

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
20 de marzo de 2014 (20.03.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/041233 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 11/06 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070646

(22) Fecha de presentación internacional:

17 de septiembre de 2013 (17.09.2013)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201231437

17 de septiembre de 2012 (17.09.2012)

ES

(71) Solicitantes: INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA - INIA [ES/ES]; Ctra. de La Coruña, km. 7,5, E-28040 Madrid (ES). UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID [ES/ES]; Avda. Séneca 2, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventores: PONZ ASCASO, Fernando; Instituto Nacional De Investigación Y Tecnología Agraria Y Alimentaria - Inia, Ctra. de La Coruña, km. 7,5, E-28040 Madrid (ES). SÁNCHEZ SÁNCHEZ, Florentina; Instituto Nacional De Investigación Y Tecnología Agraria Y Alimentaria - Inia, Ctra. de La Coruña, km. 7,5, E-28040 Madrid (ES). MANSILLA MANSILLA, María del Carmen; Instituto Nacional De Investigación Y Tecnología Agraria Y Alimentaria - Inia, Ctra. de La Coruña, km. 7,5, E-28040 Madrid (ES). CUENCA MARTÍN, María del Sol; Instituto Nacional De Investigación Y Tecnología Agraria Y Alimentaria - Inia, Ctra. de La Coruña, km. 7,5, E-28040 Madrid (ES). AGUADO ALONSO, Marta; Instituto Nacional De Investigación Y Tecnología Agraria Y Alimentaria - Inia, Ctra. de La Coruña, km. 7,5, E-28040 Madrid (ES).

SÁNCHEZ MONTERO, José María; Universidad Complutense De Madrid, Avda. Séneca 2, E-28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: ARIAS SANZ, Juan; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: BIOCATALYSTS AND THE APPLICATIONS THEREOF

(54) Título : BIOCATALIZADORES Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to the use of proteins of the viral capsid of a virus of the *Potyviridae* family as a substrate for the immobilisation of enzymes of interest, using a crosslinking agent suitable for joining the proteins of the viral capsid to the enzyme of interest.

(57) Resumen: Se describe el empleo de proteínas de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae* como soporte para la inmovilización de enzimas de interés, mediante el empleo de un agente de entrecruzamiento adecuado para la unión de las proteínas de la cápsida viral al enzima de interés.



WO 2014/041233 A1

BIOCATALIZADORES Y SUS APLICACIONES

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención pertenece al área de la inmovilización de biocatalizadores y se relaciona con unos biocatalizadores en los que se inmoviliza un enzima sobre un soporte basado en una proteína de una cápsida viral, en donde dicha inmovilización tiene como resultado un aumento en la actividad enzimática específica del enzima inmovilizado.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Dado que el número de procesos catalizados por enzimas en la industria es cada vez mayor, la inmovilización de enzimas es de gran interés en sectores tales como el químico, farmacéutico o alimentario, así como en procesos tales como el tratamiento de
15 residuos, métodos de diagnóstico y/o de tratamiento de enfermedades, etc.

- La nanotecnología ha suscitado un reciente interés en la inmovilización enzimática debido a sus potenciales aplicaciones en Biotecnología y Biomedicina. La inmovilización enzimática conlleva ventajas asociadas a la manipulación, separación
20 del enzima de la mezcla de reacción, reutilización del enzima, reducción de costes y posibilidad de aumentar la estabilidad térmica y el rango de pH de actuación del enzima. En el campo de la nanotecnología, los factores que determinan la eficiencia de los biocatalizadores vienen dados por el área de la superficie, la resistencia a la transferencia de masa, y la carga enzimática efectiva. Se han descrito diversos
25 nanomateriales en relación con biocatalizadores: nanopartículas, nanofibras, nanotubos, y matrices nanoporosas. Un requisito importante en la inmovilización de una proteína es que la matriz proporcione un entorno biocompatible e inerte, es decir, que no interfiera con la estructura nativa de la proteína.
- 30 Desde el punto de vista bioquímico, la inmovilización enzimática aporta una serie de ventajas, tales como:

- disminución de problemas de autólisis (proteasas) o de agregación, al estar limitados los movimientos rotacionales y traslacionales,
- ralentización de los cambios conformacionales, por lo que se pueden estudiar las relaciones estructura-función,
- 5 - simulación de reacciones *in vivo*,
- simulación de sistemas estructuralmente asimétricos (tales como estudios de membranas),
- en sistemas entrecruzados, pueden fijarse interacciones con fosfolípidos, polisacáridos, etc. para simular orgánulos celulares,
- 10 - unión multipuntual a soportes deformables que permite estudiar la deformación de proteínas globulares, y
- especificidad de sustrato.

Asimismo, la inmovilización enzimática plantea una serie de desventajas, tales como la

15 disminución en la actividad enzimática del enzima inmovilizado, la dificultad en la interpretación de los datos si la preparación enzimática no es homogénea, y la posibilidad de contactos proteína-proteína indeseados.

Desde un punto de vista aplicado, la inmovilización enzimática plantea una serie de

20 ventajas: aumento de la estabilidad enzimática, aumento de la productividad enzimática debido a la posibilidad de reutilización, facilidad de recuperación del enzima, de purificación de los productos y, en general, de operación y control del proceso. Por otro lado, como inconvenientes, cabe destacar que generalmente la actividad enzimática disminuye, aumentan los problemas difusionales, aumenta el coste del proceso y el

25 hecho de que el intervalo de pH de trabajo puede ser diferente al del biocatalizador nativo.

En el estado de la técnica se han descrito enzimas inmovilizados en una variedad de soportes (*scaffolds*), tales como nanotubos de silicio, bicapas fosfolípicas, monocapas

30 auto-ensambladas, matrices poliméricas, en películas Langmuir-Blodgett, partículas de látex poliestireno, partículas de oro ensambladas en polímeros y zeolita o películas

lipídicas evaporadas térmicamente, nanopartículas magnéticas y no magnéticas, entre otras.

Se han descrito diversas aplicaciones de enzimas inmovilizados en nanopartículas
5 (Ansari SA & Husain Q 2012 Biotech Adv 30: 512-523) y en nanotubos de carbono (Feng W & Ji P 2011 Biotech Adv 29: 889-895). La solicitud de patente internacional WO2008133433 está dirigida a métodos de exposición de proteínas, azúcares o ácidos nucleicos sobre la superficie de esporas, virus, bacterias y levaduras. Cardinale D *et al.* (2012 Trends Biotech 30(7): 369-376) describe el desarrollo de nanotrasportadores
10 enzimáticos (*enzyme nano-carriers*, ENCs) basados en virus de plantas, bacteriófagos y partículas similares a virus (*virus-like particles*, VLPs) como soporte (*scaffold*) para, entre otros, el confinamiento enzimático. Se han descrito diferentes metodologías para la inmovilización de enzimas de interés comercial tal como la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), habitualmente basados en proteínas de fusión (Idris A & Bukhari A
15 2012 Biotechnol Adv 30: 550-563; Mateo C *et al.* 2007 Enzyme Microb Tech 40: 1451-1463; Carette N *et al.* 2007 Nature Nanotechnol 2: 226- 229; Minten IJ *et al.* 2011 Chem Sci 2: 358-362).

A la vista del estado de la técnica en el área de la inmovilización enzimática, es
20 necesario desarrollar sistemas alternativos a los descritos que, ventajosamente, no requieran la generación de proteínas de fusión, resultando así más fáciles y rápidos y que, convenientemente, permitan obtener una mayor actividad enzimática específica.

COMPENDIO DE LA INVENCION

25

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un biocatalizador que comprende

- un polipéptido A que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, y
- un polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que
30 conserva su actividad enzimática,

en donde dicho polipéptido A está unido al polipéptido B mediante un agente de entrecruzamiento.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un virus de la familia *Potyviridae* que comprende un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unido a una proteína de la cápsida de dicho virus de la familia *Potyviridae* mediante un agente de entrecruzamiento.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una VLP de un virus de la familia *Potyviridae* que comprende un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unido a una proteína de la cápsida de dicho virus de la familia *Potyviridae* mediante un agente de entrecruzamiento.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de obtención de dicho biocatalizador, que comprende poner en contacto un polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, con un polipéptido B, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en presencia de un agente de entrecruzamiento, bajo condiciones adecuadas para la formación de dicho biocatalizador.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de obtención de dicho virus de la familia *Potyviridae* que comprende un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unido a una proteína de la cápsida de dicho virus de la familia *Potyviridae*, que comprende poner en contacto un virus de la familia *Potyviridae*, con dicho polipéptido B, en presencia de un agente de entrecruzamiento, bajo condiciones adecuadas para la formación de dicho virus.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de obtención de dicha VLP de un virus de la familia *Potyviridae* que comprende un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unido a una proteína de la cápsida de dicho virus de la familia *Potyviridae*, que comprende poner en contacto una VLP de un virus de la familia *Potyviridae*, con

dicho polipéptido B, en presencia de un agente de entrecruzamiento, bajo condiciones adecuadas para la formación de dicha VLP.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para inmovilizar un enzima
5 que comprende conjugar un polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, con un polipéptido B, que comprende un enzima o un fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, mediante un agente de entrecruzamiento.

- 10 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de
- (i) un polipéptido A que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, o de
 - (ii) un virus de la familia *Potyviridae*, o de
 - (iii) una VLP que comprende proteínas de la cápsida de un virus de la familia
15 *Potyviridae*,
- para la inmovilización de un polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la conversión
20 enzimática de un sustrato en un producto que comprende poner en contacto dicho sustrato con dicho biocatalizador, virus anterior o VLP, en donde el enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática presente en el polipéptido B del biocatalizador, o del virus o de la VLP, es un enzima que cataliza una reacción enzimática específica para la conversión de dicho sustrato en dicho producto, bajo
25 condiciones adecuadas para que dicha reacción enzimática tenga lugar.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra un esquema del proceso de bioconjugación. La primera columna
30 representa la activación, mientras que la segunda columna es una representación de la conjugación.

La **Figura 2** muestra el análisis de estabilidad de las partículas virales, expresada bien como relación A_{250}/A_{267} (A, C-E) o bien como variación del espectro de absorción respecto al control (B), en función del pH (A, B), del pH del tampón de conjugación (C), de la proporción de acetonitrilo (D) y de la temperatura (E).

5

La **Figura 3** muestra la variación de color observada en los conjugados C1, C2, C3, C4 y C5 (de izquierda a derecha) tras el bloqueo, debida a la formación de bases de Schiff.

La **Figura 4** muestra el resultado del SDS-PAGE. Carril 1: marcador Rainbow. Carriles
10 2-5: 18, 45, 90 y 180 ng de CALB comercial. Carril 6: muestra C1. Carril 7: muestra C2. Carril 8: muestra C3. Carril 9: muestra C4. Carril 10: muestra C5. La flecha señala los fragmentos 33 kDa de tamaño.

La **Figura 5** muestra las curvas de cinéticas de lipasa comercial y de los conjugados C1,
15 C2, C4 y C5, representadas como velocidad ($\mu\text{M}/\text{min}$) frente a concentración de sustrato (μM).

La **Figura 6** muestra imágenes de los conjugados C1 (A), C2 (B), C3 (C), C4 (D) y C5
20 (E) mediante microscopía electrónica y tinción negativa. Se muestra en cada caso el aumento (A: x40K, B: x40K, C: x15K, D: x50K, E: x40K).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado un sistema de inmovilización
25 proteica, en particular enzimática que, entre otras ventajas asociadas a la inmovilización de un enzima, resulta en un aumento de la actividad enzimática específica del enzima inmovilizado con respecto a la actividad del enzima libre. Los inventores de la presente invención han inmovilizado la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) sobre la proteína de la cápsida del virus del mosaico del nabo TuMV (*Turnip mosaic virus*). Los
30 resultados obtenidos muestran que el enzima así inmovilizado experimenta un importante aumento en su actividad enzimática específica con respecto al enzima sin inmovilizar (Ejemplo 1).

Definiciones

El término “activación” se emplea en la presente invención en el contexto de activación
 5 de una molécula, y se refiere a la transición reversible de una molécula hacia un estado físico o químico, de modo que dicho estado tiene una mayor tendencia a seguir una reacción química determinada.

El término “actividad específica”, referido a un enzima, hace referencia a la actividad de
 10 un enzima por miligramo de proteína. Este parámetro se relaciona con la pureza de un enzima, y habitualmente se expresa en unidades de $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

El término “agente de entrecruzamiento” o “agente entrecruzante” o “agente de reticulación”, también conocido como “*cross-linker*”, hace referencia a un reactivo
 15 bifuncional que origina uniones intermoleculares de tipo covalente entre dos moléculas. Los agentes de entrecruzamiento comprenden grupos reactivos en los extremos que son específicos para determinados grupos funcionales. Los grupos reactivos de los agentes bifuncionales están separados entre sí por una cadena espaciadora (también denominada “brazo espaciador”) de una longitud determinada, la cual permite determinar la distancia
 20 a la que se encuentran los dos residuos que son entrecruzados. En una realización particular de la invención, las moléculas que contienen grupos reactivos susceptibles de conjugación mediante agentes de entrecruzamiento son proteínas y/o péptidos.

En la Tabla 1 se recoge un listado de los grupos funcionales presentes en los agentes de
 25 entrecruzamiento y de sus correspondientes grupos funcionales diana con los que reaccionan.

Tabla 1

Grupos reactivos de agentes de entrecruzamiento y sus grupos funcionales diana

Grupo reactivo	Grupo funcional diana
aril azida	no selectivo (o amino primaria)
carbodiimida	amino/carboxilo

hidrazida	carbohidrato (oxidado)
hidroximetil fosfina	amino
imidoester	amino
isocianato	hidroxilo (no acuoso)
carbonil	hidrazina
maleimida	sulfhidrilo
NHS-éster	amino
PFP-éster	amino
psoraleno	timina (intercalante fotoreactivo)
piridil disulfuro	sulfhidrilo
vinil sulfona	sulfhidrilo, amino, hidroxilo

Los agentes de entrecruzamiento pueden ser homobifuncionales o heterobifuncionales.

