}{dt} = k_1 - k_2[EtOH]_{(liq)}$$

$$\text{Acumulación (EtOH en medio)} = \text{Velocidad producción} - \text{Velocidad desorción}$$

[0109] Los cultivos triplicados de los frascos de JCC1510 (original) y JCC2979 (modificado mediante ingeniería genética) crecieron durante 25 días después de los cuales el crecimiento (A) y la producción de etanol (B) en JCC2979 cumplieron o excedieron los niveles de JCC1510 (**Figura 1**).

Tabla 3: Medio JB2.1

<u>Medio JB2.1</u>	<u>(g/L, final)</u>
Cloruro de sodio	5.00
Cloruro de potasio	0.60
Nitrato de sodio	3.5
Sulfato de magnesio heptahidrato	5.00
Fosfato de potasio monobásico	0.20
EDTA, sal disodio deshidrato	0.029
Citrato de Hierro (III) hidrato	0.014
Tris/THAM®	1.00
Urea	0.18
Cloruro de calcio, anhidro	0.266
Ácido bórico	0.034
Cloruro de manganeso tetrahidrato	0.0043
Cloruro de zinc	0.00032
Óxido de Molibdeno (VI)	0.00003
Sulfato de Cobre (II) pentahidrato	0.000003
Cloruro de Cobalto (II) hexahidrato	0.000012

Ejemplo 3: Viabilidad y productividad de etanol de JCC1510 y JCC2979 en condiciones de luz natural

[0110] Las cepas original (JCC1510) y modificada mediante ingeniería genética (JCC2979) se inocularon a partir de colonias individuales en tubos de ensayo en medio A+ con 10 mM de urea y antibióticos (Spec¹⁰⁰ Kan⁵⁰ Gent²⁵) y crecieron bajo condiciones estándar (luz continua ; $\sim 100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 37°C ; 2% CO₂ ; 150 rpm). Se utilizaron los cultivos de tubo en los precultivos en frascos de 30 mL inoculados hasta OD₇₃₀ = 0.5 en medio JB2.1 con 10 mM de urea y antibióticos bajo condiciones estándar. Se inocularon los cultivos experimentales a partir de los precultivos de frasco hasta OD₇₃₀ = 0.5 in 400 mL de medio JB2.1 con 10 mM de urea en un fotobiorreactor FMT150 (Photon Systems Instruments, República Checa). Se proporcionó luz mediante un arreglo de LED de 630 nm ajustado desde 200 – 2,000 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante un ciclo de luz de 12 horas de acuerdo con una distribución Gaussiana. Se proporcionó CO₂ mediante burbujeo de 1 L min⁻¹ de 2% de CO₂ en aire. Cada ciclo de 24 horas incluye un ciclo de luz de 12 horas y un ciclo de oscuridad de 12 horas en donde el arreglo de LED es apagado. El crecimiento se cuantificó periódicamente mediante esparcimiento de luz a 730 nm. La producción de etanol se midió mediante GC-FID.

[0111] Los cultivos del fotobiorreactor FMT150 de JCC1510 (original) y JCC2979 (modificado mediante ingeniería genética) crecieron durante 15 – 35 días después de los cuales el crecimiento (A) y la producción de etanol (B) en JCC2979 cumplieron o excedieron los niveles de JCC1510 (Figura 2).

Ejemplo 4: Viabilidad de JCC1510 y JCC2979 después de tratamiento con peróxido de hidrógeno

[0112] Se inocularon las cepas original (JCC1510) y modificada mediante ingeniería genética (JCC2979) a partir de colonias individuales en tubos de ensayo en medio A+ con 10 mM de urea y antibióticos (Spec¹⁰⁰ Kan⁵⁰ Gent²⁵) y crecieron bajo condiciones estándar (luz continua ; $\sim 100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 37°C ; 2% CO₂ ; 150 rpm). Se inocularon los cultivos de tubos de JCC1510 y JCC2979 hasta OD₇₃₀ = 0.1 (**Figura 3A,B**) o OD₇₃₀ = 3.0 (**Figura 3C,D**) y se retaron con niveles seleccionados de peróxido de hidrógeno. Las barras representan OD₇₃₀ absoluto (**Figura 3A,C**) o normalizado (**Figura 3B,D**) después de 24 horas. Se calcularon los valores normalizados de OD₇₃₀ dividiendo cada valor medido de OD₇₃₀ después de 24 horas con el valor absoluto más alto de OD₇₃₀ después de 24 horas.

[0113] Tal como se muestra en la **Figura 3A-D**, la cepa del etanológeno JCC2979 modificada mediante ingeniería genética que comprende *katG* recombinante posee una mayor resistencia al H₂O₂ que su cepa etanológena original JCC1510.

Ejemplo 5: Sobreexpresión de *katG* en *Synechococcus* PCC 7002 en un etanológeno JCC3351

Construcción de la cepa JCC1581

[0114] Se construyó la cepa JCC1581 mediante técnicas de recombinación homóloga estándar. El material de partida fue *Synechococcus* sp. PCC7002 (JCC138) de tipo salvaje, el cual se obtuvo a partir de la Colección Pasteur o la ATCC. Los constructos de gen, promotor, terminador, y marcador hechos sintéticamente se obtuvieron a partir de ADN2.0 o mediante PCR, oligonucleótidos para PCR y confirmación de secuencia a partir de IDT. DCCD (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), TCS (3,3',4',5-tetraclorosalicilánilida), 2,4-DNP

(2,4-dinitrofenol), y CCCP (carbonil cianuro-p-trifluorometoxihidrazona) se obtuvieron de Sigma.

[0115] Tal como se describió previamente en la solicitud PCT publicada WO2010/044960, se construyó un plásmido direccionador pAQ7 Δ ldh (ver Genbank # CP000957) que contiene el gen de alcohol deshidrogenasa (*adh*) de *Moorella* bajo el control del promotor lambda cro (SEQ ID NO: 6). Este plásmido (pJB594) se transformó naturalmente en JCC138 (ver **Tabla 2**) utilizando un protocolo de transformación cianobacteriana estándar, produciendo la cepa JCC1034.

[0116] Brevemente, el cultivo de JCC138 creció hasta un OD730 de aproximadamente 1.0, después de lo cual se adicionaron 5-10 μ g de AND plásmido (pJB594) a 1 ml de cultivo puro de JCC138. La mezcla célula-ADN se incubó a 37 °C durante 4 horas en la oscuridad con agitación suave, se plaqueó sobre placas A+, y se incubó en un fotoincubador (Percival) durante 24 horas, punto en el cual se colocó una capa de kanamicina hasta una concentración final de 50 μ g/ml. Colonias resistentes a kanamicina (JCC1034) aparecieron después de 5-8 días de incubación adicional bajo condiciones de luz 24 hr ($\sim 100 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Una ronda de purificación de colonia se llevó a cabo sobre placas A+ suplementadas con 50 μ g/ml de kanamicina. Las colonias individuales se cada una de las seis cepas transformadas (JCC1034) crecieron en tubos de ensayo durante 4-8 días a 37°C a 150 rpm en aire enriquecido con 3% CO₂ a $\sim 100 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en un fotoincubador de agitación Multitron II (Infors). El medio de crecimiento para el cultivo líquido fue A+ con 50 μ g/ml de kanamicina.

[0117] Posteriormente se transformó JCC1034 con pJB1156 el cual introdujo un operón de dos genes, dirigido mediante P(nir07) (SEQ ID NO: 5), hasta una ubicación ectópica sobre pAQ3. Este operón contenía el

gen de alcohol deshidrogenasa (*adh*) de *Moorella* así como también el gen de piruvato descarboxilasa (*pdh*) de *Zymomonas mobilis*. La cepa resultante, JCC1581, tuvo por lo tanto dos transgenes *adh* expresados independientemente y un transgen *pdh*. El protocolo utilizado para transformar pJB1156 en JCC1034 generando JCC1581 fue igual que el anterior con la excepción que el medio de selección es A+ que contiene 3 mM de urea, 50 µg/ml de kanamicina, y una capa de espectinomicina de 25 µg/ml.

Tabla 4: Transformación de la célula hospedera con plásmido integrativo generado cepas JCC1034 y JCC1518 a partir de *Synechococcus* sp. PCC7002 (JCC138) tipo salvaje.

Cepa	Hospedero	Plásmido Integrativo
JCC1034	JCC138	pJB594 (pAQ7:: Δ <i>ldh_kan_P(cro)_adh</i>)
JCC1581	JCC1034	pJB1156 (pAQ3::P(<i>nir07</i>)_pdc_adh_spec)

Construcción de la cepa JCC3351

[0118] Se integró pJB1767 (**Tabla 4**) que expresa *katG* dentro del genoma de una cepa original, (JCC1581; descrita anteriormente) mediante transformación natural y selección sobre 25 µg*mL⁻¹ de gentamicina. La cepa resultante fue renombrada como JCC3351.

[0119] Otra catalasa, tal como *katE* de *E. coli*, puede ser utilizada de manera alternativa o en adición a *katG*.

