



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2722390 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/75 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2017.10.09
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.05.10
(86)	European Application Nr.	14151250.9
(86)	European Filing Date	2011.07.27
(87)	The European Application's Publication Date	2014.04.23
(30)	Priority	2010.07.29, EP, 10171252 2011.04.14, EP, 11162420
(84)	Designated Contracting States:	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
(73)	Proprietor	Lonza Ltd, Lonzastrasse, 3930 Visp, CH-Sveits
(72)	Inventor	Wenzel, Marian, Widerholtstraße 56, 73272 Neidlingen, DE-Tyskland Altenbuchner, Josef, Hindenburgstraße 6, 71154 Nufingen, DE-Tyskland Kiziak, Christoph, Weingartenweg 16, 3939 Visp, CH-Sveits
(74)	Agent or Attorney	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54) Title **Regulation of inducible promoters**

(56) References
Cited:

TIANKI SUN: "Regulation des Mannose-Operons in Bacillus subtilis, Dissertation zur Erlangung der Würde eines Doktors in Naturwissenschaften", INTERNET CITATION, 16 April 2010 (2010-04-16), pages I-VI, XP002604428, Retrieved from the Internet: URL:http://elib.uni-stuttgart.de/opus/volltexte/2010/5249/pdf/Regulation_des_Mannose_Operons.pdf [retrieved on 2010-11-10]

SUN TIANQI ET AL: "Characterization of a mannose utilization system in Bacillus subtilis", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC; US, vol. 192, no. 8, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 2128-2139, XP002604427, ISSN: 0021-9193, DOI: DOI:10.1128/JB.01673-09 [retrieved on 2010-02-05]

TOBISCH STEFFEN ET AL: "Regulation of the lic operon of Bacillus subtilis and characterization of potential phosphorylation sites of the LicR regulator protein by site-directed mutagenesis", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 16, August 1999 (1999-08), pages 4995-5003, XP002614551, ISSN: 0021-9193

GÖRKE BORIS ET AL: "Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients.", NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY AUG 2008 LNKD- PUBMED:18628769, vol. 6, no. 8, August 2008 (2008-08), pages 613-624, XP009142600, ISSN: 1740-1534

DEUTSCHER ET AL: "The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria", CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, GB, vol. 11, no. 2, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 87-93, XP022616728, ISSN: 1369-5274, DOI: DOI:10.1016/J.MIB.2008.02.007 [retrieved on 2008-03-21]

ABRANCHES JACQUELINE ET AL: "Characterization of Streptococcus mutans strains deficient in EIIAB Man of the sugar phosphotransferase system", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 69, no. 8, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 4760-4769, XP002558891, ISSN: 0099-2240, DOI: DOI:10.1128/AEM.69.8.4760-4769.2003

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et heterologt polypeptid i en rekombinant bakteriell vertscelle,

5 hvori en rekombinant bakteriell vertscelle blir anvendt, hvis katabolisme av karbonkilder er under kontroll av karbonkatabolitt represjon og fosfoenolpyruvat: karbohydrat-fosfotransferasesystem, og som er genetisk endret slik at det er ute av stand til å deaktivere det transkripsjonelle regulatorproteinet som er spesifikt for en promotor som er induserbar ved en
10 sekundært karbonkilde i fravær av den induserende sekundære karbonkilden, og som omfatter en vektor med en heterolog nukleinsyresekvens som koder et polypeptid som er operativt bundet til en promotor, som er induserbar ved den sekundære karbonkilden og blir regulert av det transkripsjonelle regulatorproteinet,

15 der fremgangsmåten omfatter trinnene å dyrke den bakterielle vertscellen i et cellekulturmedium, som ikke inkluderer den induserende sekundære karbonkilden, men en primær karbonkilde, indusere ekspresjonen av polypeptidet ved den primære karbonkilden på et tidspunkt når konsentrasjonen av den primære karbonkilden minker under et nivå som er nødvendig for
20 karbonkatabolitt represjon, hvori den primære karbonkilden tilsettes i kulturen i en mengde som er tilstrekkelig til å opprettholde en forhåndsbestemt vekstrate for den bakterielle vertscellen uten induksjon av karbonkatabolitt represjon, og utvinning av polypeptidet fra cellene eller fra cellekulturen.