- Los “agentes de entrecruzamiento homobifuncionales” son aquellos que comprenden
- 5 grupos reactivos iguales en los extremos opuestos, separados entre sí por un brazo espaciador. Los agentes de entrecruzamiento homobifuncionales permiten que la reacción de entrecruzamiento transcurra en una sola etapa. Los agentes homobifuncionales incluyen, sin limitarse a, glutaraldehído, diaminoalcanos, di(N-succinimidil) carbonato, di(N-succinimidil) suberato, dimetil adipimato dihidrocloruro,
- 10 dimetil pimelimidato dihidrocloruro, dimetil suberimidato dihidrocloruro, bis(sulfosuccinimidil)suberato (BSSS, BS3), disuccinimidil glutarato (DSG), etilen glicolbis(sulfosuccinimidilsuccinato) (sulfo-EGS), disuccinimidil suberato (DSS), dithiobis(succinimidil propionato) (DTSP, reactivo de Lomant), etilen glicolbis(succinimidilsuccinato) (EGS), bis(sulfosuccinimidil) glutarato (BS2G), 3,3’-
- 15 dithiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), disuccinimidil tartrato (DST), (Bis(2-(succinimidooxicarbonilo)etil)sulfona (BSOCOES), 1,4-di-(3’-(2’piridilditio)-propionamido) butano (DPDPB), sulfodisuccinimidil tartrato (sulfo DST), ditiobis(succinimidil propionato) (DSP), etilenglicol bis(succinimidil succinato) (EGS).
- 20 Los “agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales” son aquellos que comprenden grupos reactivos diferentes en los extremos opuestos, separados entre sí por un brazo

espaciador. El empleo de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales requiere que la reacción de entrecruzamiento transcurra en dos etapas secuenciales, de modo que en primer lugar se hace reaccionar el extremo reactivo menos lábil. Los agentes heterobifuncionales incluyen, sin limitarse a, succinimidil-4-[N-maleimidometil]cyclohexano-1-carboxilato (SMCC), SANPAH, n-sulfosuccinimidil-6-[4'-azido-2'-nitrofenilamino] hexanoato (sulfo-SANPAH), m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida éster (MBS), m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisulfosuccinimida éster (sulfo MBS), N- γ -maleimidobutiriloxisuccinimida éster (GMBS), N- γ -maleimidobutiriloxisulfosuccinimida éster (sulfo GMBS), N-(ϵ -maleimidocaproico azido) hidrazida (EMCH), N-(ϵ -maleimidocaproiloxi) succinimida éster (EMCS), N-(ϵ -maleimidocaproiloxi) sulfo succinimida éster (sulfo EMCS), N-(p -maleimidofenil) isocianato (PMPI), N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB), succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil 6-[3(2-piridilditio)propionamido] hexanoato (LC-SPDP), N-succinimidil bromoacetato (SBA), N-[ϵ -maleimidocaproiloxi]succinimida éster (EMCS), succinimidil-6-[β -maleimidopropionamido]hexanoato (SMPH), sulfosuccinimidil 6-(3'-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoate (sulfo-LC-SPDP), N-succinimidil 4-[4-maleimidophenil]butirato (SMPB), (3-[2-Piridilditio]propionil hidrazida) (PDPH), N-succinimidil iodoacetate (SIA), N-(β -maleimidopropiloxi)succinimida ester (BMPS) y

20 N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida (ANB-NOS), así como acoplamiento mediante diazonio, ciclo-adición alcalina de azida catalizada por cobre (CuAAC), ligación oxima/hidrazona y acoplamiento oxidativo a p-aminofenilalanina.

Los agentes de entrecruzamiento según la invención pueden ser de tipo homobifuncional o heterobifuncional. En una realización particular de la invención, el agente de entrecruzamiento es de tipo homobifuncional. En una realización aún más particular, el agente de entrecruzamiento es el glutaraldehído.

Si se atiende a los grupos funcionales que se unen, los agentes de entrecruzamiento incluyen, sin limitarse a, agentes de entrecruzamiento amino-a-amino, agentes de entrecruzamiento amino-a-sulfhidrilo, agentes de entrecruzamiento carboxilo-a-amino, agentes de entrecruzamiento fotorreactivos, agentes de entrecruzamiento sulfhidrilo-a-

carbohidrato, agentes de entrecruzamiento sulfhidrilo-a-hidroxilo y agentes de entrecruzamiento sulfhidrilo-a-sulfhidrilo.

Los agentes de entrecruzamiento amino-a-amino incluyen, sin limitarse a:

- 5 - agentes imidioéster tales como dimetil adipimidato 2 HCl (DMA), dimetil pimelimidato 2 HCl (DMP), dimetil suberimidato 2 HCl (DMS) y dimetil 3,3'-ditiobispropionimidat 2 HCl (DTBP),
- agentes NHS-éster tales como bis(succinimidil)penta(etilenglicol) (BS(PEG)5), bis(succinimidil) nona(etilenglicol) (BS(PEG)9),
- 10 bis(sulfosuccinimidil) suberato (BS3), bis[2-(succinimidooxycarbonilo)etil]sulfona (BSOCOES), disuccinimidil glutarato (DSG), ditiobis(succinimidil) propionato (DSP) (reactivo de Lomants), disuccinimidil suberato (DSS), disuccinimidil tartrato (DST), 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), etilenglicol
- 15 bis(succinimidilsuccinato) (EGS), etilenglicol bis(sulfosuccinimidilsuccinato) (sulfo-EGS), Tris(succinimidil) aminotriacetato (TSAT), y
- otros agentes amino-reactivos tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno (DFDNB).

20

Los agentes de entrecruzamiento amino a sulfhidrilo incluyen, sin limitarse a:

- agentes NHS-haloacetil, basados en el éster NHS y iodoacetilo, bromoacetilo u otro haloacetilo, tales como sulfosuccinimidil (4-iodoacetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB), succinimidil
- 25 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP) y succinimidil iodoacetato (SIA),
- agentes NHS-maleimida, basados en H-hidroxisuccimida y maleidimida, tales como sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxylato (sulfo-SMCC), etilenglicol funcionalizado con n unidades de extremos succinimidilo y maleimido (SM(PEG)n), succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxylato (SMCC), succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC),
- 30 sulfo-EMCS, EMCS, sulfo-GMBS, N-gamma-maleimidobutiril-

- oxisuccinimida éster (GMBS), N-kappa-maleimidoundecanoil-oxisulfosuccinimida (sulfo-KMUS), sulfo-MBS, m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster (MBS), sulfosuccinimidil 4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-SMPB), SMPB, N-alfa-maleimidoacetoxisuccinimida éster (AMAS), BMPS y succinimidil 6-[(beta-maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), y
- 5 - agentes NHS-piridilditiol, basados en N-hidroxisuccinimida y piridilditiol, tales como 2-piridilditiol-tetraoxaoctatriacontane-N-hidroxisuccinimida (PEG12-SPDP), 2-piridilditiol-tetraoxatetradecane-N-hidroxisuccinimida (PEG4-SPDP), sulfosuccinimidil 6-[3'-(2-piridilditio)propionamido] hexanoato (sulfo-LC-SPDP), succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil 6-[3(2-piridilditio) propionamido] hexanoato (LC-SPDP), sulfosuccinimidil-6-[alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)toluamido] hexanoato (sulfo-LC-SMPT) y 4-succinimidiloxicarbonil-alfa-metil-alfa(2-piridilditio)tolueno (SMPT).
- 10
- 15

Los agentes de entrecruzamiento carboxilo a amino incluyen, sin limitarse a dicitclohexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida hidrocloreuro (EDC o EDAC), N-hidroxisuccinimida (NHS) y N-hidroxisulfoccinimida (S-NHS).

20

Los agentes de entrecruzamiento fotorreactivos incluyen, sin limitarse a:

- agentes amino y fotorreactivos tales como N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida (ANB-NOS), NHS-diazirina (SDA), sulfo-NHS-diazirina (sulfo-SDA), NHS-LC-diazirina (LC-SDA), sulfo-HHS-LC-diazirina (sulfo-LC-SDA), NHS-SS-diazirina (SDAD), sulfo-NHS-SS-diazirina (sulfo-SDAD) y N-sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) hexanoato (sulfo-SANPAH), y
- 25 - otros agentes fotorreactivos tales como succinimidil-[4-(psoralen-8-iloxi)]-butirato (SPB).
- 30

Los agentes de entrecruzamiento sulfhidrilo a carbohidrato incluyen, sin limitarse a, hidrazida-TFA del ácido N-beta-maleimidopropiónico (BMPH), hidrazida-TFA del ácido N-epsilon-maleimidocaproico (EMCH), hidrazida-TFA del ácido N-kappa-maleimidoundecanoico (KMUH), hidrazida-HCl del ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH) y 3-(2-piridilditio)propionil hidrazida (PDPH).

Los agentes de entrecruzamiento sulfhidrilo a hidroxilo incluyen, sin limitarse a, p-maleimidofenil isocianato (BMPI).

10 Los agentes de entrecruzamiento sulfhidrilo a sulfhidrilo incluyen, sin limitarse a, 1,8-bismaleimidodietileneglicol (BM(PEG)2), 1,1-bismaleimidotrietileneglicol (BM(PEG)3), 1,4-bismaleimidobutano (BMB), 1,4 bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), bismaleimidohexano (BMH), bismaleimidoetano (BMOE).

15 En una realización preferida de la presente invención, las moléculas que contienen grupos reactivos susceptibles de conjugación mediante agentes de entrecruzamiento son proteínas y/o péptidos.

Para el entrecruzamiento proteico, los grupos funcionales proteicos a los que se dirigen
20 los agentes de entrecruzamiento comprenden grupos amino, grupos ε-amino de lisinas, grupos α-amino terminal, grupos sulfhidrilo (-SH o grupos tioles) de cisteínas, grupos carbohidrato (en el caso de glucoproteínas) y grupos carboxilo.

Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos amino, ε-amino de lisinas
25 y α-amino terminal incluyen, sin limitarse a, imidoésteres y N-H-hidroxisuccinimida ésteres (NHS-ésteres).

Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos sulfhidrilo incluyen, sin limitarse a, maleimidas, haloacetilos (tales como iodoacetilo) y piridil disulfuro
30 (piridilditioles).

Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos carbonilo (tales como aldehídos o cetonas) por tratamiento oxidativo de los carbohidratos de glucoproteínas incluyen, sin limitarse a, reactivos que comprenden hidrazidas (-NH-NH₂-).

- 5 Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos carboxilo incluyen, sin limitarse a, carbodiimidas.

El término “biocatalizador” hace referencia a un catalizador biológico que participa en una reacción química de un ser vivo. El biocatalizador disminuye la energía de
10 activación necesaria para una reacción química determinada, facilitando y acelerando dicha reacción, sin consumirse en dicha reacción. En el contexto de la presente invención, el término biocatalizador se refiere a un enzima.

El término “biocatalizador inmovilizado” hace referencia a enzimas, extractos celulares
15 que comprenden dichos enzimas, células que comprenden dichos enzimas, o combinaciones de los mismos, que se encuentran en un estado tal que permiten su reutilización. Se relaciona con el confinamiento físico de un enzima o célula en una determinada región del espacio, de modo que su actividad catalítica se retiene y puede ser reutilizado. En una realización preferida de la presente invención, el biocatalizador
20 inmovilizado es un enzima.

El término “catálisis” se refiere en la presente invención al proceso en el que se aumenta la velocidad de una reacción química mediante intervención de un catalizador, de modo que dicho catalizador no resulta modificado durante la catálisis.
25

El término “cápsida”, en ocasiones también denominada “cápside”, hace referencia a la estructura proteica externa de un virus que encapsula el material genético de éste. La cápsida está formada por subunidades proteicas idénticas llamadas “capsómeros”, codificadas por el genoma del propio virus. Cada capsómero puede estar constituido por
30 una o por varias proteínas distintas. Atendiendo a la simetría, se distinguen tres tipos de la cápsida: helicoidal (habitual en virus vegetales y bacteriófagos), icosaédrica (habitual

en virus animales, menos frecuente en virus vegetales y fagos) o compleja (consta bien de dos partes, cabeza y cola, o bien incluso de tres partes, cabeza, cuello y cola).

El término “conjugación”, también denominado “entrecruzamiento” o “bioconjugación”
5 hace referencia al proceso de obtención de un conjugado, en particular un conjugado proteico formado por al menos dos proteínas, mediante unión química por enlace covalente no peptídico. Métodos de conjugación química son bien conocidos en la técnica. La conjugación puede llevarse a cabo directamente o a través de un agente de entrecruzamiento, a través de uno o más grupos funcionales en la proteína, tales como
10 aminos, carboxilos, fenilos, tioles o hidroxilos.

El término “enzima”, como se usa aquí, se refiere a una proteína que cataliza las reacciones químicas. Un enzima permite que una reacción química, termodinámicamente posible pero que transcurre a baja velocidad, sea cinéticamente
15 favorable. El enzima actúa sobre una molécula denominada “sustrato”, convirtiéndola en una molécula diferente denominada “producto”, en una reacción denominada “reacción enzimática”. Algunos ejemplos de enzimas útiles en la presente invención son, lipasas, amilasas, proteasas, peptinasas, invertasas, celulasas, lipasas, lactasas, catalasas, quimosinas, xilanasas y fitasas. Entre los parámetros que definen la reacción
20 catalizada por un enzima, destacan la velocidad máxima (V_{max} , o velocidad a la que un enzima es capaz de catalizar una reacción), la constante de afinidad (K_m , o concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima, representa la relación de afinidad de un enzima y su sustrato, de modo que a menor valor de K_m , mayor afinidad del enzima por un sustrato) y la constante catalítica
25 (K_{cat} , o número de moléculas de sustrato transformadas en producto, por centro activo y por unidad de tiempo). El experto en la materia conoce que los sustratos preferidos para las enzimas son aquellos para los que los valores de K_m son bajos y los valores de K_{cat} altos en comparación con sustratos por los que no muestra afinidad.