Ejemplo 6: Viabilidad y productividad de etanol de JCC1581 y JCC3351 en condiciones de luz natural

[0120] Tal como se describió anteriormente, se integró *katG* dentro del genoma de una cepa original de JCC1581 para producir la cepa

JCC3351. El efecto de la expresión de *katG* sobre la productividad de etanol se evaluó cultivando y comparando JCC1581 (control) y JCC3351 (*katG* experimental). Se inocularon las cepas original (JCC1581) y modificada mediante ingeniería genética (JCC3351) a partir de colonias individuales en tubos de ensayo en medio A+ con 10 mM de urea y antibióticos (Spec100 Kan50 Gent25) y crecieron bajo condiciones estándar (luz continua ; $\sim 100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 37°C; 2% CO₂; 150 rpm). Se utilizaron los cultivos de los tubos para inocular los precultivos de los frascos de 30 mL hasta OD730 = 0.5 en medio JB2.1 con 10 mM de urea y antibióticos bajo condiciones estándar. Los cultivos experimentales se cultivaron a partir de los precultivos de frasco hasta OD730 = 0.1 en 400 mL de medio JB2.1 con 3 mM de urea en un fotobiorreactor FMT150 (Photon Systems Instruments, República Checa). Se proporcionó luz mediante un arreglo LED de 630 nm LED ajustado desde 130 – 1,300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante un ciclo de luz de 12 horas de acuerdo con una distribución Gaussiana. Se proporcionó CO₂ burbujeando 1 L*min⁻¹ de 2% de CO₂ en N₂. Cada ciclo de 24 horas incluye un ciclo de luz de 12 horas y un ciclo de oscuridad de 12 horas en donde el arreglo de LED es apagado. El crecimiento se cuantificó periódicamente mediante esparcimiento de luz a 730 nm. Se midió la producción de etanol mediante GC-FID.

[0121] Los cultivos del fotobiorreactor FMT150 de JCC1581 (original) y JCC3351 (modificado mediante ingeniería genética) crecieron durante hasta 29 días. Se midieron el crecimiento (**Figura 4A**) y la producción total de etanol (**Figura 4B**) durante el transcurso del experimento desde 0 hasta 30 días. La producción de etanol en JCC3351 (que expresa *katG* heteróloga) excedió producción de etanol en JCC1581 (original).

Listado de Secuencias Informal

SEQ ID NO: 1

MC10 (cebador):

5' CTAACATATGGGCACCCAACCCGCCAGGAAATTAAGA 3'

SEQ ID NO: 2

MC11 (cebador):

5' CTAAGAATTCCTAGCCCCTAGGGAGATCAAACCGGTC 3'

SEQ ID NO: 3

KatG de *Synechocystis* sp. PCC 6803

secuencia de aminoácidos de catalasa, (katG) (EC 1.11.1.21), con actividad de catalasa y peroxidasa.

locus NP_441295

1 mgtqparklr nrvfphphnh rkekpmandq vpaskcpvmh ganttgqngn
lnwwpnaInl

61 dilhqhdrkt npmddgfnya eafqqlIdlaa vkqdlhlhmt dsqswwpadw
ghyggImirm

121 awhaagyri adgrggaatg nqrfapInsw pdnvnldkar rllwpikkky
gnklswgdli

181 ilagtmayes mglkvygfag grediwhpek diywgaekew lassdhrygs
edreslenpl

241 aavqmgliyv npegvdghpd plctaQdvrt tfarmamnde etvaltaggh
tvGkchgnsk

301 aeligpepeg advveqglgw hnqngkgvgr etmssgiega wtthptqwdn
gyfymIfnhe

361 welkkspaga wqwepvnike edkpvdvedp nirhnpimtd admamikdpi
yrqiserfyr

421 epdyfaevfa kawfklthrd lgpsrylgp dvpqedliwq dpippvdytl
segeikeleq

481 qilasglts elvctawdsa rtfssdyrg gangarirle pqknwpgnep
trlakvlavl

541 eniqanfakp vsladlivlg ggaaiakaal dggievnvpf lpgrgdatqa
mtdaesftpl

601 epihdgyrnw lkqdyavspe ellertqlm gltapemtvI iggmrvlgtn
hggtkhgvft

661 drvgvlsndf fvnltldmayq wrpagnnlye igdrqtgevk wtatkvdIvf
gsnsilrsya

721 evyaqddnre kfvrdfvaaw tkvmnadrfd lprg

SEQ ID NO: 4

KatE de *E. coli*

Una catalasa, *E. coli* KatE (EC 1.11.1.6) ($2\text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow \text{O}_2$), convierte
peróxido de hidrógeno en oxígeno.

locus YP_025308

1 msqhneknph qhqsplhdss eakpgmdsla pedgshrpaa eptppgaqpt
apgsIkapdt

61 rnekImsled vrkgseanyal ttnqgvriad dqnsIragrs gptIledfil
rekithfdhe

121 riperivhar gsaahgyfqp yksIsditka dflsdpnkit pvfvrfstvq
ggagsadtvr

181 dirgfatkfy teegifdlvg nntpiffiqd ahkfpdfvha vkpephwaip
qgqsahdtfw

241 dyvslqpetI hnvwmamsdr giprsyrtme gfgihtfrli naegkatfvr
fhwkplagka

301 slvwdeaqkl tgrdpdfhrr elweaieagd fpeyelgfql ipeedefkfd
fdlldptkli

361 peelvpvqrv gkmvlnrnpd nffaeneqaa fhpghivpgI dftndpllqg
rlfsytdtqi

421 srlggpnfhe ipinrptcpy hnfqrdgmhr mgidtnpany epsindnwp
retppgpkrr

481 gfsyqerve gnkvrrsps fgeyyshprl fwlsqtpfeq rhivdgfsfe
 lskvvrpyir
 541 ervvdqlahi dltlaqavak nlgietddq lntpppdvn glkkdpsls
 yaipdgdvkg
 601 rvvaillnde vrsadllail kalkakgvha kllysrngev taddgtvlp
 aatfagapsl
 661 tvdavivpcg niadiadngd anyylmeayk hlkpialagd arkfkatiki
 adqgeegive
 721 adsadgsfmd elltmaahr vwsripkidk ipa

SEQ ID NO: 5

Promotor P(*nir07*); este promotor es un constructo sintético basado en el promotor *nirA* de *Synechococcus* sp. PCC 7942. (Shin-Ichi Maeda *et al.* (1998). Secuencias que Actúan en *cis* Requeridas para Regulación Positiva Sensible a Nitrito, NtcB-Dependiente, del Operón de Asimilación de Nitrato en la cianobacteria *Synechococcus* sp. Cepa PCC 7942. *J. Bacteriol.* 180:4080–4088. El ATG en negrita representa el codón de iniciación de un gen expresado.

GCTTGTAGCAATTGCTACTAAAACTGCGATCGCTGCTGAAATGAGCT
 GGAATTTTGTCCCTCTCAGCTCAAAAAGTATCAATGATTACTTAATGTT
 TGTTCTGCGCAAACCTTCTTGCGAACATGCATGATTTACAAAAAGTTG
 TAGTTTCTGTTACCAATTGCGAATCGAGAACTGCCTAATCTGCCGAGT
 ATGCGATCCTTTAGCAGGAGGAAAACCATATG

SEQ ID NO: 6

promotor cro del fago lambda

5' TAACACCGTGCGTGTTGACTATTTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTTGC 3'

Lo que se reivindica es:

1. Un método para producir un producto de interés a base de carbono, que comprende cultivar una célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética en un cultivo celular en la presencia de CO₂ y luz bajo condiciones adecuadas para producir un producto de interés a base de carbono, en donde dicha célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una enzima clasificada bajo un número de la Comisión Enzimática seleccionado de EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, y EC 1.11.1.21.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha enzima tiene actividad de catalasa.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha enzima tiene actividad de peroxidasa.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha enzima se selecciona de KatG y KatE.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 4.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho cultivo celular comprende adicionalmente peróxido de hidrógeno.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho peróxido de hidrógeno está a una concentración de 0.1 a 50 mM en dicho cultivo celular.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho cultivo celular comprende un reactivo para mitigar la contaminación de dicho cultivo celular.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho cultivo celular se expone a condiciones de luz diurna.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética tiene una tasa de producción de etanol igual o más alta en dicho cultivo celular que una célula cianobacteriana de cualquier otra forma idéntica que carece de dicho ácido nucleico recombinante.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la tasa de producción de etanol de un cultivo de dicha célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética es mayor que una tasa seleccionada de: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, y 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la tasa de producción de etanol de un cultivo de dicha célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética es mayor que una tasa seleccionada de: 13, 14, 15, y 16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la masa de etanol producida por un cultivo de dichas células cianobacterianas modificadas mediante ingeniería genética por volumen de dicho cultivo es mayor que una cantidad seleccionada de: 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, y 8 g/L.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dicho etanol es producido durante hasta 30 días de cultivo.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha célula cianobacteriana es un etanológeno.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha célula cianobacteriana es una especie de *Synechococcus*.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha especie de *Synechococcus* es *Synechococcus* PCC 7002.
19. Un método para conferir resistencia al peróxido de hidrógeno a una célula cianobacteriana original, que comprende:
 - a. transformar dicha célula cianobacteriana original con un ácido nucleico que codifica una enzima seleccionada de KatG y KatE, resultando en una célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética; y
 - b. cultivar dicha célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética en un medio que comprende peróxido de hidrógeno.
20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicho peróxido de hidrógeno está a una concentración de 0.1 to 50 mM.
21. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha célula cianobacteriana original es un etanológeno.
22. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha célula cianobacteriana original es una especie de *Synechococcus*.
23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde dicha especie de *Synechococcus* es *Synechococcus* PCC 7002.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 4.

26. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19-25, en donde dicha célula cianobacteriana modificada mediante ingeniería genética tiene una tasa de producción de etanol incrementada o idéntica en comparación con la célula cianobacteriana original.