25

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,

hvori en bakteriell vertscelle anvendes der, ved genetisk endring, deaktivering av det transkripsjonelle regulatorproteinet ved fosforylering ved enzym EII, som er spesifikt for det transkripsjonelle regulatorproteinet, forhindres.

30

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,

hvori i) i den bakterielle vertscellens genom, slettes genet som koder for fosforylgruppen som overfører enzym EII som er spesifikt for det transkripsjonelle regulatorproteinet, eller

35

hvori ii) i den bakterielle vertscellens genom, endres genet som koder for det transkripsjonelle regulatorproteinet genetisk, slik at det transkripsjonelle regulatorproteinet som uttrykkes av genet er ute av stand til å binde en

fosforylgruppe som er overført fra enzym EII.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3,

hvor i tilfelle i) inn i vektoren integreres genet som koder for det transkripsjonelle regulatorproteinet som kontrollerer vektorens promotor; eller hvor i tilfelle ii) inn i vektoren integreres det genetisk manipulerede genet for den bakterielle vertscellen som koder for det transkripsjonelle regulatorproteinet som er ute av stand til å binde en fosforylgruppe som er overført fra det tilsvarende enzym EI.

5. Fremgangsmåte ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 4,

hvor den bakterielle vertscellen er valgt fra Bacilli, Chlostridia og Escherichia.

6. Fremgangsmåte ifølge hvilke som helst av kravene 1 og 5,

hvor kulturmediet omfatter casaminosyrer.

7. Fremgangsmåte ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 6,

hvor den karbonkildeinduserbare promotoren er en promotor av mannoseoperonet, og hvor den induserende karbonkilden er mannose.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 7,

hvor promotoren er P_{manP} - eller P_{manR} -promotoren av mannoseoperonet.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8,

hvor i) i den bakterielle vertscellens genom, slettes genet som koder for manP, eller

hvor ii) i den bakterielle vertscellens genom, endres genet som koder for det transkripsjonelle regulatorproteinet ManR genetisk, slik at det transkripsjonelle regulatorproteinet som uttrykkes av genet er ute av stand til å binde en fosforylgruppe som er overført fra det spesifikke enzym EII.

10. Rekombinant bakteriell vertscelle hvis katabolisme av karbonkilder er under kontroll av karbonkatabolitt represjon og fosfoenolpyruvat: karbohydrat-fosfotransferasesystem, og som er genetisk endret slik at det er ute av stand til å deaktivere det transkripsjonelle regulatorproteinet som er spesifikt for en promotor som er induserbar ved en sekundært karbonkilde i fravær av den induserende sekundære karbonkilden ved sletting av, i den bakterielle

vertscellens genom, genet som koder for en fosforylgruppe som overfører enzym EII som er spesifikt for det transkripsjonelle regulatorproteinet, og som omfatter en vektor med en heterolog nukleinsyresekvens som koder et polypeptid som er operativt bundet til en promotor, som reguleres av det transkripsjonelle regulatorproteinet som den bakterielle vertscellen er genetisk endret for å være ute av stand til deaktivering, og hvori inn i vektoren integreres genet som koder for det spesifikke transkripsjonelle regulatorproteinet.

11. Rekombinant bakteriell vertscelle hvis katabolisme av karbonkilder er under kontroll av karbonkatabolitt represjon og fosfoenolpyruvat: karbohydrat-fosfotransferasesystem, og som er genetisk endret slik at det er ute av stand til å deaktivere det transkripsjonelle regulatorproteinet som er spesifikt for en promotor som er induserbar ved en sekundært karbonkilde i fravær av den induserende sekundære karbonkilden ved genetisk endring av, i den bakterielle vertscellens genom, genet som koder for det transkripsjonelle regulatorproteinet, slik at det transkripsjonelle regulatorproteinet som uttrykkes av genet er ute av stand til å binde en fosforylgruppe som er overført av enzym EII som er spesifikt for det transkripsjonelle regulatorproteinet, og som omfatter en vektor med en heterolog nukleinsyresekvens som koder et polypeptid som er operativt bundet til en promotor som reguleres av det transkripsjonelle regulatorproteinet som den bakterielle vertscellen er genetisk endret for for å være ute av stand til deaktivering, og hvori inn i vektoren er ytterligere integrert det manipulerede genet som koder for det transkripsjonelle regulatorproteinet som er ute av stand til å binde en fosforylgruppe som er overført av det tilsvarende enzym EII.