30 El término “fragmento de un enzima que conserva su actividad enzimática”, en el contexto de la presente invención, hace referencia a un fragmento de cualquier longitud de un enzima que conserva al menos el 100%, al menos el 95%, al menos el 90%, al

menos el 85% o al menos el 80% de la actividad enzimática del enzima del que se ha obtenido dicho fragmento. Asimismo, la presente invención contempla variantes funcionalmente equivalentes de un enzima de interés, que conservan al menos el 100%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85% o al menos el 80% de la actividad enzimática del enzima de interés y tienen una secuencia sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos del enzima de interés. Una secuencia de aminoácidos es “sustancialmente homóloga” a una secuencia de aminoácidos determinada cuando presenta un grado de identidad de, al menos, un 70%, ventajosamente de, al menos, un 75%, típicamente de, al menos, un 80%, preferentemente de, al menos, un 85%, más preferentemente de, al menos, un 90%, aún más preferentemente de, al menos, un 95%, 96%, 97%, 98% ó 99%, respecto a dicha secuencia de aminoácidos determinada. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul SF *et al.* 1990 Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 215(3):403-10). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc.

20

El término “lipasa” se refiere a un enzima (E.C. 3.1.1.3) que es capaz de hidrolizar enlaces ésteres presentes en sustratos lipídicos insolubles en solventes acuosos. En los sistemas biológicos, el enzima lipasa cataliza la hidrólisis (es decir, la separación del grupo hidroxilo y el átomo de hidrógeno de los compuestos para dar fragmentos por la adición de agua) de los lípidos a glicerol y ácidos grasos simples. En medio orgánico, sin embargo, el comportamiento enzimático cambia y este enzima puede sintetizar diferentes lípidos. Su versatilidad enzimática hace que sea de interés en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, etc. permitiendo la síntesis de ésteres de carbohidratos, aminas y amidas. Las lipasas se caracterizan por su enantioselectividad y presentan un mecanismo catalítico conocido como activación interfacial.

30

- El término “lipasa B de *Candida antarctica*” o “CALB” hace referencia a un enzima lipasa de 33 kDa perteneciente a la familia de α/β hidrolasas cuya estructura consta de un núcleo de 8 hojas beta flanqueadas a ambos lados por alfa-hélices. Es un enzima de gran eficiencia y alta selectividad, de gran interés en aplicaciones tales como
- 5 resoluciones cinéticas, aminólisis, esterificación, transesterificación, hidrólisis en agua, transesterificación en solventes orgánicos y transformaciones enantioselectivas. Es altamente estereoespecífica tanto en la hidrólisis como en la síntesis de ésteres. El centro activo contiene los residuos Ser 105, Asp 187 y His 224. El bolsillo oxianiónico, implicado en la estabilización de los estados transitorios de reacción, contiene los
- 10 residuos Gly 39 y Thr 40. La secuencia de nucleótidos que codifica CALB y su correspondiente secuencia de aminoácidos ha sido descrita (Uppenberg J *et al.* 1994 Structure 2:293-308). La secuencia del gen de CALB está alojada en las bases de datos de secuencias del NCBI con la referencia EU915210 (cds parciales, versión correspondiente al 28 de septiembre de 2008 de GenBank). La base de datos del NCBI
- 15 recoge dos entradas para la secuencia de aminoácidos de CALB, correspondientes a una secuencia de 342 aminoácidos (CAA83122, en la actualización del 12 de junio de 2006 de GenBank) y a una secuencia parcial de 321 aminoácidos (ACI06118, en la actualización del 28 de septiembre de 2008).
- 20 El término “polipéptido”, según se emplea en la presente invención, se refiere a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud en donde los distintos aminoácidos se encuentran unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o por puentes disulfuro. Un polipéptido es un polímero de residuos de aminoácido preferentemente unidos exclusivamente por enlaces peptídicos, ya sea producido de forma natural o
- 25 sintéticamente. Un polipéptido producido mediante la expresión de una molécula de ADN que no es del huésped es un péptido o polipéptido “heterólogo”. El término “polipéptido” como se usa en el presente documento abarca péptidos y oligopolipéptidos, de modo que dichos péptidos u oligopéptidos pueden o no haber sufrido modificaciones postraduccionales. La modificación postraduccional puede ser,
- 30 por ejemplo, fosforilación, metilación y glucosilación. En una realización particular, el polipéptido es una proteína.

El término “*Potyviridae*” hace referencia a una familia de virus infectivos de plantas. Los virus que pertenecen a esta familia comprenden un genoma de RNA monocatenario positivo (también denominado (+)ssRNA, ((+) *single stranded RNA*) y se incluyen en el Grupo IV de la clasificación de Baltimore. Esta familia de virus comprende los géneros

5 *Potyvirus* (especie tipo: virus Y de la patata, PVY), *Rymovirus* (especie tipo: virus del mosaico de raigrás, RMV), *Bymovirus* (especie tipo: virus del mosaico amarillo de la cebada, BYMV), *Macluravirus* (especie tipo: virus del mosaico de la maclura), *Ipomovirus* (especie tipo: virus del moteado suave de la batata), *Tritimovirus* (especie tipo: virus del mosaico estriado del trigo), *Brambyvirus*. Aunque el genoma de estos

10 virus es monocistrónico, codifica entre 7 y 10 proteínas con diversas funciones (proteasas tales como S-PRO, P-PRO, C-PRO, helicasas HEL, proteínas genómicas VPg, polimerasas POL, proteínas de la cápsida CP). Los huéspedes de estos virus comprenden plantas mono y dicotiledóneas herbáceas y leñosas (*Potyvirus*) o bien se restringe a gramíneas (*Bymovirus* y *Rymovirus*).

15

El término “*Potyvirus*” hace referencia a un género de virus de la familia *Potyviridae* cuya especie tipo es el virus Y de la patata (*Potato Y virus*, PYV). Los virus de este género son filamentosos y flexibles, de dimensiones 680-900 x 11-15 nm y simetría helicoidal. El genoma de estos virus está constituido por una sola molécula de RNA

20 monocatenario positivo ((+)ssRNA), que codifica una poliproteína precursora que, al ser procesada, da lugar a siete proteínas: una serina proteasa (P1), componente auxiliar (HC), P3, inclusión cilíndrica (CI), inclusión nuclear A (NIa), inclusión nuclear B (NIb), proteína de la cápsida (CP) y dos pequeñas proteínas 6K1 y 6K2. La proteína de la cápsida tiene un tamaño de entre 30 y 35 kDa.

25

El término “proteína” se refiere a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud en donde los distintos aminoácidos se encuentran unidos entre sí mediante enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos adyacentes o por puentes disulfuro, incluyendo opcionalmente modificaciones, por ejemplo,

30 modificaciones post-translacionales, que alteran las propiedades físicas y químicas, plegabilidad, estabilidad, actividad, y por último, la función de las proteínas. La secuencia de aminoácidos de una proteína adopta una disposición espacial o

conformación determinada que es responsable de la función asociada a la proteína. Las proteínas que no tienen grupos peptídicos adheridos (e.g. grupos protésicos o co-factores) también se incluyen en esta definición. El número de residuos de aminoácidos en una proteína puede variar notablemente, por ejemplo, la cadena de polímero de
5 residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos puede contener típicamente 50 o más residuos de aminoácidos. Algunos ejemplos de proteínas útiles en la presente invención son, sin limitación, proteínas con actividad enzimática.

El término “virus del mosaico del nabo”, también denominado “TuMV” (*Turnip mosaic virus*) es un Potyvirus de la familia *Potyviridae*. Se trata de un virus filamentosos y flexible, de dimensiones 720-850 nm x 12-15 nm Su genoma está constituido por RNA monocatenario positivo. Es un virus no envuelto, de la cápsida de simetría helicoidal. La proteína de la cápsida (CP) es de aproximadamente 33 kDa y cada virus comprende unas 2000 copias de dicha proteína. Este virus es causante de enfermedades en plantas,
10 entre otras, crucíferas. El virus puede ser transmitido por áfidos. Los síntomas en las plantas infectadas por este virus comprenden lesiones locales cloróticas, mosaico, moteado y rugosidades.

El término “virus”, también denominado “partícula vírica” o “virión”, hace referencia a
20 agentes infecciosos cuya capacidad de multiplicación requiere necesariamente la infección celular. Constan de material genético, bien de tipo DNA o de tipo RNA, una cubierta proteica denominada “cápsida” y, en algunos tipos de virus, una bicapa lipídica externa que rodea al virus fuera de la célula denominada “envuelta”.

El término “partícula similar a virus”, “pseudovirus” o “VLP” (*virus-like particle*) hace referencia a partículas carentes de material genético viral que comprenden un número de copias de proteínas de la cápsida distribuidas en una disposición similar a la de la cápsida viral. Resultan de la expresión de proteínas estructurales virales, tales como proteínas de la cápsida o proteínas de envuelta, y de su autoensamblaje. En una
25 realización particular de la invención, las VLP están constituidas por proteína de la cápsida viral. En una realización preferida, las VLP están constituidas por proteínas de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae*. En una realización más preferida,

las VLP están constituidas por proteínas de la cápsida viral de un *Potyvirus*. En una realización aún más preferida, las VLP están constituidas por las proteínas de la cápsida viral del virus TuMV.

- 5 El término “ruta enzimática”, tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a una sucesión de reacciones químicas catalizadas enzimáticamente, en donde un sustrato inicial puede dar lugar a uno o varios productos finales a través de uno o más productos intermedios, en donde el producto intermedio resultante de la catálisis por parte de uno de los enzimas implicados en dicha ruta es a su vez el sustrato de otro
- 10 de los enzimas implicados en dicha ruta.

Biocatalizador de la invención

- En un aspecto, la invención se refiere a un biocatalizador, en adelante “biocatalizador de
- 15 la invención”, que comprende
- un polipéptido A que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, y
 - un polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática,
- 20 en donde dicho polipéptido A está unido al polipéptido B mediante un agente de entrecruzamiento.

- El biocatalizador de la invención comprende, por tanto, dos polipéptidos, un polipéptido A que comprende una proteína de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae*
- 25 y un polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unidos ambos polipéptidos mediante un agente de entrecruzamiento.

Polipéptido A del biocatalizador de la invención

30

El polipéptido A del biocatalizador de la invención comprende una proteína de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae*. En una realización particular de la

invención, el polipéptido A comprende una unidad de una proteína de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae*. En una realización particular alternativa de la invención, el polipéptido A comprende más de una unidad de una proteína de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae*. Las unidades de proteína de la cápsida viral comprendidas en dicho polipéptido A pueden formar parte de un precursor poliproteico viral de un virus de la familia *Potyviridae*, de modo que la escisión proteolítica de dicho poliproteína viral da lugar a las proteínas virales. El término “poliproteína” hace referencia en la presente invención a un polipéptido que comprende las secuencias proteicas de las proteínas estructurales de un virus. Las proteínas de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae* comprendidas en el polipéptido A pueden ensamblarse bien en un virus de la familia *Potyviridae* o bien en una estructura similar a virus o VLP, carente de material genético. Por lo tanto, en una realización de la invención, la proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae* forma parte de la cápsida vírica de dicho virus. En una realización particular de la invención, la proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae* que forma parte del polipéptido A del biocatalizador de la invención es una proteína de la cápsida de un *Potyvirus*. En una realización aún más particular, la proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae* que forma parte del polipéptido A del biocatalizador de la invención es una proteína de la cápsida del virus del mosaico del nabo (TuMV, *Turnip mosaic virus*). En una realización alternativa, la proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae* forma parte de una VLP.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención contempla que las proteínas de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae* comprendidas dentro del polipéptido A pueden ensamblarse bien en un virus o bien en una estructura similar a virus o VLP carente de material genético. En este caso, las partículas virales o de VLP pueden a su vez interaccionar entre sí dando lugar a estructuras de soporte (*scaffolds*) biológico tridimensionales sobre las que se une el polipéptido B de la invención. Estas estructuras tridimensionales se forman mediante interacciones proteína-proteína entre los capsómeros, que incluyen enlaces iónicos y covalentes, e incluso posibles enlaces metálicos con metales presentes en el medio que ayudan a estabilizar estas estructuras. El término “tridimensional” o “3D”, como se usa aquí, significa que el soporte

biológico de la invención tiene tres dimensiones, es decir, que se necesitan tres coordenadas para localizar una molécula dentro de ella. La forma tridimensional de este soporte biológico puede ser de cualquier forma 3D. Métodos de obtención de estructuras tridimensionales a partir de partículas virales se han descrito en la técnica
5 (Gerasopoulos K *et al.* 2010 Nanotechnology 21(5): 055304)

Polipéptido B del biocatalizador de la invención

El polipéptido B del biocatalizador de la invención comprende un enzima o fragmento
10 del mismo que conserva su actividad enzimática.

El polipéptido B está unido al polipéptido A en una región diferente a la del centro activo del enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática comprendido en dicho polipéptido B.
15

En una realización particular, el polipéptido B comprende una unidad de un enzima o de un fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática. En una realización alternativa, el polipéptido B comprende dos o más unidades de un enzima, o de un fragmento del mismo que conserva su capacidad enzimática, dispuestas en tándem. En
20 una realización alternativa, el polipéptido B comprende una unidad de dos o más enzimas diferentes, o fragmentos de los mismos que conservan su actividad enzimática, dispuestas en tándem. En una realización alternativa, el polipéptido B comprende dos o más unidades de dos o más enzimas diferentes, o fragmentos de los mismos que conservan su actividad enzimática, dispuestos en tándem. El biocatalizador de la
25 invención puede comprender una o más unidades de los polipéptidos B descritos anteriormente. En una realización preferida de la invención, el biocatalizador comprende una o más unidades de un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B comprende una unidad de un enzima o de un fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática.

30

Cualquier enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática puede formar parte del polipéptido B del biocatalizador de la invención incluyendo, sin

limitación a, oxidorreductasas (EC1) tales como deshidrogenasas, peroxidasas u oxidasas, tranferasas (EC2) tales como transaminasas, aciltransferasas, glicosiltransferasas, polimerasas, sulfotransferasas o quinasas, hidrolasas (EC3) tales como glicosidasas, lipasas, amilasas, helicasas o peptidasas, liasas (EC4) tales como

5 descarboxilasas o deshidratasas, isomerasas (EC5) tales como racemasas, epimerasas o mutasas y ligasas (EC6) tales como sintetisas. Enzimas preferidas que pueden formar parte del polipéptido B del biocatalizador de la invención incluyen, sin quedar limitadas a, lipasas, amilasas, proteasas, peptinasas, invertasas, celulasas, lipasas, lactasas, catalasas, quimosinas, xilanasas y fitasas. En una realización preferida de la invención,

10 el enzima es una lipasa, en particular la lipasa B de *Candida antárctica*.