27. Una célula hospedera modificada mediante ingeniería genética que comprende un gen recombinante que codifica una primera enzima clasificada bajo un número de la Comisión Enzimática seleccionado a partir de EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, y EC 1.11.1.21, en donde dicha célula hospedera comprende adicionalmente una piruvato descarboxilasa recombinante o una alcohol deshidrogenasa recombinante.

28. La célula hospedera modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dicha célula hospedera es una cianobacteria.

29. La célula hospedera modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la reivindicación 28, en donde dicha cianobacteria es *Synechococcus* PCC 7002.

30. La célula hospedera modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dicha primera enzima se selecciona de KatG y KatE.

31. La célula hospedera modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dicha primera enzima

comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3.

32. La célula hospedera modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dicha primera enzima comprende una secuencia de aminoácido al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 4.

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: C12N 1/20	
(22) Fecha de solicitud: 28-06-13		(71) Solicitante(s): JOULE UNLIMITED TECHNOLOGIES, INC	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/580,094	(32) Fecha 23-12-11	(33) País US
		(72) Inventor(es): CONNOR, Michael y SKRALY, Frank, A.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 23-07-14	(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha:	
	Fecha de presentación de la solicitud: 21-12-12	No. publicación:	
	No. de solicitud: PCT/US2012/071250		
(54) Título: "MICROORGANISMOS RESISTENTES A ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO"			

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente divulgación identifica rutas y mecanismos para conferir resistencia a especies reactivas de oxígeno, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, a organismos fotoautotróficos. Está contemplado el uso de tales organismos en sistemas de cultivo de célula hospedera con altos niveles de especies reactivas de oxígeno, tales como sistemas de cultivo de célula hospedera descontaminados con peróxido de hidrógeno.

Sector: Industria química y farmacéutica, específicamente un método para producir un producto a base de carbono mediante organismos fotoautotróficos modificados para resistir especies reactivas de oxígeno, así como también un método para conferir a dichos organismos resistencia al peróxido de hidrógeno.