En otra realización de la invención, el biocatalizador de la invención comprende además al menos un polipéptido C, de modo que dicho polipéptido C comprende un enzima, o un fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, diferente al enzima, o al

15 fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, comprendido en el polipéptido B, en donde dicho polipéptido C está unido al polipéptido A mediante un agente de entrecruzamiento, y en donde dicho agente de entrecruzamiento puede ser el mismo o diferente al agente de entrecruzamiento que une el polipéptido A con el polipéptido B.

20

En una realización particular, el polipéptido C comprende una unidad de un enzima, o de un fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, diferente del enzima o del fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática del polipéptido B. En una realización alternativa, el polipéptido C comprende dos o más unidades de un

25 enzima, o de un fragmento de los mismos que conserva su actividad enzimática, diferente del enzima o del fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática del polipéptido B, dispuestos en tándem. En una realización alternativa, el polipéptido C comprende una unidad de dos o más enzimas, o de un fragmento de los mismos que conserva su actividad enzimática, diferentes del enzima o del fragmento del mismo que

30 conserva su actividad enzimática del polipéptido B, dispuesto en tándem. En una realización alternativa, el polipéptido C comprende dos o más unidades de dos o más enzimas, o de un fragmento de los mismos que conserva su actividad enzimática,

- diferentes del enzima o del fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática del polipéptido B, dispuestos en tándem. El biocatalizador de la invención puede comprender una o más unidades del polipéptido C descrito anteriormente. En una realización preferida de la invención, el biocatalizador comprende una o más unidades
- 5 de un polipéptido C, en donde dicho polipéptido C comprende una unidad de un enzima o de un fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, diferente del enzima o del fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática del polipéptido B.
- 10 Tal como se ha indicado anteriormente, las proteínas de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae* comprendidas en el polipéptido A pueden ensamblarse bien en un virus o bien en una estructura similar a virus o VLP carente de material genético. En este caso, la presente invención contempla tanto que los polipéptidos B y/o C estén expuestos en la superficie del virus o de la VLP, como que queden incluidos en el
- 15 interior del virus o de la VLP.

- La presente invención contempla que los enzimas comprendidos en los polipéptidos B y C del biocatalizador de la invención sean enzimas integrantes de una ruta, en donde el producto resultante de la reacción catalizada por uno de los enzimas, por ejemplo el
- 20 enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática del polipéptido B, sea el sustrato de la reacción catalizada por otro de los enzimas, por ejemplo el enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática del polipéptido C, o bien en donde el donde el producto resultante de la reacción catalizada por uno de los enzimas, por ejemplo el enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática del
- 25 polipéptido C, sea el sustrato de la reacción catalizada por otro de los enzimas, por ejemplo el enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática del polipéptido B.

Agente de entrecruzamiento del biocatalizador de la invención

30

El polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae*, y el polipéptido B, que comprende un enzima o fragmento del

mismo que conserva su actividad enzimática, del biocatalizador de la invención están unidos entre sí mediante un agente de entrecruzamiento. En particular, el agente de entrecruzamiento según la invención es un agente de entrecruzamiento de proteínas.

- 5 La unión mediante entrecruzamiento de los polipéptidos A y B comprendidos en el biocatalizador de la invención es tal que dicho entrecruzamiento no anula la funcionalidad biológica de tales polipéptidos A y B. En particular, el entrecruzamiento no anula la capacidad de la proteína de la cápsida viral comprendida en el polipéptido A para ensamblarse y formar parte de una cápsida viral de un virus de la familia
- 10 *Potyviridae* o bien de una VLP, ni tampoco anula la funcionalidad biológica del enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática comprendido en el polipéptido B. En el caso del enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática comprendido en el polipéptido B, el entrecruzamiento se produce en un sitio diferente del centro activo enzimático del enzima o del fragmento del mismo que
- 15 conserva la actividad enzimática.

- Métodos para comprobar que el polipéptido B está unido al polipéptido A son conocidos por el experto en la materia. Un posible método comprende la unión de un anticuerpo primario que reconoce el polipéptido B de interés seguida de la unión de un
- 20 anticuerpo secundario marcado y detección del marcaje asociado al anticuerpo secundario. Otro posible método comprende el uso de proteasas específicas del polipéptido B y medida del descenso de su actividad asociada. Otro posible método comprende el marcaje de los polipéptidos y su observación mediante microscopía. El marcaje puede ser realizado, en un ejemplo no limitativo de la invención, mediante
- 25 inmunodecoración y su observación mediante SEM (*scanning electron microscopy*, microscopía electrónica de barrido). Métodos adicionales incluyen, sin limitarse a, Western blot, ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA), microscopía, etc.

- 30 En el biocatalizador de la invención, el polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, y el polipéptido B, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, están unidos

mediante un agente de entrecruzamiento, en particular mediante un agente de entrecruzamiento de proteínas. Agentes de entrecruzamiento según la invención comprenden agentes homobifuncionales o heterobifuncionales de unión de proteínas, tales como los descritos anteriormente, los cuales comprenden grupos reactivos
5 adecuados a los grupos funcionales diana presentes en los polipéptidos A y B del biocatalizador de la invención. Estos agentes de entrecruzamiento pueden unir diferentes grupos funcionales presentes en las proteínas que incluyen, sin limitarse a, grupos α -amino, grupos ϵ -amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo, grupos fenólicos y grupos imidazol. Como entiende el experto en la materia, los grupos
10 funcionales proteicos que se unen mediante el agente de entrecruzamiento están localizados en regiones expuestas de la proteína accesibles a dicho agente de entrecruzamiento.

El experto en la materia conoce que la selección del agente de entrecruzamiento
15 adecuado viene dada por factores tales como la solubilidad del reactivo, la naturaleza de los grupos reactivos, el carácter homobifuncional o heterobifuncional del agente de entrecruzamiento, la presencia de grupos fotoreactivos o termoreactivos, la longitud del brazo espaciador del agente de entrecruzamiento, el carácter divisible o no del producto, la necesidad de marcaje adicional y las condiciones de reacción necesarias para la
20 conjugación.

Agentes de entrecruzamiento preferidos según la invención incluyen, sin limitarse a, agentes sin brazo espaciador tales como ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) o isocianatos, maleimidas o bromo/iodoacetamidas, carbodiimidas como ECD (1-etil-3-
25 (3-dimetilaminopropil) hidrocloreuro de carbodiimida, agentes de entrecruzamiento homobifuncionales tales como glutaraldehído, di(N-succinimidil) carbonato, di(N-succinimidil)suberato, dimetil adipimato dihidrocloreuro, dimetil pimelimidato dihidrocloreuro, dimetil suberimidato dihidrocloreuro y agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales tales como acoplamiento mediante diazonio, ciclo-adición alcalina
30 de azida catalizada por cobre (CuAAC), ligación oxima/hidrazona, acoplamiento oxidativo a p-aminofenilalanina.

En una realización particular de la invención, los grupos funcionales proteicos a los que se dirigen los agentes de entrecruzamiento son grupos amino, en particular grupos amino de residuos aminoácidos de lisina, de residuos de histidina o del extremo amino terminal de la proteína, presentes en la proteína de la cápsida viral comprendida en el polipéptido A y/o presentes en el enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática comprendido en el polipéptido B. En una realización particular, el agente de entrecruzamiento de unión de proteínas es un agente homobifuncional. En una realización preferida de la presente invención, el agente de entrecruzamiento es el glutaraldehído ($\text{CHO}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$). Este reactivo homobifuncional puede formar en solución polímeros de diferentes pesos moleculares, y son estos polímeros los que reaccionan con los grupos amino de las proteínas para producir el entrecruzamiento.

Virus de la invención

Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención contempla que las proteínas de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae* comprendidas en el polipéptido A pueden ensamblarse para formar un virus.

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un virus de la familia *Potyviridae*, en adelante “virus de la invención”, que comprende un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unido a una proteína de la cápsida de dicho virus de la familia *Potyviridae* mediante un agente de entrecruzamiento.

En una realización particular, el enzima es una lipasa, aún más en particular, la lipasa B de *Candida antarctica*.

En una realización particular, el virus de la familia *Potyviridae* es un *Potyvirus*. En una realización aún más particular, el virus de la familia *Potyviridae* es el virus del mosaico del nabo (TuMV).

El virus de la invención exhibe en su superficie el polipéptido B, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unido a una proteína de la cápsida de dicho virus mediante un agente de entrecruzamiento. En una realización alternativa, el virus de la invención encierra en su interior el polipéptido B,
5 que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unido a una proteína de la cápsida de dicho virus mediante un agente de entrecruzamiento. Por tanto, la presente invención también se relaciona con el uso de un virus tal como se ha descrito anteriormente para la inmovilización de un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática de interés.

10

En una realización particular, el virus de la invención comprende, además, al menos un polipéptido C, que comprende un enzima diferente al enzima comprendido en el polipéptido B, en donde dicho polipéptido C está unido a una proteína de la cápsida del virus mediante un agente de entrecruzamiento. En una realización, el agente de
15 entrecruzamiento que une el polipéptido C a la proteína de la cápsida del virus es el mismo agente que une el polipéptido B a la proteína de la cápsida del virus. En una realización alternativa, el agente de entrecruzamiento que une el polipéptido C a la proteína de la cápsida del virus es diferente al agente que une el polipéptido B a la proteína de la cápsida del virus.

20

VLP de la invención

Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención contempla que las proteínas de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae* comprendidas en el
25 polipéptido A pueden ensamblarse formando una estructura similar a virus o VLP, carente de material genético.

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una VLP de un virus de la familia *Potyviridae*, en adelante “VLP de la invención”, que comprende un
30 polipéptido B, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unido a una proteína de la cápsida de dicho virus mediante un agente de entrecruzamiento.

En una realización particular, las proteínas de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae* comprendidas por la VLP son proteínas de la cápsida de un *Potyvirus*. En una realización aún más particular, las proteínas de la cápsida de un virus de la familia
5 *Potyviridae* son proteínas de la cápsida del virus del mosaico del nabo (TuMV).

La VLP de la invención comprende un polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática. En una realización particular, el enzima es una lipasa. En una realización aún más particular, el enzima es
10 la lipasa B de *Candida antarctica*.

La VLP de la invención exhibe en su superficie el polipéptido B, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unido a una proteína de la cápsida de dicha VLP mediante un agente de entrecruzamiento. En una
15 realización alternativa, la VLP de la invención encierra en su interior el polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática unido a una proteína de la cápsida de dicha VLP mediante un agente de entrecruzamiento. Por lo tanto, la presente invención se relaciona con el uso de una VLP tal como se ha descrito anteriormente para la inmovilización de un enzima o
20 fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática de interés.

En una realización particular, la VLP de la invención comprende, además, al menos un polipéptido C, que comprende un enzima diferente al enzima comprendido en el polipéptido B, en donde dicho polipéptido C está unido a una proteína de la cápsida de
25 la VLP mediante un agente de entrecruzamiento. En una realización, el agente de entrecruzamiento que une el polipéptido C a la proteína de la cápsida de la VLP es el mismo agente que une el polipéptido B a la proteína de la cápsida de la VLP. En una realización alternativa, el agente de entrecruzamiento que une el polipéptido C a la proteína de la cápsida de la VLP es diferente al agente que une el polipéptido B a la
30 proteína de la cápsida de la VLP.

Método de obtención del biocatalizador de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un biocatalizador de la invención, en adelante “método de obtención del biocatalizador de la invención”, que comprende poner en contacto un polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, con un polipéptido B, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en presencia de un agente de entrecruzamiento, bajo condiciones adecuadas para la formación de dicho biocatalizador.

10

La obtención del biocatalizador de la invención puede requerir una etapa adicional que comprende la activación del polipéptido A y/o del polipéptido B, previa a la etapa de conjugación. Así, en una realización particular del método de obtención del biocatalizador de la invención, en una primera etapa se activa el polipéptido A con el agente de entrecruzamiento para formar un complejo [polipéptido A – agente de entrecruzamiento], y, en una segunda etapa, se conjuga el complejo resultante anterior con el polipéptido B. En una realización alternativa y preferida del método de obtención del biocatalizador de la invención, en una primera etapa se activa el polipéptido B con el agente de entrecruzamiento para formar un complejo [polipéptido B – agente de entrecruzamiento], y, en una segunda etapa, se conjuga el complejo resultante anterior con el polipéptido A.

15

20

Cuando la proteína a conjugar posee grupos funcionales carboxilo reactivos, la conjugación proteica se lleva a cabo mediante métodos tales como, sin limitarse a, el método del anhídrido mixto, el método de la carboxidiimida (CDI) o el método del éster N-hidroxisuccinimida (NHS). En el método del anhídrido mixto, se hace reaccionar una de las proteínas con cloroformato de alguero, y el anhídrido de ácido formado se hace reaccionar con los grupos amino libres de la proteína a pH 9 aproximadamente. En el método de la carboxidiimida se emplean agentes tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC); N,N' -diciohexilcarbodiimida (DCC) y p-toluenosulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinietil) carbodiimida (CMC). En el método del éster N-hidroxisuccinimida, la proteína con el grupo carboxilo se acopla a

25

30

NHS en presencia de DCC, se purifica el éster de NHS obtenido y se hace reaccionar con la proteína.

- El agente de entrecruzamiento empleado en el método de obtención del biocatalizador de la invención es un agente de entrecruzamiento para la unión de proteínas, tal como se ha descrito anteriormente. La conjugación mediante un agente de entrecruzamiento del polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, y del polipéptido B, que comprende que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, tal como entiende el experto en la materia, se lleva a cabo en condiciones bajo las cuales no resultan alteradas ni la capacidad de ensamblaje en partículas virales y/o VLPs por parte de la proteína de la cápsida viral comprendida por el polipéptido A, ni la funcionalidad biológica del enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática comprendida por el polipéptido B. De este modo, las condiciones de reacción bajo las cuales se produce la conjugación son tales que permiten el mantenimiento de la estructura nativa de las proteínas a enlazar por lo que, en general, tanto la reacción de activación como la reacción de conjugación se produce en presencia de una solución tamponadora y condiciones suaves de pH.
- En una realización preferida de la invención, en donde la conjugación mediante un agente de entrecruzamiento se produce entre un polipéptido A y un polipéptido B, y en donde el polipéptido B comprende un enzima de interés, se prefiere un grado de conjugación bajo o moderado del polipéptido B tal que conserve la funcionalidad enzimática del enzima. Se considera que un enzima conserva su actividad enzimática tras la conjugación si mantiene al menos el 100%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85% o al menos el 80% de actividad enzimática con respecto a su actividad enzimática antes de la conjugación. Métodos para determinar el mantenimiento de la función biológica de una proteína, en particular de un enzima, tras su conjugación son conocidos por el experto en la materia para cada proteína particular. En una realización preferida, el polipéptido B comprende un enzima lipasa. Métodos para determinar la actividad enzimática de una lipasa son conocidos por el experto en la materia e incluyen, sin quedar limitados a, el método recogido en el Ejemplo 1 de la invención, en

el que se emplea acetato de paranitrofenilo como sustrato, así como los métodos descritos por Fuciños *et al.* (2005 J Biotechnol 117: 233-241) o el ensayo descrito en el Ejemplo 12 de la solicitud de patente WO2006/096834.

- 5 Métodos para la determinación de la capacidad de una proteína de la cápsida viral de formar partículas virales y/o VLPs son conocidos por el experto en la materia e incluyen, sin limitarse a, observación mediante microscopía electrónica de las partículas virales, tal como se describe en Risco C & Carrascosa JL 1999 Histol Histopathol 14(3): 905-926, simulaciones de tipo “*coarse-grained*” (Arkhipov A *et al.* 2006 Structure 14: 10 1767-1777) o ensayos de estabilidad vírica tal como se recogen en el Ejemplo 1 de la presente solicitud.

Asimismo, la proporción molar adecuada de proteína y agente de entrecruzamiento se determina experimentalmente tal como conoce el experto en la materia. A modo de
15 ejemplo, proporciones molares habituales de agente de entrecruzamiento:polipéptido son 1:0,001, 1:0,01, 1:0,1, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000. Proporciones preferidas de agente de entrecruzamiento:polipéptido son 1:0,01 – 1:0,1 en el caso de que el agente de entrecruzamiento sea glutaralehído, pudiendo variar en caso de otros agentes de entrecruzamiento.

20

Por otro lado, la proporción molar adecuada del polipéptido A y del polipéptido B son también determinadas experimentalmente e incluyen, sin limitarse a 1:0,001, 1:0,01, 1:0,1, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000. Proporciones preferidas de polipéptido A:polipéptido B de acuerdo con la invención son 1:0,01, 1:0,1 y 1:1.

25

Tal como se ha indicado anteriormente, en una realización particular, el método de obtención del biocatalizador de la invención comprende la activación del polipéptido A y/o la activación del polipéptido B, de modo que dicha activación tiene lugar en una etapa previa a la etapa de conjugación.

30

La reacción de activación y/o la reacción de conjugación transcurren bajo condiciones de pH, temperatura, tiempo de reacción, volumen de reacción, proporción agente de

entrecruzamiento:proteína/péptido, etc. particulares, adecuadas para la activación y/o conjugación de los polipéptidos A y B.

En relación al pH, en una realización particular de la presente invención, la reacción de
5 activación y/o de conjugación transcurre a un valor de pH comprendido entre pH 6 y pH 11. En una realización preferida, la reacción de conjugación transcurre a pH 8 aproximadamente.

En relación a la temperatura, en una realización particular de la presente invención, la
10 reacción de activación y/o de conjugación transcurre a una temperatura comprendida entre 4°C y 30°C. En una realización preferida, la reacción de activación transcurre a una temperatura de 25°C aproximadamente, y la reacción de conjugación transcurre a una temperatura de 4°C aproximadamente.

15 En relación al tiempo de reacción, en una realización particular de la presente invención, la reacción de activación y/o de conjugación transcurre en un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 1.440 minutos. En una realización preferida, la reacción de activación transcurre en un periodo de tiempo de 60 minutos aproximadamente y la
20 reacción de conjugación transcurre en un periodo de tiempo comprendido entre 840 y 1.080 minutos.

En relación al volumen de reacción, en una realización particular de la invención, la
reacción de activación y/o de conjugación transcurre en un volumen final de 50 a 750 µl
(activación 75-300 µl y conjugación 300-650 µl).
25

En relación a la proporción de agente de entrecruzamiento y la proteína y/o péptido a
conjugar, en una realización particular de la invención, la reacción de activación y/o de
conjugación se lleva a cabo con una proporción 1:0,0005, 1:0,005, 1:0,05, 1:0,5, 1:5,
1:50, 1:500 de agente de entrecruzamiento:proteína a conjugar. En una realización
30 preferida, la proporción es de 1:0,005 – 1:0,05 para el caso del glutaraldehído, si bien
otras proporciones pueden resultar adecuadas para otros agentes de entrecruzamiento.

En una realización particular, el método de obtención del biocatalizador de la invención comprende, adicionalmente, poner en contacto un polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, con un polipéptido C, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en
5 donde el enzima o fragmento del mismo del polipéptido C es diferente del enzima o fragmento del mismo del polipéptido B, en presencia de un agente de entrecruzamiento, en donde el agente de entrecruzamiento puede ser el mismo o diferente del agente de entrecruzamiento para la unión del polipéptido A y el polipéptido B, bajo condiciones adecuadas para la formación de dicho biocatalizador.

10

En una realización de la invención, el método de obtención del biocatalizador de la invención comprende la conjugación de un polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida de un *Potyvirus*, en particular del virus del mosaico del nabo, y de un polipéptido B, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su
15 actividad enzimática, en particular un enzima lipasa, más en particular la lipasa B de *Candida antarctica*.

Método de obtención del virus de la invención

20 Tal como se ha indicado anteriormente, la proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, comprendida en el polipéptido A, puede ensamblarse y dar lugar a virus de la familia *Potyviridae*, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática.

25 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un virus de la invención, en adelante, “método de obtención del virus de la invención”, en donde dicho método comprende poner en contacto un virus de la familia *Potyviridae*, con un polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en presencia de un agente de entrecruzamiento, bajo condiciones
30 adecuadas para la formación de dicho virus.

La obtención del virus de la invención puede requerir una etapa adicional que comprende la activación de las proteínas de la cápsida del virus de la familia *Potyviridae* y/o del polipéptido B, previa a la etapa de conjugación. Así, en una realización del método de obtención del virus de la invención, en una primera etapa se

5 activan las proteínas de la cápsida del virus de la familia *Potyviridae* con el agente de entrecruzamiento para formar un complejo [virus – agente de entrecruzamiento], y, en una segunda etapa, se conjuga el complejo resultante anterior con el polipéptido B. En una realización alternativa y preferida del método de obtención del virus de la invención, en una primera etapa se activa el polipéptido B con el agente de

10 entrecruzamiento para formar un complejo [polipéptido B – agente de entrecruzamiento], y, en una segunda etapa, se conjuga el complejo resultante anterior con las proteínas de la cápsida del virus de la familia *Potyviridae*.

Los agentes de entrecruzamiento, así como las condiciones de reacción de activación

15 y/o de conjugación se han descrito anteriormente.

En una realización particular, el método de obtención del virus de la invención comprende, adicionalmente, poner en contacto un virus de la familia *Potyviridae*, con un polipéptido C, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su

20 actividad enzimática, en donde el enzima o fragmento del mismo del polipéptido C es diferente del enzima o fragmento del mismo del polipéptido B, en presencia de un agente de entrecruzamiento, en donde el agente de entrecruzamiento puede ser el mismo o diferente del agente de entrecruzamiento para la unión del virus y el polipéptido B, bajo condiciones adecuadas para la formación de dicho virus.

25

En una realización particular, el método de obtención del virus de la invención comprende la conjugación de un *Potyvirus*, en particular del virus del mosaico del nabo, y de un polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en particular un enzima lipasa, más en particular la lipasa B de

30 *Candida antarctica*.

Método de obtención de VLP de la invención

Asimismo, tal como se ha indicado anteriormente, la proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, comprendida en el polipéptido A, puede ensamblarse y dar
5 lugar a una VLP, de modo que dicha VLP comprende una proteína heteróloga de interés.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de una VLP de la invención, en adelante, “método de obtención de la VLP de la
10 invención”), en donde dicho método comprende poner en contacto una VLP de un virus de la familia *Potyviridae*, con un polipéptido B, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en presencia de un agente de entrecruzamiento, bajo condiciones adecuadas para la formación de dicha VLP.

15 La obtención de la VLP de la invención puede requerir una etapa adicional que comprende la activación de las proteínas de la cápsida del virus de la familia *Potyviridae* y/o del polipéptido B, previa a la etapa de conjugación. Así, en una realización del método de obtención de la VLP de la invención, en una primera etapa se activan las proteínas de la cápsida del virus de la familia *Potyviridae* de la VLP con el
20 agente de entrecruzamiento para formar un complejo [VLP – agente de entrecruzamiento], y, en una segunda etapa, se conjuga el complejo resultante anterior con el polipéptido B. En una realización alternativa y preferida del método de obtención de la VLP de la invención, en una primera etapa se activa el polipéptido B con el agente de entrecruzamiento para formar un complejo [polipéptido B – agente de
25 entrecruzamiento], y, en una segunda etapa, se conjuga el complejo resultante anterior con las proteínas de la cápsida del virus de la familia *Potyviridae* de la VLP.

Los agentes de entrecruzamiento, así como las condiciones de reacción de activación y/o de conjugación se han descrito anteriormente.

30

En una realización particular, el método de obtención de la VLP de la invención comprende, adicionalmente, poner en contacto una VLP de un virus de la familia

Potyviridae, con un polipéptido C, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en donde el enzima o fragmento del mismo del polipéptido C es diferente del enzima o fragmento del mismo del polipéptido B, en presencia de un agente de entrecruzamiento, en donde el agente de entrecruzamiento
5 puede ser el mismo o diferente del agente de entrecruzamiento para la unión de la VLP y el polipéptido B, bajo condiciones adecuadas para la formación de dicha VLP.

En una realización particular de la invención, el método de obtención de la VLP de la invención comprende la conjugación de una VLP formada por proteínas de la cápsida
10 de un *Potyvirus*, en particular del virus del mosaico del nabo, y de un polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en particular un enzima lipasa, más en particular la lipasa B de *Candida antártica*.

Método de inmovilización de un enzima

15

Los autores de la presente invención han logrado inmovilizar una lipasa, en concreto CALB, sobre partículas virales del virus del mosaico del nabo (TuMV), observando un aumento de la actividad enzimática del enzima lipasa inmovilizado con respecto al enzima sin inmovilizar (Ejemplo 1).

20

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la inmovilización de un enzima (inmovilización enzimática), que comprende la conjugación de un polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, y un polipéptido B, que comprende dicho enzima o un
25 fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, mediante un agente de entrecruzamiento. Asimismo, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polipéptido A que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, de un virus de la familia *Potyviridae*, o de una VLP que comprende proteínas de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, para la inmovilización de
30 un polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática.

Tal como se ha descrito con anterioridad, la proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, comprendida en el polipéptido A del biocatalizador de la invención, puede ensamblarse y dar lugar a partículas virales o a VLPs. Por tanto, el polipéptido B, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, puede quedar inmovilizado mediante su unión a un virus de la familia *Potyviridae*, en particular a un *Potyvirus*, tal como TuMV, o bien a una VLP que comprende proteínas de la cápsida viral de un virus de la familia *Potyviridae*, en particular de un *Potyvirus*, tal como TuMV.

En una realización particular, dicho polipéptido A y/o dicho polipéptido B es activado previamente a su conjugación mediante un agente de entrecruzamiento, tal como se ha descrito anteriormente. Así, en una realización del método de inmovilización enzimática proporcionado por la presente invención, en una primera etapa se activa el polipéptido A con el agente de entrecruzamiento para formar un complejo [polipéptido A – agente de entrecruzamiento] y, en una segunda etapa, se conjuga el complejo resultante anterior con el polipéptido B. En una realización alternativa y preferida, en una primera etapa se activa el polipéptido B con el agente de entrecruzamiento para formar un complejo [polipéptido B – agente de entrecruzamiento], y, en una segunda etapa, se conjuga el complejo resultante anterior con el polipéptido A.

En una realización particular del método de inmovilización enzimática proporcionado por la presente invención, el polipéptido A comprende una proteína de la cápsida de un virus *Potyvirus*, en particular del virus del mosaico del nabo, y el polipéptido B comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en particular un enzima lipasa, más en particular la lipasa B de *Candida antarctica*.

Procedimiento de conversión enzimática de un sustrato en un producto

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para la conversión enzimática de un sustrato en un producto que comprende poner en contacto dicho sustrato con un biocatalizador de la invención, o con un virus de la invención, o con una VLP de la invención, en donde el enzima o fragmento del mismo que conserva

su actividad enzimática presente en el polipéptido B del biocatalizador, o del virus o de la VLP, es un enzima que cataliza una reacción enzimática específica para la conversión de dicho sustrato en dicho producto, bajo condiciones adecuadas para que dicha reacción enzimática tenga lugar.

5

Condiciones adecuadas para la conversión enzimática de un sustrato en un producto hacen referencia al tampón de reacción, pH, temperatura, tiempo de reacción, concentración de reactantes, etc., y pueden ser determinadas para cada reacción enzimática particular.