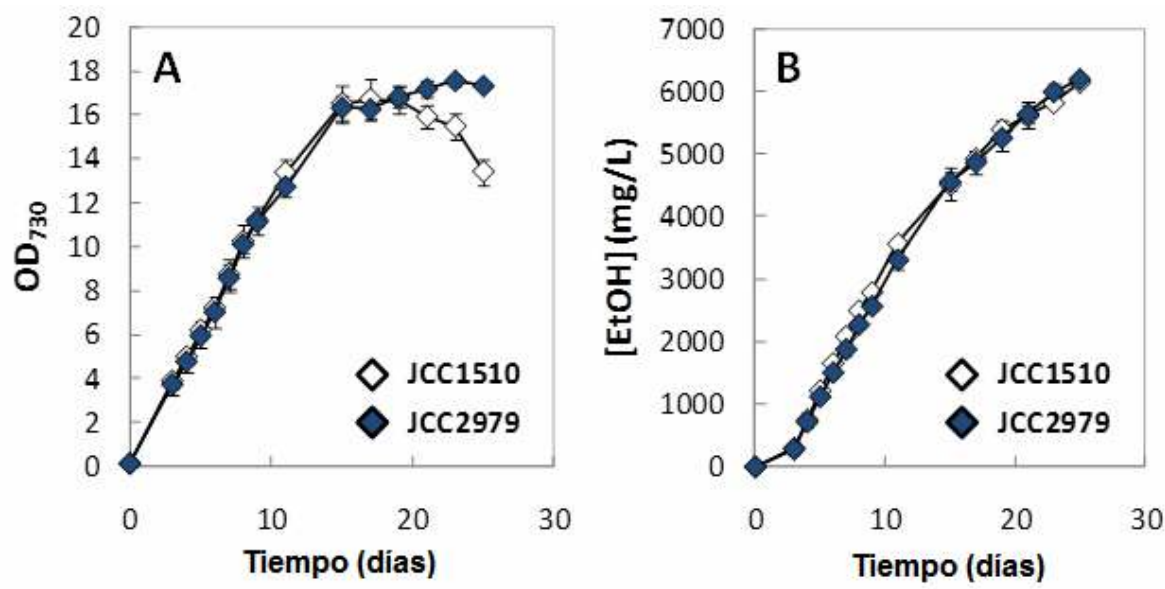


Figura 1

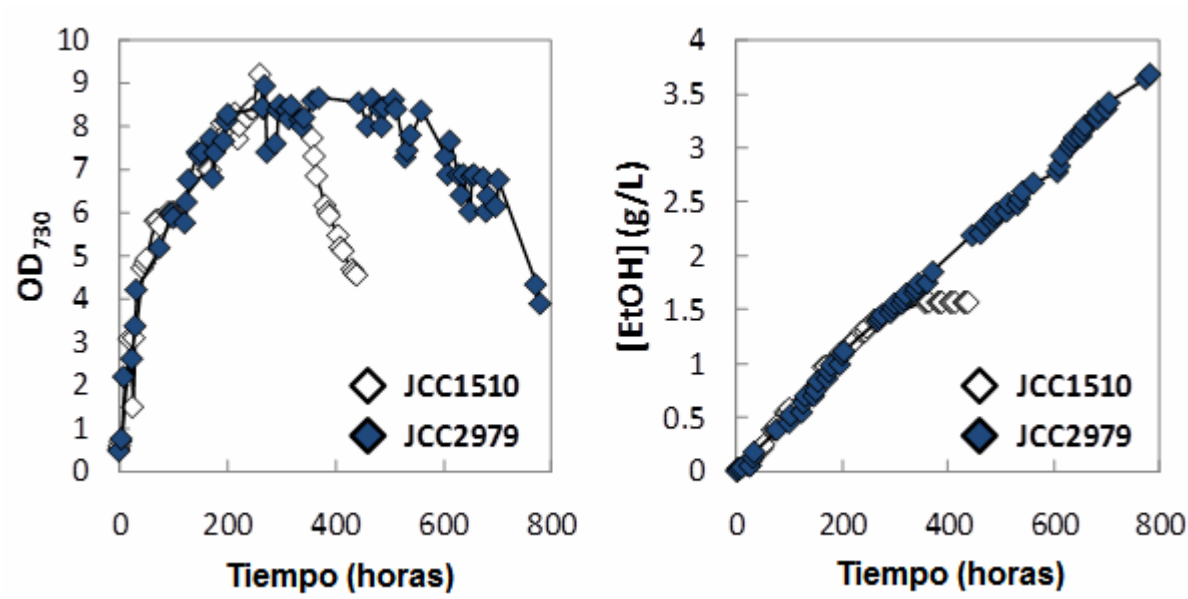


Figura 2

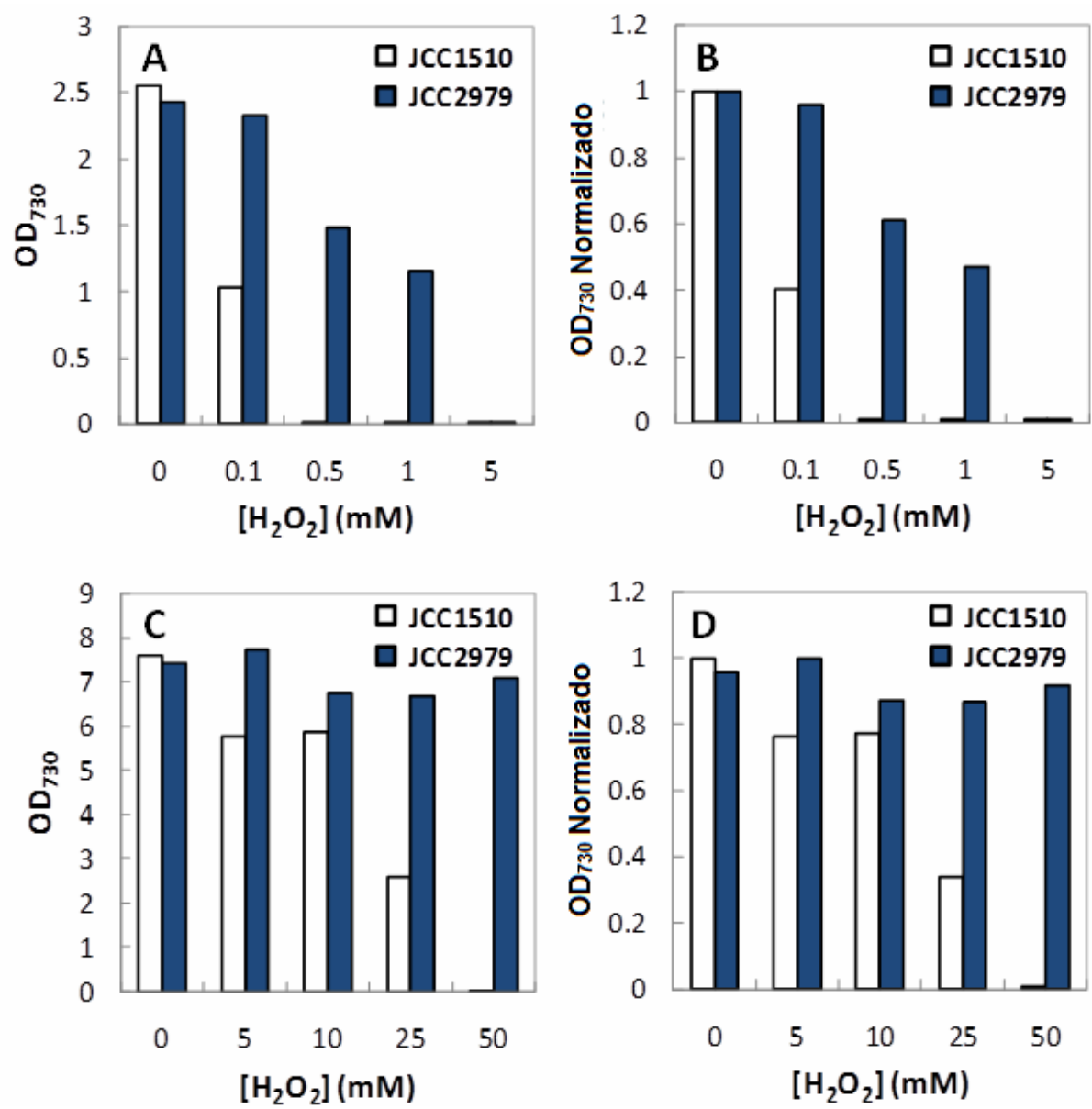
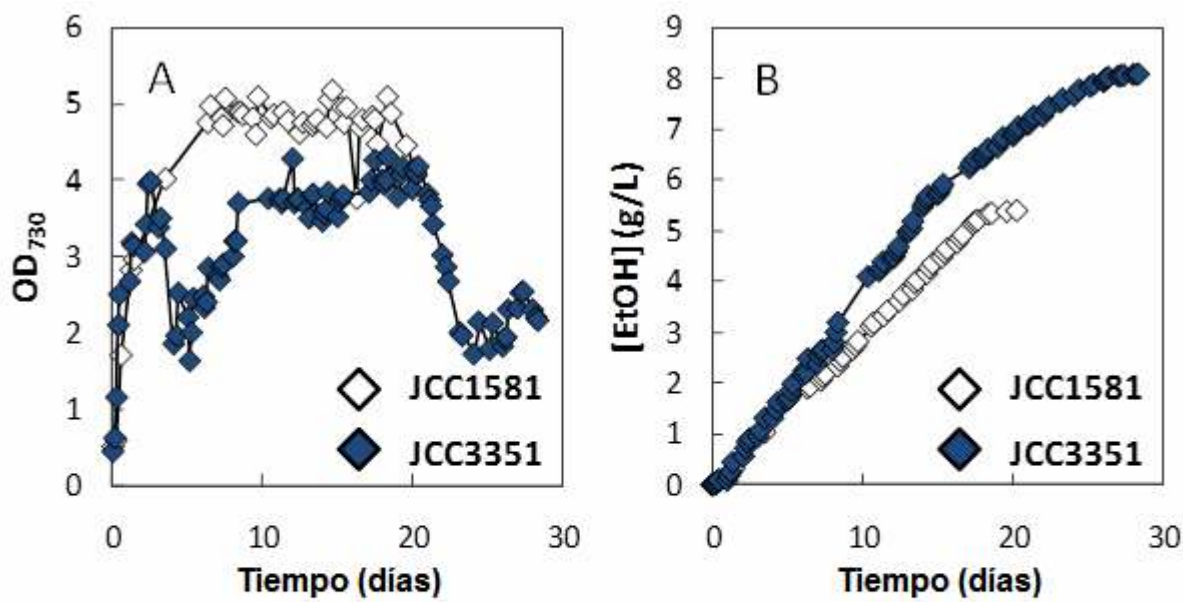


Figura 3



Cepa	Productividad EtOH ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	PE-PAR (%)
JCC1581	12.5	3.0
JCC3351	16.5	3.9

Figura 4

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

To: Nicholas S. Hurt
Fenwick & West LLP
Silicon Valley Center
801 California Street
Mountain View, California 94041
United States of America

Date of mailing
(day/month/year)

21 MAY 2013

Applicant's or agent's file reference
21978 PCT

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US12/71250

International filing date (day/month/year)

21 December 2012 (21.12.2012)

Priority date (day/month/year)

23 December 2011 (23.12.2011)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - C12N 1/20, 1/21, 15/31, 15/52; C12P 7/06; C07H 21/04 (2013.01)
USPC - 435/252.3, 161; 424/190.1; 514/44R

Applicant Joule Unlimited Technologies, Inc.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

09 May 2013 (09.05.2013)

Authorized officer:

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US12/71250

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a)).
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
☐ on paper
☒ in electronic form
 - b. (time)
☐ in the international application as filed
☒ together with the international application in electronic form
☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US12/71250

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
- ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
- ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
- ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
- ☒ not complied with for the following reasons:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-18 are directed toward a method to produce a carbon-based product of interest, comprising culturing an engineered cyanobacterial cell in a cell culture in the presence of CO₂ and light under conditions suitable to produce a carbon-based product of interest, wherein said engineered cyanobacterial cell comprises a recombinant nucleic acid encoding an enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21.

Group II: Claims 19-26 are directed toward a method for conferring hydrogen peroxide resistance to a parent cyanobacterial cell, comprising: a. transforming said parent cyanobacterial cell with a nucleic acid encoding an enzyme selected from KatG and KatE, resulting in an engineered cyanobacterial cell; and b. culturing said engineered cyanobacterial cell in a medium comprising hydrogen peroxide.

Group III: Claims 27-32 are directed toward an engineered host cell comprising a recombinant gene encoding a first enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21, wherein said host cell further comprises a recombinant pyruvate decarboxylase or a recombinant alcohol dehydrogenase.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I includes: a method to produce a carbon-based product of interest, comprising culturing an engineered cyanobacterial cell in a cell culture in the presence of CO₂ and light under conditions suitable to produce a carbon-based product of interest, wherein said engineered cyanobacterial cell comprises a recombinant nucleic acid encoding an enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21, which is not present in Group II; Group II having special technical features including a method for conferring hydrogen peroxide resistance to a parent cyanobacterial cell, comprising: a. transforming said parent cyanobacterial cell with a nucleic acid encoding an enzyme selected from KatG and KatE, resulting in an engineered cyanobacterial cell; and b. culturing said engineered cyanobacterial cell in a medium comprising hydrogen peroxide, which are not present in Group III; Group III having special technical features including an engineered host cell comprising a recombinant gene encoding a first enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21, wherein said host cell further comprises a recombinant pyruvate decarboxylase or a recombinant alcohol dehydrogenase.

Groups I-III have the shared technical features including a recombinant/engineered cyanobacterial cell, wherein said engineered cyanobacterial cell comprises a recombinant nucleic acid encoding an enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2010/0215679 A1 to Horwitz, et al. (hereinafter 'Horwitz'). Horwitz discloses a recombinant/engineered cyanobacterial cell (Claim 21; *L. monocytogenes* is a cyanobacterial cell; please also see the included BioCyc Database Collection evidentiary reference, indicating that *L. monocytogenes* is a cyanobacterial organism), wherein said engineered cyanobacterial cell comprises a recombinant nucleic acid encoding an enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21 (Claim 21; KatG is the selected enzyme).

Since none of the special technical features of the Groups I-III inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Horwitz reference, unity of invention is lacking.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-18, SEQ ID NOS: 3, 4

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US12/71250

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3, 5-9, 12-15	YES
	Claims	1, 2, 4, 10, 11, 16-18	NO
Inventive step (IS)	Claims	NONE	YES
	Claims	1-18	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-18	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1, 2, 4 and 10 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2011/0262975 A1 to Berry, et al. (hereinafter 'Berry').

As to claims 1, 2 and 4, Berry discloses a method to produce a carbon-based product of interest (a method of selecting and using various organisms to directly convert sunlight and carbon dioxide into carbon-based products is also disclosed; paragraph [0008]), comprising culturing an engineered cyanobacterial cell in a cell culture in the presence of CO₂ and light under conditions suitable to produce a carbon-based product of interest (a method of selecting and using various organisms to directly convert sunlight and carbon dioxide into carbon-based products is also disclosed; paragraph [0008]; cyanobacteria can be used to produce the desired carbon-based products of interest, paragraph [0009]; the host cell is engineered to produce a carbon-based product, paragraph [0010]; said engineered host cell is cultured, paragraph [0057]), wherein said engineered cyanobacterial cell comprises a recombinant nucleic acid encoding an enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21; wherein said enzyme has catalase activity; and wherein said enzyme is selected from KatG and KatE (katE, which is E. coli. Catalase, EC 1.11.1.6, is included for ascorbate production in the host cell, figure 1H; paragraph [0489]; carbon-based products of interest are produced by expressing a gene or a set of genes, as described in figure 1 in a photoautotrophic microorganism, e.g., cyanobacteria, and plasmids containing the genes (nucleic acids) of interest are constructed to express various proteins that are useful in production of carbon-based products, as described in the examples herein, and the constructs can be synthetically made, paragraph [0122]; a recombinant nucleic acid molecule or protein is one that has a sequence that is not naturally occurring or has a sequence that is made by an artificial combination of two otherwise separated segments of a sequence (the plasmid contains artificial combinations of otherwise separated segments of a sequence and is, therefore, recombinant), paragraph [0113]).

As to claim 10, Berry discloses the method of claim 1, and Berry further discloses wherein said cell culture is exposed to diurnal light conditions (culture conditions are optimized for the diurnal cycle, paragraph [0280]).

Claims 1, 2, 4, 11 and 16-18 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2011/0124073 A1 to Devroe, et al. (hereinafter 'Devroe').