10

Ejemplos, no limitativos, de conversiones enzimáticas de un sustrato en un producto de interés de acuerdo con la presente invención incluyen la conversión de parafenilacetato (pNA) por lipasas en paranitrofenol (pNP), la hidrólisis de triacilglicerol, diacilglicerol o monoacilglicerol por lipasas a glicerol y ácidos grasos libres, la hidrólisis de lactosa por lactasas a glucosa y galactosa, la hidrólisis parcial o total de almidón o glucógeno por amilasas a azúcares más simples, la digestión de proteínas por proteasas obteniendo péptidos o aminoácidos, la digestión de péptidos por peptinasa obteniendo péptidos de menor tamaño o aminoácidos, la hidrólisis de polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos como la sacarosa por invertasas para obtener oligosacáridos o monosacáridos, la hidrólisis de celulosa o derivados por celulasas para obtener glucosa, la conversión de peróxido de oxígeno por catalasas en agua y oxígeno, la digestión de la caseína de la leche por quimosinas para obtener cuajados en productos derivados de la leche, la hidrólisis de hemicelulosas por xilanasas para obtener hidratos de carbono menos ramificados, la hidrolisis de fitato por fitasas para obtener distintos tipos de inositol y fosfato, etc.

25

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

30

EJEMPLO 1**Inmovilización de lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) en la proteína de la cápsida del virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*) (CP-TuMV)**

- 5 Los inventores de la presente invención han logrado inmovilizar con éxito la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) sobre la proteína de la cápsida del virus del mosaico del nabo TuMV (*Turnip mosaic virus*). Para ello, los inventores han seguido un procedimiento de bioconjugación, adaptado a partir de la metodología descrita en Hermanson GT 2008 *Bioconjugate Techniques*. 2ª Ed. Academic Press, San Diego.

10

Materiales y métodosPurificación del virus

- 15 Plantas *Brassica juncea* fueron inoculadas en el estadio de desarrollo 1,4-1,5 con la cepa TuMV UK1. La purificación de las partículas víricas fue llevada a cabo mediante el método descrito por Sánchez *et al.* (Sánchez F *et al.* 1998 Virus Res 55 (2):207-219). El virus purificado se almacenó a una temperatura de -20 °C en tampón fosfato potásico 0,25M pH 7,5 EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM y glicerol 50%. El grado
- 20 de purificación se determinó mediante la ley de Lambert-Beer usando el coeficiente de extinción 2,65 para potivirus (A 0,1%, 1 cm, 260 nm),

Ensayos de estabilidad vírica

- 25 Los ensayos de estabilidad vírica se realizaron con el objetivo de evaluar el mantenimiento estructural frente a diferentes parámetros tales como pH, pH del tampón de conjugación y solventes orgánicos empleados en los ensayos de actividad. Para ello, se analizaron cambios en los espectros de absorbancia y de la relación A_{250}/A_{267} típica de nucleoproteínas (Thounevel JC *et al.* 1976 Annals Appl Biol 84(3): 311-320). Los
- 30 espectros se obtuvieron tras 24 h y a temperatura ambiente mediante Nanodrop®.

La evaluación de estabilidad viral a diferente pH se llevó a cabo en tampón Britton & Robinson en un rango de pH de entre 5 y 12, y en tampón de conjugación (tampón fosfato 0,02M) en un rango de pH de entre 7 y 9.

- 5 El mantenimiento estructural en solvente orgánico (acetonitrilo) se realizó a la misma concentración empleada en los ensayos de actividad, 7% y 50%.

La estabilidad viral en función de la temperatura se llevó a cabo a diferentes tiempos (60-360 min) y temperaturas (50°C, 60°C, 70°C y 100°C).

10

Bioconjugación: etapa de activación

- La lipasa CALB (Sigma®) se disolvió en tampón fosfato 0,02 M pH 8 a concentración 1 mg/ml ó 10 mg/ml, y se incubó con glutaraldehído (GA) al 1% durante 1 h a
15 temperatura ambiente y mediante agitación suave.

- A continuación, se realizó una filtración para eliminar el exceso de agente de entrecruzamiento, mediante dispositivos comerciales de filtración/concentración. Para la disolución de baja concentración, se empleó una columna de desalado de resina acrílica
20 con un MWCO ("*molecular weight cut off*") de 7 kDa (Zeba spin column®). Para la disolución de mayor concentración, una solución enzimática y una membrana de celulosa regenerada con NMWL ("*nominal molecular weight limit*") de 10 kDa (Amicon® YM-10).

- 25 El concentrado resultante tras la centrifugación siguiendo las instrucciones del fabricante se recuperó y ajustó a la concentración inicial en tampón fosfato potásico 0,02 M pH 8.

Bioconjugación: etapa de conjugación

30

La conjugación de CALB-GA y TuMV se realizó en diferentes proporciones CP-TuMV:CALB (100:1, 10:1 y 1:1, unidades de CP:unidades de CALB) en un volumen

de 600 µl e incubando la mezcla durante 18 horas, a 4° C y con agitación orbital (15 rpm). Se incluyeron controles sin GA y sin virus.

Tras la conjugación, los posibles sitios reactivos de GA que pudieran permanecer
5 activos fueron bloqueados con 30 µl de glicina 0,5 M en tampón carbonato pH 8 durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación, siguiendo las condiciones empleadas en Hermanson GT 2008 *Bioconjugate Techniques*. 2ª Ed. Academic Press, San Diego.

10 Los productos resultantes de los pasos anteriores fueron sometidos a filtración a través de un dispositivo comercial (Amicon® YM-100, NMWL -*Nominal Molecular Weight Limit*- de 100 kDa) para separar moléculas de tamaño inferior a 100 kDa, que comprenden agregados con 1 a 3 moléculas de CALB, de la mezcla que contiene CALB bioconjugada o atrapada con TuMV o agregados de CALB de más de 3 moléculas de
15 enzima. Los conjugados se mantuvieron a una temperatura de -20°C y en glicerol al 50%.

La Figura 1 muestra un esquema del proceso de activación y conjugación empleados.

20 SDS-PAGE

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) al 12% y tinción con EZ blue® (Sigma) para la cuantificación de la proteína
25 unida a virus. En paralelo, se cargaron en el gel cantidades variables, entre 20 y 200 ng, de lipasa libre con diferentes volúmenes de cut-off (obtenidos a partir de volúmenes de exclusión de Centricon®). La concentración se determinó comparando la intensidad de las bandas obtenidas mediante Adobe Photoshop®.

Ensayos de actividad enzimática CALB

30

La actividad enzimática del enzima CALB inmovilizado sobre TuMV se ensaya utilizando como sustrato acetato de p-nitrofenilo (Jung S & Park S 2008 *Biotechnology*

Letters 30: 717-722) en tampón MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico)-Na 50 mM pH 8 en lugar de tampón BES (ácido N,N-bis-(2-hidroxietil)-2-amino-etansulfónico).

- 5 Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos, durante 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación, en un volumen final de 250 µl. La absorbancia de p-nitrofenilo se midió en un espectrofotómetro Tecan®.

- La comparación de las diferentes etapas del proceso se llevó a cabo con una
10 concentración 1,5 mM de sustrato y por duplicado. Se midió la actividad específica entre los conjugados, mostrándose el error estándar de los parámetros cinéticos.

- Los ensayos de actividad de CALB en los distintos pasos del proceso se muestran como porcentaje respecto de la actividad de la CALB comercial (considerado un 100%)
15 utilizada en el proceso de bioconjugación.

Microscopía electrónica

- Las muestras para microscopía electrónica se prepararon dejando caer una gota de 10 µl
20 de los conjugados y los controles sobre rejillas para microscopía electrónica cubiertas de níquel Formvar® (3,05 mm níquel, TAAB). Tras 15 min de incubación, las rejillas se lavaron con 200 gotas de agua y se tiñeron con acetato de uranilo al 2% durante 2 minutos. Las rejillas se secaron y almacenaron a temperatura ambiente. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía electrónica en un equipo JEM JEOL1010 a 80 kV.
25

Resultados

Purificación del virus

- 30 El rendimiento obtenido durante la purificación fue de aproximadamente 30 µg de virus por gramo de tejido infectado. El tamaño de la proteína de la cápsida (CP) obtenido mediante SDS-PAGE fue el esperado (33 kDa).

Ensayos de estabilidad vírica

En cuanto a la estabilidad en función del pH, el valor obtenido para la relación A_{250}/A_{267} tanto en las muestras como en los controles fue el mismo para valores de pH comprendidos entre 6 y 11 (Figura 2A). Se observó un aumento para valores de pH 5 y 12, indicativos de que la estabilidad resulta alterada a dichos valores. Se observaron también diferencias en función de la concentración del virus, siendo los valores más estables a mayor concentración del virus. En relación a los cambios en los espectros, se observaron cambios en la forma de la curva a pH 5 y 12, mostrando una desviación en la región 250-267 (Figura 2B). Estos resultados indican que los valores de pH adecuados para la conjugación química están comprendidos entre pH 6 y pH 11.

En cuanto a la estabilidad en función del tampón de conjugación, se ensayó el tampón fosfato 0,02 M pH 7-9 (Figura 2C). Se observó que la estabilidad de los viriones se mantuvo a todos los pHs para la molaridad del tampón empleada. Se seleccionó el valor de pH 8 para sucesivos experimentos.

En cuanto a la estabilidad en función del acetonitrilo, la relación A_{250}/A_{267} se mantuvo similar a los controles con una proporción de acetonitrilo del 7% (Figura 2D), que se empleó posteriormente en los ensayos de actividad. Por otro lado, a proporciones mayores de acetonitrilo se observaron cambios en la relación A_{250}/A_{267} .

En cuanto a la estabilidad en función de la temperatura, se observó que el virus era estable a 50°C durante 240 minutos. Transcurrido ese tiempo, se observó la presencia de un estado transicional no estable. A temperaturas superiores, tales como 60°C, e incluso en periodos de tiempo menores, se observó un aumento de la relación A_{250}/A_{267} . A 70°C y 100°C se observaron pocos cambios entre las muestras (Figura 2E).

Conjugación química

Se llevaron a cabo 5 reacciones en paralelo empleando los conjugados denominados C1-C5 (Tabla2). Se observaron variaciones en el color debidas a la formación de las bases de Schiff tras el paso de bloqueo, siendo de color más oscuro conforme aumenta la proporción TuMV-CP:CALB (Figura 3).

Tabla 2
Características de los conjugados empleados

Nombre	Proporción TuMV-CP:CALB	Presencia de GA
C1	100:1	Sí
C2	0:1	Sí
C3	100:1	No
C4	10:1	Sí
C5	1:1	Sí

10

Tras el bloqueo, los conjugados se filtraron a través de un dispositivo con límite de exclusión de 100 kDa, de modo que se retuvieron CALB conjugada o atrapada por partículas TuMV, así como moléculas formadas por al menos 4 unidades de CALB.

15 Para evaluar la proporción de CALB retenida mediante el dispositivo de separación, se llevó a cabo una cuantificación basada en los niveles de intensidad de las bandas correspondientes a 33 kDa. Se realizó una curva patrón mediante concentraciones conocidas de lipasa libre, de $R^2=0,97$. Se midió la intensidad de las muestras problema y se cuantificó CALB unida a virus (Figura 4). En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de lipasa unida a virus, de modo que los porcentajes obtenidos fueron mayores para el conjugado C5, siendo similares para el conjugado C4.

25

Tabla 3

Estimación de la eficiencia de conjugación basada en el porcentaje de CALB en cada muestra final

Muestra	Estimado en PAGE (ng/μl)	Estimado en cut-off (ng)	CALB inicial (ng)	CALB unida o atrapada (ng)	CALB unida o atrapada (%)
C1	2,64	1.969,88	2400	430,12	17,92
C2	2,70	2.064,13	2400	335,87	13,99
C3	1,98	740,75	1200	459,25	38,27
C4	2,49	1.858,50	24000	22.141,50	92,26
C5	18,68	13.052,07	240000	226.947,93	94,56

5 Ensayos de actividad CALB

En experimentos anteriores, los ensayos de CALB fueron establecidos con un sustrato a concentración fija (1,5 mM) con el propósito de evaluar la actividad en diferentes pasos del protocolo de conjugación (Tabla 4). Posteriormente, los ensayos cinéticos se llevaron a cabo en presencia de diferentes concentraciones de sustrato (Figura 5). La Tabla 5 muestra los valores de p y otros parámetros analizados.

Tabla 4

Etapas del proceso y comparación con CALB comercial
(los resultados se muestran en proporciones relativas)

Muestra	Lavado de exceso de GA		Bloqueo	Cut-off	Conjugado
	Columna Zeba	Centricon			
C1	10,10	NA	8,66	1,63	9,08
C2	10,10	NA	8,35	1,60	11,40
C3	0,10	NA	NA	3,02	0,43
C4	NA	2,05	5,29	3,76	1,79
C5	NA	2,05	3,15	2,06	1,41

[NA: no ensayado]

Tabla 5

Parámetros cinéticos y actividad específica de los conjugados
(la última columna muestra las proporciones relativas de la mejora de actividad específica de los conjugados)

Muestra	Km (μM)	Vmax ($\mu\text{M}/\text{min}$)	CALB (ng)	Actividad específica ($\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Incremento (%)
Lipasa comercial	1.822,56 $\pm$ 365,67	1.232,74 $\pm$ 149,0 5	4,95 x 10 ⁻⁵	2,49 x 10 ⁷	
C1	2.538,10 $\pm$ 364,72	211,43 $\pm$ 20,66	4,00 x 10 ⁻⁶	5,29 x 10 ⁷	212
C2	2.731,43 $\pm$ 989,31	226,36 $\pm$ 56,85	4,00 x 10 ⁻⁶	5,66 x 10 ⁷	227
C4	2.385,67 $\pm$ 689,15	926,70 $\pm$ 176,10	2,00 x 10 ⁻⁵	4,63 x 10 ⁷	186
C5	859,54 $\pm$ 197,75	829,10 $\pm$ 86,12	1,00 x 10 ⁻⁵	8,29 x 10 ⁷	333

5

En cuanto a la actividad obtenida en las diferentes etapas del proceso, se observaron diferencias relacionadas con el dispositivo particular empleado para el lavado del exceso de glutaraldehído (GA). La columna Zeba® permitió obtener una mejora en la actividad de las muestras C1 y C2. Sin embargo, la actividad de la muestra C3 disminuyó, probablemente debido a la ausencia de GA. Con el sistema Centricon® se observó un aumento de 2 veces en la actividad de las muestras C4 y C5. Tras el lavado, los conjugados para los que se obtuvieron mayores actividades fueron C1 y C2, siendo el mejor resultado el obtenido para la muestra C2.

15 Asimismo, se determinaron los parámetros cinéticos correspondientes a los conjugados, a excepción de C3 (control sin GA). El mayor aumento de actividad específica se obtuvo para el conjugado C5.

Microscopía electrónica

20

La apariencia de los conjugados obtenidos se analizó mediante microscopía electrónica. En el caso de C1, se observó la formación moderada de una estructura en red. En la muestra C2, no se observaron partículas virales. En la muestra C3 se observó una baja formación de estructura en red. Sin embargo, en las muestras C4 y C5 se observó la

formación de estructuras en red complejas, en especial en la muestra C5. Ambas muestras C4 y C5 dieron lugar con frecuencia a una distribución heterogénea en los límites de las rejillas. Esto podría ser debido a un aumento de la hidrofobicidad de las muestras con alto contenido en lipasa CALB.

5

Discusión/Conclusiones

TuMV es estable dentro de un amplio rango de pH (6-11) y además tolera cantidades limitadas de acetonitrilo. Por otro lado, el rango de temperatura en el que TuMV es estable (4°C-50°C) puede considerarse aceptable dentro de los parámetros biológicos. Los resultados muestran una transición estructural a 60°C, que confirmaría los resultados de Atabekov *et al.* (Atabekov J *et al.* 2011 J Gen Virol 92(2): 453-456). Por tanto, TuMV puede considerarse como un biosoporte de interés en un amplio rango de condiciones necesarias en una variedad de procesos. Así, la presente invención proporciona un virión estable que puede ser empleado como herramienta en la inmovilización proteica.

Los resultados obtenidos en la etapa de bloqueo sugieren una correlación entre los grupos reactivos obtenidos y el color observado. La cantidad total de CALB unida al virus varía, en función de parámetros tales como la concentración de la muestra y el dispositivo empleado para la filtración. El sistema se aproxima a la saturación de CALB en C4 y C5. Los datos obtenidos para C1 y C2 son similares, mientras que en C3 se puede retener una mayor cantidad de CALB. Esto puede deberse a que la conjugación se lleva a cabo en un mayor volumen y a que se evitan impedimentos estéricos. En C2, la lipasa forma agregados a modo de bolas conjugadas con GA. En C3, se considera que la CALB queda retenida debido a las etapas de centrifugación, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica.

Cuando se compara la actividad en diferentes etapas del proceso se observa que hay un mayor aumento de actividad cuando se emplea la resina acrílica (columna Zeba®), de modo que CALB pasa a través de la columna y GA queda retenido. El lavado con Centricon® puede formar aglutinados de CALB activada y la filtración de GA. Esto

podría relacionarse con impedimentos estéricos en los conjugados finales. La mayor actividad se observa para CALB sin virus (C2), en donde el enzima entrecruzado puede dar lugar a agregados, lo cual puede explicar el aumento de actividad (Lopez-Serrano P *et al.* 2002 Biotechnol Lett 24(16): 1379-1383). Tasas mayores de CALB, en donde se
5 dificulta el acceso al sustrato y hay salida del producto, resultan en valores menores de actividad, lo cual es confirmado por microscopía electrónica (Figura 6). Los valores de Km para C5 apuntan hacia una menor afinidad por el sustrato.

La actividad específica relativa muestra mejoras de entre el 186% al 333% respecto a la
10 lipasa comercial. Es necesario señalar que la heterogeneidad de los conjugados C4 y C5 hace difícil lograr la reproducibilidad entre ensayos.

El sistema de la invención permitiría la unión de varios enzimas a la superficie del virión para la catálisis de reacciones que transcurren en diferentes etapas. Por otro lado,
15 este sistema ofrece la posibilidad de unir diferentes moléculas biológicas, tales como péptidos y enzimas, convirtiéndose en una alternativa útil como soporte (*scaffold*) tridimensional en la ingeniería de tejidos. Además, la longitud entre los virus se puede ajustar mediante el uso de enlazadores diferentes o mediante la combinación de varias moléculas (péptido-virus-enzima). TuMV posee aproximadamente 11 residuos de lisina
20 por CP y 2000 copias de CP, que suponen un mínimo de 22.000 sitios susceptibles de reaccionar con GA (sin prestar atención a otros residuos con reactividad es posible). La bioseguridad de los conjugados se puede además mejorar mediante el uso de VLP que carecen de material genético. Si se compara la relación superficie/volumen de nanotubos de carbono y de TuMV, se aprecia que la relación es 400 veces mayor en el
25 caso de TuMV. Esta ventaja se complementa además con la monodispersión y la estructura regular de los virus de tipo flexuoso.

REIVINDICACIONES

1. Un biocatalizador que comprende
 - un polipéptido A que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, y
 - un polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática,en donde dicho polipéptido A está unido al polipéptido B mediante un agente de entrecruzamiento.
2. Biocatalizador según la reivindicación 1, en el que la proteína de la cápsida forma parte de un virus o de una VLP.
3. Biocatalizador según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la proteína de la cápsida es una proteína de la cápsida de un *Potyvirus*.
4. Biocatalizador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína de la cápsida es una proteína de la cápsida del virus del mosaico del nabo (TuMV).
5. Biocatalizador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el enzima es una lipasa.
6. Biocatalizador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el enzima es la lipasa B de *Candida antarctica*.
7. Biocatalizador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente de entrecruzamiento es glutaraldehído.
8. Biocatalizador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende, además, al menos, un polipéptido C que comprende un enzima diferente al enzima comprendido en el polipéptido B, en donde dicho polipéptido C está

unido al polipéptido A mediante un agente de entrecruzamiento, en donde dicho agente de entrecruzamiento es el mismo, o diferente al, agente de entrecruzamiento que une el polipéptido A con el polipéptido B.

- 5 9. Biocatalizador según la reivindicación 8, en el que dichos enzimas comprendidos en los polipéptidos B y C se seleccionan de modo que el producto resultante de la reacción enzimática catalizada por uno de los enzimas es el sustrato de la reacción enzimática catalizada por el otro enzima.
- 10 10. Un virus de la familia *Potyviridae* que comprende un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unido a una proteína de la cápsida de dicho virus de la familia *Potyviridae* mediante un agente de entrecruzamiento.
- 15 11. Virus según la reivindicación 10, en donde el virus de la familia *Potyviridae* es un *Potyvirus*.
12. Virus según cualquiera de las reivindicaciones 10 ú 11, en el que el virus de la familia *Potyviridae* es el virus del mosaico del nabo (TuMV).
- 20 13. Virus según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el enzima es una lipasa.
14. Virus según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el enzima es la lipasa B de *Candida antarctica*.
- 25 15. Virus según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que el agente de entrecruzamiento es glutaraldehído.
- 30 16. Virus según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que dicho virus comprende, además, al menos, un polipéptido C que comprende un enzima diferente al enzima comprendido en el polipéptido B, en donde dicho

polipéptido C está unido al virus mediante un agente de entrecruzamiento, en donde dicho agente de entrecruzamiento puede ser el mismo o diferente al agente de entrecruzamiento que une el virus con el polipéptido B.

- 5 17. Virus según la reivindicación 16, en el que dichos enzimas comprendidos en los polipéptidos B y C se seleccionan de modo que el producto resultante de la reacción enzimática catalizada por uno de los enzimas es el sustrato de la reacción enzimática catalizada por el otro enzima.
- 10 18. Una VLP de un virus de la familia *Potyviridae* que comprende un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, unido a una proteína de la cápsida de dicho virus mediante un agente de entrecruzamiento.
- 15 19. VLP según la reivindicación 18, en la que el virus de la familia *Potyviridae* es un *Potyvirus*.
- 20 20. VLP según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, en la que el virus de la familia *Potyviridae* es el virus del mosaico del nabo (TuMV).
21. VLP según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en la que el enzima es una lipasa.
- 25 22. VLP según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en la que el enzima es la lipasa B de *Candida antarctica*.
23. VLP según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en la que el agente de entrecruzamiento es glutaraldehído.
- 30 24. VLP según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, que comprende, además, al menos, un polipéptido C que comprende un enzima diferente al enzima comprendido en el polipéptido B, en donde dicho polipéptido C está unido a la

VLP mediante un agente de entrecruzamiento, en donde dicho agente de entrecruzamiento puede ser el mismo o diferente al agente de entrecruzamiento que une la VLP con el polipéptido B.

- 5 25. VLP según la reivindicación 24, en la que dichos enzimas comprendidos en los polipéptidos B y C se seleccionan de modo que el producto resultante de la reacción enzimática catalizada por uno de los enzimas es el sustrato de la reacción enzimática catalizada por el otro enzima.
- 10 26. Un método de obtención de un biocatalizador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende poner en contacto un polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, con un polipéptido B, que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en presencia de un agente de entrecruzamiento, bajo condiciones adecuadas para la formación de dicho biocatalizador.
- 15 27. Método según la reivindicación 26, que comprende
- 20 (i) activar el polipéptido A con el agente de entrecruzamiento, para formar un complejo [polipéptido A – agente de entrecruzamiento], y
- (ii) conjugar el complejo resultante en (i) con el polipéptido B.
- 25 28. Método según la reivindicación 26, que comprende
- (i) activar el polipéptido B con el agente de entrecruzamiento, para formar un complejo [polipéptido B – agente de entrecruzamiento], y
- (ii) conjugar dicho complejo resultante en (i) con el polipéptido A.
- 30 29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que la proteína de la cápsida forma parte de un virus o de una VLP.
- 30 30. Un método de obtención de un virus según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, que comprende poner en contacto un virus de la familia *Potyviridae*, con

un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en presencia de un agente de entrecruzamiento, bajo condiciones adecuadas para la formación de dicho virus.

5

31. Método según la reivindicación 30, que comprende

(i) activar las proteínas de la cápsida del virus con el agente de entrecruzamiento, para formar un complejo [virus – agente de entrecruzamiento], y

10

(ii) conjugar el complejo resultante en (i) con el polipéptido B.

32. Método según la reivindicación 30, que comprende

(i) activar el polipéptido B con el agente de entrecruzamiento, para formar un complejo [polipéptido B – agente de entrecruzamiento], y

15

(ii) conjugar dicho complejo resultante en (i) con el virus.

33. Un método de obtención de una VLP según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 25, que comprende poner en contacto una VLP de un virus de la familia *Potyviridae*, con un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en presencia de un agente de entrecruzamiento, bajo condiciones adecuadas para la formación de dicha VLP.

20

34. Método según la reivindicación 33, que comprende

25

(i) activar la VLP con el agente de entrecruzamiento, para formar un complejo [VLP – agente de entrecruzamiento], y

(ii) conjugar el complejo resultante en (i) con el polipéptido B.

35. Método según la reivindicación 33, que comprende

30

(i) activar el polipéptido B con el agente de entrecruzamiento, para formar un complejo [polipéptido B – agente de entrecruzamiento], y

(ii) conjugar dicho complejo resultante en (i) con la VLP.

36. Un método para inmovilizar un enzima que comprende conjugar un polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, con un polipéptido B, que comprende un enzima o un fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, mediante un agente de entrecruzamiento.
37. Método según la reivindicación 36, en el que la proteína de la cápsida de dicho virus de la familia *Potyviridae* forma parte de un virus o de una VLP.
38. Método según cualquiera de las reivindicaciones 36 ó 37, que comprende
- (i) activar el polipéptido A con el agente de entrecruzamiento para formar un complejo [polipéptido A – agente de entrecruzamiento], y
 - (ii) conjugar dicho complejo resultante en (i) con el polipéptido B.
39. Método según cualquiera de las reivindicaciones 36 ó 37, que comprende
- (i) activar el polipéptido B con el agente de entrecruzamiento para formar un complejo [polipéptido B – agente de entrecruzamiento], y
 - (ii) conjugar dicho complejo resultante en (i) con el polipéptido A.
40. Método según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, en el que el virus de la familia *Potyviridae* es un *Potyvirus*.
41. Método según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 40, en el que virus de la familia *Potyviridae* es el virus del mosaico del nabo (TuMV).
42. Método según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 41, en el que el enzima es una lipasa.
43. Método según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 42, en el que el enzima es la lipasa B de *Candida antarctica*.

44. Método según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 43, en el que el agente de entrecruzamiento es glutaraldehído.
45. Método según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 44, que comprende, además, inmovilizar un segundo enzima, comprendiendo dicho método conjugar dicho polipéptido A, que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, con un polipéptido C, comprendiendo dicho polipéptido C dicho segundo enzima o un fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática, en donde dicho segundo enzima es un enzima diferente al enzima comprendido en el polipéptido B, mediante un agente de entrecruzamiento.
46. Uso de
- (i) un polipéptido A que comprende una proteína de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*, o de
 - (ii) un virus de la familia *Potyviridae*, o de
 - (iii) una VLP que comprende proteínas de la cápsida de un virus de la familia *Potyviridae*,
- para la inmovilización de un polipéptido B que comprende un enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática.
47. Uso según la reivindicación 46, en el que el virus de la familia *Potyviridae* es un *Potyvirus*.
48. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 46 ó 47, en el que el virus de la familia *Potyviridae* es el virus del mosaico del nabo (TuMV).
49. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 46 a 48, en el que el enzima es una lipasa.
50. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 46 a 49, en el que el enzima es la lipasa B de *Candida antarctica*.

51. Un procedimiento para la conversión enzimática de un sustrato en un producto que comprende poner en contacto dicho sustrato con un biocatalizador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o con un virus según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, o con una VLP según cualquiera de las
5 reivindicaciones 17 a 23, en donde el enzima o fragmento del mismo que conserva su actividad enzimática presente en el polipéptido B de dicho biocatalizador, o de dicho virus o de dicha VLP, es un enzima que cataliza una reacción enzimática específica para la conversión de dicho sustrato en dicho
10 producto, bajo condiciones adecuadas para que dicha reacción enzimática tenga lugar.