As to claims 1, 2 and 4, Devroe discloses a method to produce a carbon-based product of interest, comprising culturing an engineered cyanobacterial cell in a cell culture in the presence of CO₂ and light under conditions suitable to produce a carbon-based product of interest (the present invention provides methods and compositions for engineering pathways that stably utilize photosynthetic organisms by, e.g., genetically improving their light capture and carbon fixation efficiencies and by optimizing their growth properties for propagation in photobioreactors, and provides the resulting engineered 'HyperPhotosynthetic' cells and organisms that enable efficient conversion of carbon dioxide and light into carbon-based products of interest, paragraph [0007]; the instant invention enables conversion of a photoautotrophic organism, including cyanobacteria, into a Hyperphotosynthetic organism, paragraph [0072]; said cell in the presence of CO₂ and light to produce the carbon-based products of interest, paragraph [0023]), wherein said engineered cyanobacterial cell comprises a recombinant nucleic acid encoding an enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21; wherein said enzyme has catalase activity; and wherein said enzyme is selected from KatG and KatE (a nucleic acid that originated in a different microorganism can be engineered into an alternate cell using recombinant DNA techniques, paragraph [0043]; the photoautotrophic cells are engineered to overexpress catalase, such as the katG (NP-441295) gene from Synechocystis sp. PCC 6803 (Devroe discloses the EC number for this enzyme as being 1.11.16, however, this appears to be a typographical error, as the gene name (katG), RefSeq entry (NP-441295), and strain (Synechocystis PCC 6803) coincide with the enzyme disclosed by SEQ ID NO: 3 on page 35 of the instant PCT application, which has the EC number 1.11.1.21, and is further evidenced by the publicly available EC number associated with this enzyme at <http://www.uniprot.org/uniprot/P73911.txt?version=76>, in addition to 1.11.16 being an improper EC number, as EC numbers have 4 separate fields), paragraph [0296]).

----Continued Within the Next Supplemental Box----

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US12/71250

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Box No. V:

-Continued from Citations and Explanations:

As to claim 11, Devroe discloses the method of claim 1, and Devroe further discloses wherein said engineered cyanobacterial cell has the same or a higher rate of ethanol production in said cell culture than an otherwise identical cyanobacterial cell lacking said recombinant nucleic acid (the amplified fbp1 PCR gene products were cloned into the pJB5 expression vector and ligated, paragraph [0252]; the pJB5-fbp1 plasmid was then purified and one to two micrograms of the aforementioned plasmid DNAs were added to individual JCC136 cell preparations and integrated into the target *Synechococcus* host cells and the new strain containing the plasmid (recombinant nucleic acid) was named JCC136-Fbp1, paragraph [0253]; a single colony of both JCC136 and JCC136-Fbp1 was grown and samples measured for ethanol production, paragraphs [0254], [0255]; strain JCC136-Fbp1 (identical to JCC136, but containing the recombinant pJB5-fbp1 plasmid nucleic acid) produced ethanol at a higher rate than JCC136 over a 96 hour period (the right graph shows the normalized ethanol production), figure 11).

As to claims 16, 17, and 18, Devroe discloses the method of claim 1, and Devroe further discloses wherein said cyanobacterial cell is an ethanologen (*Synechococcus* sp. PCC 7002 strains JCC136 and JCC136-Fbp1 produce ethanol (the strains are ethanologens); figure 11; paragraph [0034]); wherein said cyanobacterial cell is a *Synechococcus* species (*Synechococcus* sp. PCC 7002 strains JCC136 and JCC136-Fbp1 produce ethanol (the strains are ethanologens); figure 11; paragraph [0034]); and wherein said *Synechococcus* species is *Synechococcus* PCC 7002 (*Synechococcus* sp. PCC 7002 strains JCC136 and JCC136-Fbp1 produce ethanol (the strains are ethanologens); figure 11; paragraph [0034]).

Claims 3 and 5 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Devroe in view of the article entitled 'Purification And Characterization Of A Hydroperoxidase From The Cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: Identification Of Its Gene By Peptide Mass Mapping Using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Light Mass Spectrometry' by Regelsberger, et al. (hereinafter 'Regelsberger').

As to claims 3 and 5, Devroe discloses the method of claim 1, but Devroe does not disclose wherein said enzyme has peroxidase activity; and wherein said enzyme comprises an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO: 3. Regelsberger discloses wherein said enzyme has peroxidase activity; and wherein said enzyme comprises an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO: 3 (*Synechocystis* PCC 6803 KatG is a catalase-peroxidase, page 5, column 1, paragraph 1; *Synechocystis* PCC 6803 has both catalase and peroxidase activity, page 6, Table 2; *Synechocystis* PCC 6803 katG has a 754 amino acid sequence that is 100% identical to SEQ ID NO: 3 of the instant PCT application, figure 4 of the Regelsberger reference). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the method, as previously disclosed by Devroe, in order to have integrated the use of the peroxidase activity and amino acid sequence of the *Synechocystis* PCC 6803 KatG enzyme, as previously disclosed by Regelsberger, for the purpose of cloning a gene encoding the amino acid sequence of *Synechocystis* PCC 6803 KatG into a host cell, for enabling a cyanobacteria-like host to defend against toxic oxygen intermediates, such as hydrogen peroxide (Regelsberger, page 1, column 2, paragraph 1 to page 2, column 1, paragraph 1).

Claim 6 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Berry in view of the article entitled 'Nucleotide Sequence Of *Escherichia Coli* katE, Which Encodes Catalase HPII' by Ossowski, et al. (hereinafter 'Ossowski').

As to claim 6, Berry discloses the method of claim 1, but Berry does not disclose wherein said enzyme comprises an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO: 4. Ossowski discloses an amino acid sequence 100% identical to SEQ ID NO: 4 (the nucleotide sequence of katE encodes a 753 amino acid protein (identical to SEQ ID NO: 4), page 515, column 2, paragraph 2 to page 516, column 1, paragraph 1; figure 4). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the method, as previously disclosed by Berry, in order to have integrated the use of the *E. coli* katE catalase enzyme sequence, as previously disclosed by Ossowski, having a sequence identical to SEQ ID NO: 4, for cloning the nucleotide sequence producing the katE amino acid sequence into a plasmid (Berry, paragraph [0122]), for aiding in ascorbate synthesis in the host cell (Berry, figure 1H; paragraph [0489]).

---Continued Within the Next Supplemental Box---

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US12/71250

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Box No. V:

-Continued from Citations and Explanations:

Claims 7-9 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Devroe in view of the article entitled 'Use Of Sulfite And Hydrogen Peroxide To Control Bacterial Contamination In Ethanol Fermentation' by Chang, et al. (hereinafter 'Chang').

As to claims 7, 8 and 9, Devroe discloses the method of claim 1, but Devroe does not disclose wherein said cell culture further comprises hydrogen peroxide, wherein said hydrogen peroxide is at a concentration of 0.1 to 50 mM in said cell culture, or wherein said cell culture comprises a reagent to mitigate contamination of said cell culture. Chang discloses wherein said cell culture further comprises hydrogen peroxide (cells harvested at the end of the log phase were resuspended in air-saturated fresh media, and 5 ml of the suspension was placed in anaerobic sterilized pressure tubes and stock solutions of hydrogen peroxide was added to the tubes by before they were incubated, page 2, column 1, paragraph 4); wherein said hydrogen peroxide is at a concentration of 0.1 to 50 mM in said cell culture (the viability of yeast cells did not change with hydrogen peroxide up to 40 mM, and the viability of *L. casei* did not change with hydrogen peroxide up to 10 mM, but the viability of *L. fermentum* was reduced by hydrogen peroxide even at a concentration of 0.5 mM, page 3, column 2, paragraph 4); and wherein said cell culture comprises a reagent to mitigate contamination of said cell culture (cell-recycled continuous ethanol fermentation (culture) can be maintained successfully by controlling (mitigating) bacterial contamination with hydrogen peroxide (reagent), page 6, column 1, paragraph 3). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the method, as previously disclosed by Devroe, in order to have integrated the use of hydrogen peroxide as a reagent in the cell culture for mitigating contamination of the culture, as previously disclosed by Chang, for inhibiting *L. fermentum* (Chang; figure 6) in a cell culture where ethanol producing *Synechococcus* PCC 7002 cells (Devroe; figure 11) that have been engineered to overexpress *Synechocystis* PCC 6803 katG catalase (Devroe; paragraph [0296]) are able to survive the hydrogen peroxide conditions (Chang; page 6, column 1, paragraph 1), while the hydrogen peroxide works to prevent growth of the *L. fermentum* contaminant (Chang; figure 6).

Claims 12-15 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Devroe in view of Berry.

As to claims 12, 13, 14 and 15, Devroe discloses the method of claim 1, but Devroe does not disclose wherein the production rate of ethanol of a culture of said engineered cyanobacterial cells is greater than a rate selected from: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, and 400 mg*L⁻¹*day⁻¹; wherein the production rate of ethanol of a culture of said engineered cyanobacterial cells is greater than a rate selected from: 13, 14, 15, and 16 mg*L⁻¹*h⁻¹; wherein the mass of ethanol produced by a culture of said engineered cyanobacterial cells per volume of said culture is greater than an amount selected from: 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, and 8 g/L; and wherein said ethanol is produced during up to 30 days of culture. Berry discloses wherein the production rate of ethanol of a culture of said engineered cyanobacterial cells is greater than a rate selected from: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, and 400 mg*L⁻¹*day⁻¹ (the host cell capable of CO₂ fixation produces ethanol at between 50 and 150 g/L in a 48 hour period (48 hours = 2 days, which equates to 50 g/L/2 days to 150 g/L/2 days, which equals 25 to 75 g*L⁻¹*day⁻¹), or 25000 to 75000 mg*L⁻¹*day⁻¹), which is well over 400 mg*L⁻¹*day⁻¹), paragraph [0155]), wherein the production rate of ethanol of a culture of said engineered cyanobacterial cells is greater than a rate selected from: 13, 14, 15, and 16 mg*L⁻¹*h⁻¹ (the rate of ethanol productivity is in the range of about 2.5 g/L-hr to about 5 g/L-hr (*1000 to convert from grams to mg = 2500 - 5000 mg*L⁻¹*h⁻¹), paragraph [0155]); wherein the mass of ethanol produced by a culture of said engineered cyanobacterial cells per volume of said culture is greater than an amount selected from: 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, and 8 g/L (the host cell is capable of CO₂ fixation that produces ethanol at between about 50 and 150 g/L in about a 48 hour period, and can be *Synechococcus* sp PCC 7002, paragraph [0155]; *Synechococcus* sp. PCC 7002 cells are cultured in A+ medium, paragraph [0141]); and wherein said ethanol is produced during up to 30 days of culture (the host cell is capable of CO₂ fixation that produces ethanol at between about 50 and 150 g/L in about a 48 hour period, and can be *Synechococcus* sp PCC 7002, paragraph [0155]; *Synechococcus* sp. PCC 7002 cells are cultured in A+ medium, paragraph [0141]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the method, as previously disclosed by Devroe, to have included the production rates and time frames, as previously disclosed by Berry, for commercially producing ethanol (Berry; paragraph [0013]) by the cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Berry, paragraph [0141]; Devroe, paragraph [0080]) that have been engineered to overexpress katG (Devroe, paragraph [0296]) for conferring flue gas tolerance, such that the cells can fix the CO₂ from flue gas (Devroe, paragraph [0294]) to produce ethanol.

Claims 1-18 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 21978 PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US12/71250	International filing date (<i>day/month/year</i>) 21 December 2012 (21.12.2012)
(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 23 December 2011 (23.12.2011)	
Applicant Joule Unlimited Technologies, Inc.	

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1
☒ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US12/71250

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
☐ on paper
☒ in electronic form
 - b. (time)
☐ in the international application as filed
☒ together with the international application in electronic form
☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US12/71250

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-Please See Supplemental Page-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Group I: Claims 1-18, SEQ ID NOs: 3, 4

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US12/71250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 1/20, 1/21, 15/31, 15/52; C12P 7/06; C07H 21/04 (2013.01)

USPC - 435/252.3, 161; 424/190.1; 514/44R

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8): C12N 1/20, 1/12, 1/21, 15/09, 15/10, 9/08, 15/117, 15/31, 15/74, 15/63, 15/52, 15/53; C12P 7/06, 1/04; C07H 21/04 (2013.01)

USPC: 435/252.3, 252.1, 253.6, 257.1, 257.2, 260, 243, 41, 69.1, 161, 170, 192, 245; 424/190.1, 234.1, 185.1, 184.1, 200.1, 616

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; GoogleScholar; DialogPRO; Elsevier; CyanoBase; UniProtKB; cyanobacter*, synechococc*, synechocyst*, catalase, peroxidase, catalase-peroxidase, 'katG,' 'katE,' culture*, 1.11.1.6, 1.11.1.7, 1.11.1.21, 'hydrogen peroxide,' 'H2O2,' media, contaminata*, 'reactive oxygen species,' recombinant

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	2011/0262975 A1 (BERRY, DA et al.), October 27, 2011; abstract; paragraphs [0008]-[0010], [0113], [0122], [0280], [0489]	1, 2, 4, 10 ----- 6, 12-15
X --- Y	US 2011/0124073 A1 (DEVROE, EJ et al.), May 26, 2011; abstract; figure 11; paragraphs [0007], [0023], [0034], [0072], [0252]-[0255], [0296]	1, 2, 4, 11, 16-18 ----- 3, 5, 7-9, 12-15
Y	REGELSBERGER, G et al. Purification And Characterization Of A Hydroperoxidase From The Cyanobacterium Synechocystis PCC 6803: Identification Of Its Gene By Peptide Mass Mapping Using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Light Mass Spectrometry. FEMS Microbiology Letters. 1999; pp 1-12, ISSN: 0378-1097/99; page 1, column 2, paragraph 1 to page 2, column 1, paragraph 1; page 5, column 1, paragraph 1; figure 4.	3, 5
Y	OSSOWSKI, IV et al. Nucleotide Sequence Of Escherichia Coli KatE, Which Encodes Catalase HPII. J. Bacteriol. January 1991, Vol. 173, No. 2, pp 514-520, ISSN: 0021-9193/91/020514-07; page 515, column 2, paragraph 2 to page 516, column 1, paragraph 1; figure 4.	6
Y	CHANG, IS et al. Use Of Sulfite And Hydrogen Peroxide To Control Bacterial Contamination In Ethanol Fermentation. Appl. Environ. Microbiol. January 1997, Vol. 63, No. 1, pp 1-6, ISSN: 0099-2240/97; page 2, column 1, paragraph 4; page 3, column 2, paragraph 4; page 6, column 1, paragraph 3.	7-9
L	P73911 (KATG_SYNY3). 22-JUL-2008, integrated into UniProtKB/Swiss-Prot. 01-FEB-1997, sequence version 1. 16-NOV-2011, entry version 76. Accessed May 9, 2013; <http://www.uniprot.org/uniprot/P73911.txt?version=76>.	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 May 2013 (09.05.2013)

Date of mailing of the international search report

21 MAY 2013

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US12/71250

-Continued from Box No. III:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-18 are directed toward a method to produce a carbon-based product of interest, comprising culturing an engineered cyanobacterial cell in a cell culture in the presence of CO₂ and light under conditions suitable to produce a carbon-based product of interest, wherein said engineered cyanobacterial cell comprises a recombinant nucleic acid encoding an enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21.

Group II: Claims 19-26 are directed toward a method for conferring hydrogen peroxide resistance to a parent cyanobacterial cell, comprising: a. transforming said parent cyanobacterial cell with a nucleic acid encoding an enzyme selected from KatG and KatE, resulting in an engineered cyanobacterial cell; and b. culturing said engineered cyanobacterial cell in a medium comprising hydrogen peroxide.

Group III: Claims 27-32 are directed toward an engineered host cell comprising a recombinant gene encoding a first enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21, wherein said host cell further comprises a recombinant pyruvate decarboxylase or a recombinant alcohol dehydrogenase.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I includes: a method to produce a carbon-based product of interest, comprising culturing an engineered cyanobacterial cell in a cell culture in the presence of CO₂ and light under conditions suitable to produce a carbon-based product of interest, wherein said engineered cyanobacterial cell comprises a recombinant nucleic acid encoding an enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21, which is not present in Group II; Group II having special technical features including a method for conferring hydrogen peroxide resistance to a parent cyanobacterial cell, comprising: a. transforming said parent cyanobacterial cell with a nucleic acid encoding an enzyme selected from KatG and KatE, resulting in an engineered cyanobacterial cell; and b. culturing said engineered cyanobacterial cell in a medium comprising hydrogen peroxide, which are not present in Group III; Group III having special technical features including an engineered host cell comprising a recombinant gene encoding a first enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21, wherein said host cell further comprises a recombinant pyruvate decarboxylase or a recombinant alcohol dehydrogenase.

Groups I-III have the shared technical features including a recombinant/engineered cyanobacterial cell, wherein said engineered cyanobacterial cell comprises a recombinant nucleic acid encoding an enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2010/0215679 A1 to Horwitz, et al. (hereinafter 'Horwitz'). Horwitz discloses a recombinant/engineered cyanobacterial cell (Claim 21; *L. monocytogenes* is a cyanobacterial cell; please also see the included BioCyc Database Collection evidentiary reference, indicating that *L. monocytogenes* is a cyanobacterial organism), wherein said engineered cyanobacterial cell comprises a recombinant nucleic acid encoding an enzyme classified under an Enzyme Commission number selected from EC 1.11.1.6, EC 1.11.1.7, and EC 1.11.1.21 (Claim 21; KatG is the selected enzyme).

Since none of the special technical features of the Groups I-III inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Horwitz reference, unity of invention is lacking.

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO	
PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____			
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 28-06-13			
(51) Clasificación Internacional: C12N 1/20			
(71) Solicitante(s): JOULE UNLIMITED TECHNOLOGIES, INC			
(72)Inventor(es): CONNOR, Michael y SKRALY, Frank, A.			
(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/580,094	(32) Fecha 23-12-11	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 23-07-14		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 21-12-12 No. de solicitud: PCT/US2012/071250		Fecha: No. Publicación:	
(54) Título: MICROORGANISMOS RESISTENTES A ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO.			
(57) Resumen - Reivindicación(es):			
Resumen.-			
La presente divulgación identifica rutas y mecanismos para conferir resistencia a especies reactivas de oxígeno, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, a organismos fotoautotróficos. Está contemplado el uso de tales organismos en sistemas de cultivo de célula hospedera con altos niveles de especies reactivas de oxígeno, tales como sistemas de cultivo de célula hospedera descontaminados con peróxido de hidrógeno.			
Sector: Industria química y farmacéutica, específicamente un método para producir un producto a base de carbono mediante organismos fotoautotróficos modificados para resistir especies reactivas de oxígeno, así como también un método para conferir a dichos organismos resistencia al peróxido de hidrógeno.			

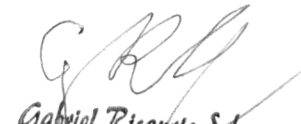
		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____			
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 28-06-13			
(51) Clasificación Internacional: C12N 1/20			
(71) Solicitante(s): JOULE UNLIMITED TECHNOLOGIES, INC			
(72) Inventor(es): CONNOR, Michael y SKRALY, Frank, A.			
(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/580,094	(32) Fecha 23-12-11	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 23-07-14		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 21-12-12 No. de solicitud: PCT/US2012/071250		Fecha: No. publicación:	
(54) Título: MICROORGANISMOS RESISTENTES A ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO.			

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 0077/13 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 24 de Junio de 2013 por el Sr. Gabriel Ricaurte Echeverri, C.C. 25.965 de Bogotá, Traductor Oficial según Resolución No. 3987 de agosto 17 de 1981 expedida por el Ministerio de Justicia.

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS
SUB-SECRETARIO DE COMERCIO DE PROPIEDAD INTELECTUAL
DIRECTOR DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS

ENERO 10, 2012

NICHOLAS S. HURT
801 CALIFORNIA STREET
MOUNTAIN VIEW, CA 94041


Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

501779838

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS
AVISO DE INSCRIPCIÓN DE DOCUMENTO DE TRASPASO

EL DOCUMENTO ADJUNTO SE HA INSCRITO POR LA RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA COMPLETA SE ENCUENTRA DISPONIBLE EN LA SALA DE BÚSQUEDA DE TRASPASO EN EL NÚMERO DE MARCO Y CARRETE QUE SE RELACIONAN ABAJO.

FAVOR REVISAR TODA LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO. LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO DE INSCRIPCIÓN REFLEJA LOS DATOS PRESENTES EN EL SISTEMA DE TRASPASOS DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED LLEGA A ENCONTRAR ALGÚN ERROR O TIENE PREGUNTAS ACERCA DE ESTE AVISO, USTED PUEDE CONTACTAR A LA RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS EN 571-272-3350. POR FAVOR ENVÍE SOLICITUD DE CORRECCIÓN A: OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS, PARADA DE CORREO: RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS, A.A. 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE INSCRIPCIÓN: 01/09/2012

MARCO/CARRETE: 027501/0323

NÚMERO DE PÁGINAS: 4

MEMORIAL: TRASPASO DEL INTERÉS DE LOS CEDENTES (VER DOCUMENTO PARA DETALLES).

NÚMERO DE EXPEDIENTE: 26139-19722

CEDENTE:

CONNOR, MICHAEL

FECHA DEL DOCUMENTO: 01/06/2012

CEDENTE:

SKRALY FRANK A.

FECHA DEL DOCUMENTO: 01/06/2012

CESIONARIO:

JOULE UNLIMITED TECHNOLOGIES, INC.

83 ROGERS STREET

CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142


Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

NÚMERO DE SOLICITUD: 61580094

FECHA DE RADICACIÓN:

NÚMERO DE PATENTE:

FECHA DE EXPEDICIÓN:

TÍTULO: ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO RESISTENTES A MICROORGANISMOS

RAMA DE INSCRIPCIÓN DE TRASPASOS

DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

501779838 01/09/2012

TRASPASO DE PATENTE

Versión electrónica v 1.1.

Versión de Pagina v1.1

Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981



TIPO DE PRESENTACIÓN:	NUEVO TRASPASO
NATURALEZA DE LA CESIÓN:	TRASPASO

INFORMACIÓN DE LA PARTE CEDENTE

Nombre	Fecha de Firma
Michael Connor	01/06/2012
Frank A. Skraly	01/06/2012

INFORMACIÓN DE LA PARTE RECEPTORA

Nombre:	Joule Unlimited Technologies, Inc
Dirección:	83 Rogers Street
Ciudad:	Cambridge
Estado/País:	MASSACHUSETTS
Código Postal:	02142

Números de Propiedad total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de Solicitud:	61580094

DATOS DE CORRESPONDENCIA

Número de Fax:	(650) 938-5200
Teléfono	415-875-2427
Correo electrónico	mnascimento@fenwick.com
La Correspondencia se enviará primero por correo-e; si este no tiene éxito, ésta se enviará por correo de los EEUU.	
Nombre del Corresponsal:	Nicholas S. Hurt
Dirección Línea 1:	801 California Street
Dirección Línea 4:	Mountain View, CALIFORNIA 94041
Número de Expediente del Abogado:	26139-19722
NOMBRE DEL REMITENTE:	Nicholas S. Hurt, Reg. No. 65204
Total Anexos:3 Fuente= 19722_US_Traspaso # página 1.tif Fuente= 19722_US_Traspaso # página 2.tif Fuente= 19722_US_Traspaso # página 3.tif	


Gabriel Ricarte Echeverri
 Traductor Oficial
 Res. 3987 del Ministerio de
 Justicia de Agosto 17 de 1981

TRASPASO

CONSIDERANDO, que, Nosotros, Michael Connor y Frank A. Skraly, hemos Inventado una o más invenciones descritas en una solicitud provisional para Patente de Invención de los Estados Unidos titulada:

Microorganismos Resistentes a especies reactivas de Oxígeno

e identificada por el Expediente No. JBT-277 y el Serial No. **61/580,094**, Presentada en la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos el 23 de diciembre de 2011;

y

CONSIDERANDO, que Joule Unlimited Technologies, Inc., (en adelante "CESIONARIO"), una sociedad organizada y Existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, y que tiene un lugar usual de negocios en 83 Rogers Street, Cambridge, MA 02142, desea adquirir un interés del mismo, de acuerdo con los acuerdos debidamente celebrados con nosotros;

AHORA, POR LO TANTO, a quien pueda interesar se hace constar que por, y en consideración de, los mencionados acuerdos y a título oneroso, cuyo pago se da por recibido por medio de este documento, nosotros hemos vendido, cedido y transferido, y por medio del presente documento vendemos, cedemos, y transferimos

al mencionado CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios, y representantes legales todo nuestro derecho, título e interés en y a lo largo de los Estados Unidos de América, sus territorios y todos los países del extranjero, en y para la(s) invención (es) descritas en la mencionada solicitud, junto con todo nuestro derecho, título e interés en y para la mencionada solicitud y tales Patentes de Invención que se pueden expedir sobre la misma o reivindicar prioridad bajo las leyes de los Estados Unidos o convención internacional, incluyendo pero no limitada a no provisionales, continuaciones, divisionales, reexpediciones, nuevas evaluaciones, prórrogas, y substituciones de la mencionada solicitud o tal Patente de Invención; la (s) mencionada (s) solicitud (es) y Patentes de Invención que serán tenidas y disfrutadas por el mencionado CESIONARIO para su propio uso y en representación de y para sus sucesores, cesionarios y representantes legales, hasta el completo fin del término para el cual se conceda tal Patente de Invención tan total y completamente como habría sido tenido el mismo por nosotros si este traspaso y venta no se hubieran realizado; nosotros por medio de este documento cedemos todos nuestros derechos que surjan bajo y de conformidad con cualquiera y todas las leyes de los Estados Unidos y acuerdos, tratados o leyes internacionales relacionadas con la protección de la propiedad industrial al presentar cualquiera de tales solicitudes de Patentes de Invención, incluyendo pero no limitado a las causales para demandar y los daños que se acumulen antes de este traspaso. Nosotros por medio de este documento reconocemos que este traspaso, que es de todo nuestro derecho, título e interés en y para la(s) mencionada(s) invención (es) lleva con ella el derecho del CESIONARIO de solicitar y obtener de las autoridades competentes en todos los países del mundo, cualquiera y todas las Patentes de Invención mediante

apoderados y agentes a elección del CESIONARIO y el derecho de solicitar la concesión de todas las Patentes de Invención para el CESIONARIO en su propio nombre como cesionario de todo nuestro derecho, título e interés en la misma;

Y, nosotros por medio de este documento también acordamos para nosotros mismos y nuestros ejecutores y administradores firmar a solicitud cualesquiera otros documentos legítimos y de otra manera ejecutar cualquier otro acto legítimo, que se pueda considerar como necesario para asegurar totalmente la(s) mencionada(s) invención (es) al mencionado CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios, y representantes legales, pero a su propia costa, incluyendo la firma de la respectiva solicitud no provisionales, substitución, continuación, división, reexpedición, o nuevo examen de patentes extranjeras o internacionales;

Y, nosotros también acordamos proporcionar las declaraciones o testimonios en cualquier interferencia u otro procedimiento en el cual la (s) mencionada (s) invención (es) o cualquier solicitud o patente que se dirija para las mismas que pueda estar involucrada;

Traspaso Conjunto-JBT-277

Serial de los EEUU No. 61/580.094

Página 2 de 3

General Ricardo Echeverri
Director Oficial
Area 307 del Ministerio de
Ciencia y Tecnología 17 de 1994



Y, nosotros por medio de este documento autorizamos al CESIONARIO o sus apoderados o agentes para que inserten el número de serial correcto y la fecha de

presentación dentro de este traspaso, si ninguno está indicado en la fecha de nuestra firma de este traspaso;

Y, nosotros por medio de este documento autorizamos y solicitamos al Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos y los funcionarios facultados de todos los demás gobiernos para que expidan tales Patentes de Invención como serán concedidas sobre las mencionada solicitud, o solicitudes basadas en las mismas, al mencionado CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios o representantes legales.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, nosotros hemos colocado aquí mismo nuestra firma y estampado el sello nuestros sellos en la(s) fecha(s) que se indica(n) a continuación

Inventor: (Firmado)

Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

Michael Connor

Mancomunidad de Massachusetts)

Condado de Middlesex) ss



En este día 6 de enero de 2012, compareció Michael Connor personalmente ante mí, el suscrito Notario Público, y me probó a través de prueba satisfactoria de identificación, que fue conocido personalmente por mí por ser la persona cuyo nombre está firmado en el documento precedente o adjunto, y quien

me juró o afirmó que el contenido del documento es veraz y preciso según se leal saber y entender.

(Firmado)

Firma del Notario

Mi Comisión Expira: 8 de agosto de 2014

(Sello)

Sello Notarial de Caucho con escudo en el extremo izquierdo: LINDA M. TIBBETTS-Notario Público- Mancomunidad de Massachusetts-Mi Comisión Expira 8 de agosto de 2014

Traspaso Conjunto-JBT-277

Serial de los EEUU No. 61/580.094

Página 3 de 3

Gabriel Ricarte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1988



Inventor: (Firmado)

Franck A. Skraly

Mancomunidad de Massachusetts)

Condado de Middlesex) ss

En este día 6 de enero de 2012, compareció Frank A. Skraly, personalmente ante mí, el suscrito Notario Público, y me probó a través de prueba satisfactoria de identificación, que fue conocido personalmente por mí por ser la persona cuyo

nombre está firmado en el documento precedente o adjunto, y quien me juró o afirmó que el contenido del documento es veraz y preciso según se leal saber y entender.

(Firmado)

Firma del Notario

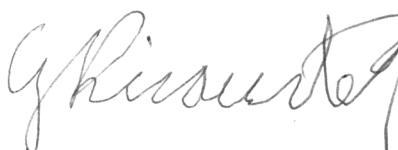
Mi Comisión Expira: 8 de agosto de 2014

(Sello)

Sello Notarial de Caucho con escudo en el extremo izquierdo: LINDA M. TIBBETTS-Notario Público- Mancomunidad de Massachusetts-Mi Comisión Expira 8 de agosto de 2014.

===

Es traducción fiel y completa de un documento escrito en inglés del cual queda copia en esta oficina y a la cual me remito para su confrontación.


Gabriel Ricardo Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 2004



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JANUARY 10, 2012

PTAS

NICHOLAS S. HURT
801 CALIFORNIA STREET
MOUNTAIN VIEW, CA 94041

501779838

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 01/09/2012

REEL/FRAME: 027501/0323
NUMBER OF PAGES: 4

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: 26139-19722

ASSIGNOR:
CONNOR, MICHAEL

DOC DATE: 01/06/2012

ASSIGNOR:
SKRALY, FRANK A.

DOC DATE: 01/06/2012

ASSIGNEE:
JOULE UNLIMITED TECHNOLOGIES, INC.
83 ROGERS STREET
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142

APPLICATION NUMBER: 61580094

FILING DATE:

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: REACTIVE OXYGEN SPECIES-RESISTANT MICROORGANISMS

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1

Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT										
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT										
CONVEYING PARTY DATA											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Name</th> <th>Execution Date</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Michael Connor</td> <td>01/06/2012</td> </tr> <tr> <td>Frank A. Skraly</td> <td>01/06/2012</td> </tr> </tbody> </table>		Name	Execution Date	Michael Connor	01/06/2012	Frank A. Skraly	01/06/2012				
Name	Execution Date										
Michael Connor	01/06/2012										
Frank A. Skraly	01/06/2012										
RECEIVING PARTY DATA											
<table border="1"> <tr> <td>Name:</td> <td>Joule Unlimited Technologies, Inc.</td> </tr> <tr> <td>Street Address:</td> <td>83 Rogers Street</td> </tr> <tr> <td>City:</td> <td>Cambridge</td> </tr> <tr> <td>State/Country:</td> <td>MASSACHUSETTS</td> </tr> <tr> <td>Postal Code:</td> <td>02142</td> </tr> </table>		Name:	Joule Unlimited Technologies, Inc.	Street Address:	83 Rogers Street	City:	Cambridge	State/Country:	MASSACHUSETTS	Postal Code:	02142
Name:	Joule Unlimited Technologies, Inc.										
Street Address:	83 Rogers Street										
City:	Cambridge										
State/Country:	MASSACHUSETTS										
Postal Code:	02142										
PROPERTY NUMBERS Total: 1											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Property Type</th> <th>Number</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Application Number:</td> <td>61580094</td> </tr> </tbody> </table>		Property Type	Number	Application Number:	61580094						
Property Type	Number										
Application Number:	61580094										
CORRESPONDENCE DATA											
Fax Number:	(650)938-5200										
Phone:	415-875-2427										
Email:	mnascimento@fenwick.com										
<i>Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.</i>											
Correspondent Name:	Nicholas S. Hurt										
Address Line 1:	801 California Street										
Address Line 4:	Mountain View, CALIFORNIA 94041										
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	26139-19722										
NAME OF SUBMITTER:	Nicholas S. Hurt, Reg. No. 65204										
Total Attachments: 3 source=19722_US_Assignment#page1.tif source=19722_US_Assignment#page2.tif source=19722_US_Assignment#page3.tif											

ASSIGNMENT

WHEREAS, We, Michael Connor and Frank A. Skraly, have invented one or more inventions described in a provisional application for Letters Patent of the United States entitled:

Reactive Oxygen Species-resistant Microorganisms

and identified by Docket No. JBT-277 and Serial No. 61/580,094, filed in the United States Patent and Trademark Office on December 23, 2011;

and

WHEREAS, Joule Unlimited Technologies, Inc., (hereinafter "ASSIGNEE"), a corporation organized and existing under the laws of the State of Delaware, and having a usual place of business at 83 Rogers Street, Cambridge, MA 02142, desires to acquire an interest therein, in accordance with agreements duly entered into with us;

NOW, THEREFORE, to all whom it may concern be it known that for, and in consideration of, said agreements and of other good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, we have sold, assigned and transferred, and by these presents do hereby sell, assign and transfer unto said ASSIGNEE, its successors, assigns, and legal representatives, our entire right, title and interest in and throughout the United States of America, its territories and all foreign countries, in and to the invention(s) described in said application, together with our entire right, title and interest in and to said application and such Letters Patent as may issue thereon or claim priority under United States law or international convention, including but not limited to, non-provisionals, continuations, divisionals, reissues, reexaminations, extensions, and substitutions of said application or such Letters Patent; said invention(s), applications and Letters Patent to be held and enjoyed by said ASSIGNEE for its own use and on behalf of and for its successors, assigns and legal representatives, to the full end of the term for which said Letters Patent may be granted as fully and entirely as the same would have been held by us had this assignment and sale not been made; we hereby convey all of our rights arising under or pursuant to any and all United States laws and international agreements, treaties or laws relating to the protection of industrial property by filing any such applications for Letters Patent, including but not limited to, any cause(s) of action and damages accruing prior to this assignment. We hereby acknowledge that this assignment, being of our entire right, title and interest in and to said invention(s), carries with it the right of ASSIGNEE to apply for and obtain from competent authorities in all countries of the world, any and all Letters Patent by attorneys and agents of ASSIGNEE's selection and the right to procure the grant of all Letters Patent to ASSIGNEE in its own name as assignee of our entire right, title and interest therein;

AND, we hereby further agree for ourselves and our executors and administrators to execute upon request any other lawful documents and likewise to perform any other lawful acts, which may be deemed necessary to secure fully the aforesaid invention(s) to said ASSIGNEE, its successors, assigns, and legal representatives, but at its or their expense and charges, including the execution of non-provisional, substitution, continuation, divisional, reissue, reexamination, or corresponding foreign or international patent applications;

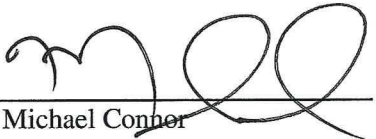
AND, we hereby further agree to provide statements or testimony in any interference or other proceeding in which said invention(s) or any application or patent directed thereto may be involved;

AND, we hereby authorize ASSIGNEE or its attorneys or agents to insert the correct serial number and filing date into this assignment, if none is indicated on the date of our execution of this assignment;

AND, we hereby authorize and request the Director of the United States Patent & Trademark Office and the empowered officials of all other governments to issue such Letters Patent as shall be granted upon said application, or applications based thereon, to said ASSIGNEE, its successors, assigns, or legal representatives.

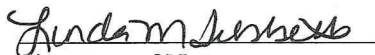
IN TESTIMONY WHEREOF, we have hereunto set our hands and affixed our seals on the date(s) set forth below.

Inventor:


Michael Connor

Commonwealth of Massachusetts)
County of Middlesex) ss

On this 6th day of January, 2012, before me, the undersigned Notary Public, personally appeared Michael Connor, and proved to me through satisfactory evidence of identification, which was ~~not~~ personally known to me to be the person whose name is signed on the preceding or attached document, and who swore or affirmed to me that the contents of the document are truthful and accurate to the best of his ~~her~~ knowledge and belief.


Signature of Notary

(Seal)

My Commission Expires: August 8, 2014



Inventor:

Frank A. Skraly

Commonwealth of Massachusetts)
County of Middlesex) ss

On this 6th day of January, 2012, before me, the undersigned Notary Public, personally appeared Frank A. Skraly, and proved to me through satisfactory evidence of identification, which was ~~was~~ personally known to me, to be the person whose name is signed on the preceding or attached document, and who swore or affirmed to me that the contents of the document are truthful and accurate to the best of his ~~her~~ knowledge and belief.

Linda M. Tibbetts
Signature of Notary

(Seal)

My Commission Expires: August 8, 2014