1/9

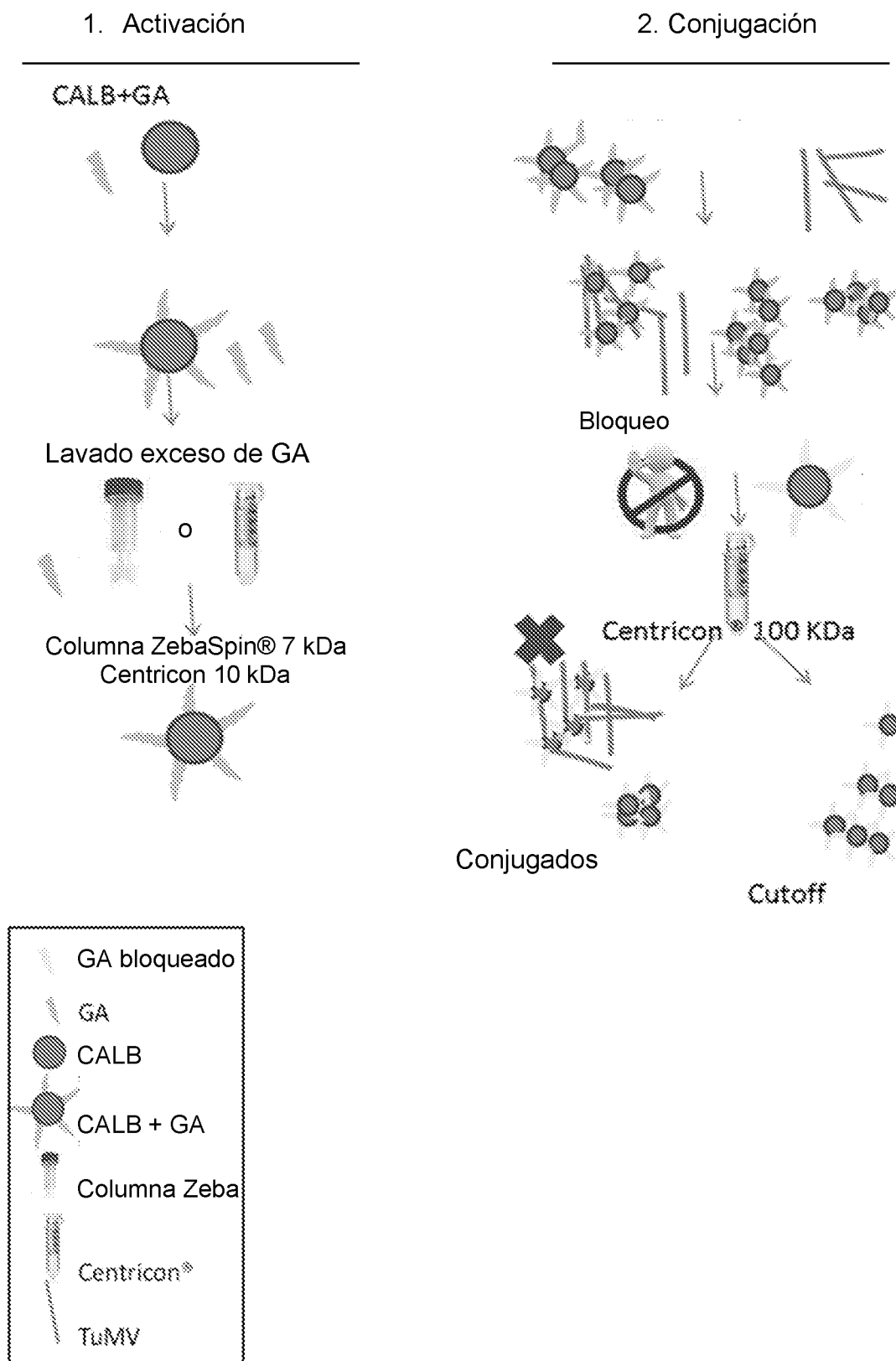


FIG. 1

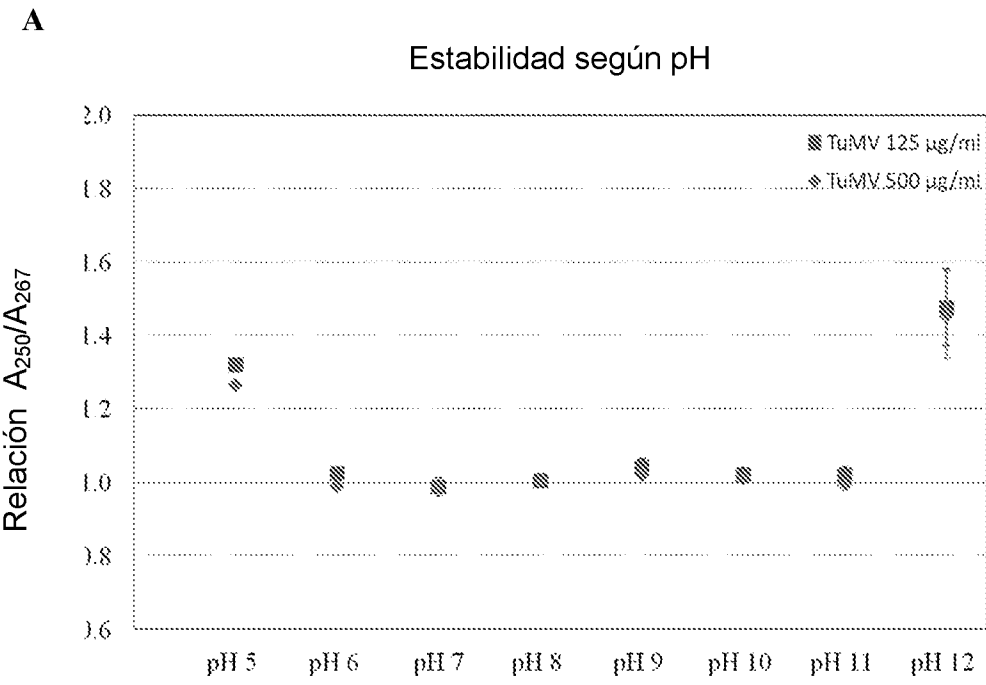
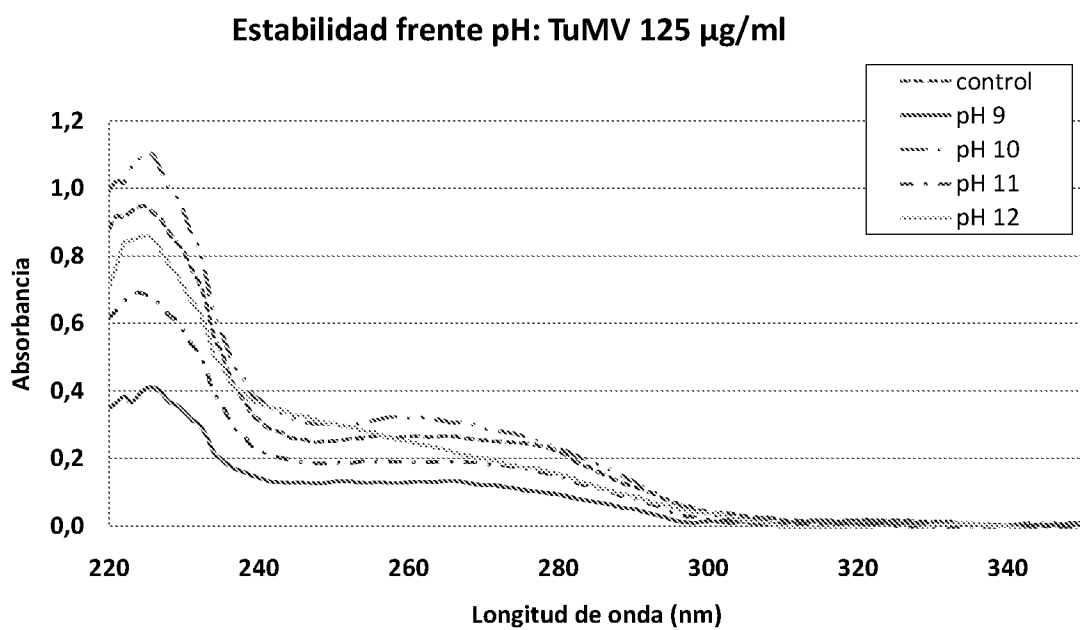
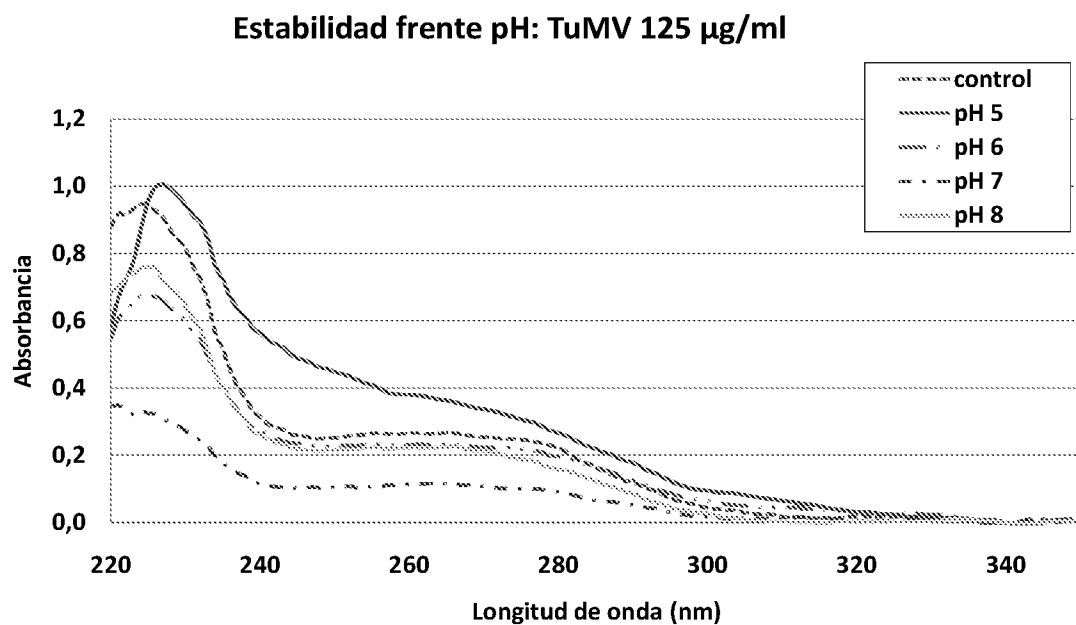


FIG. 2

B**FIG. 2 (cont.)**

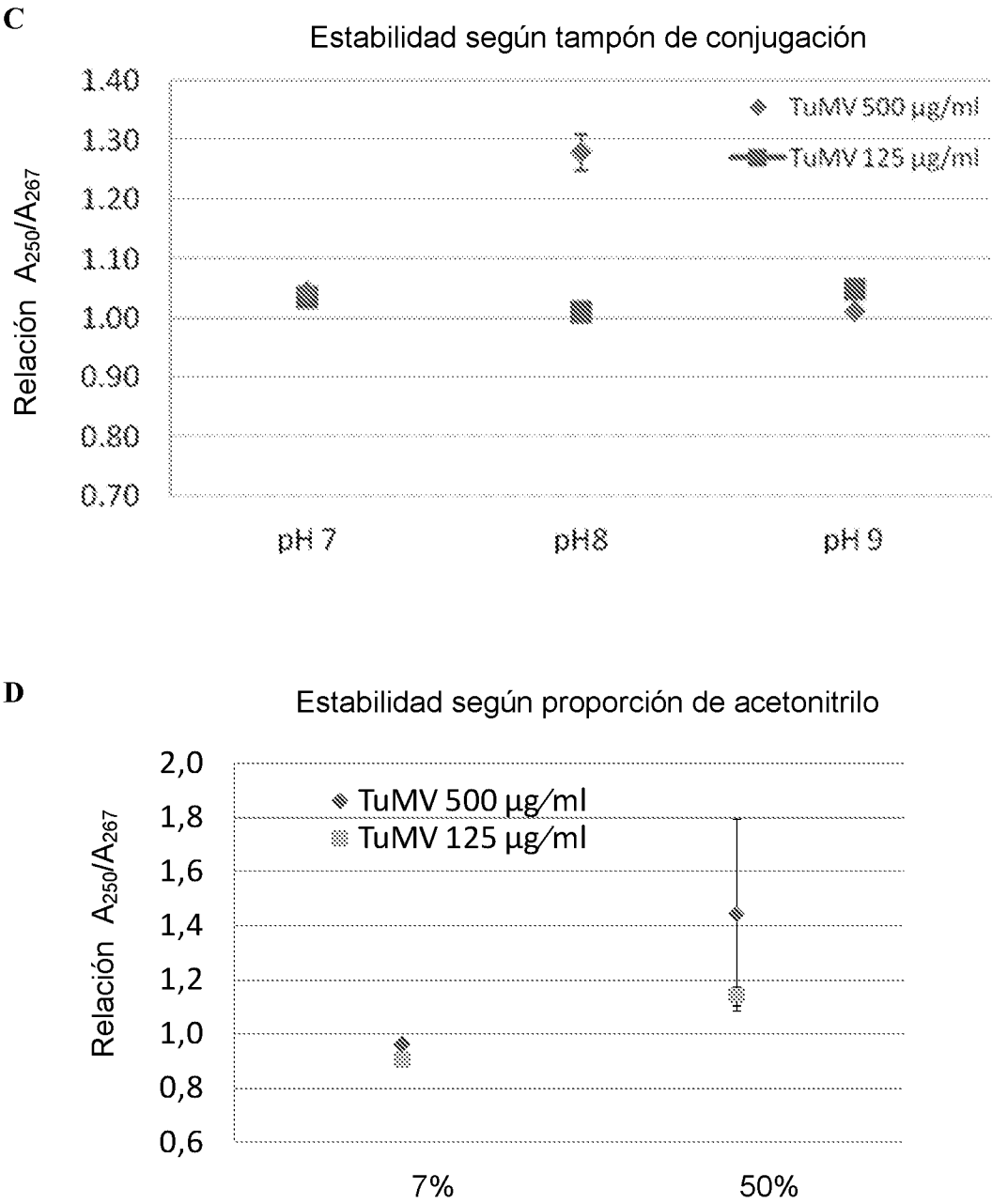


FIG. 2 (cont.)

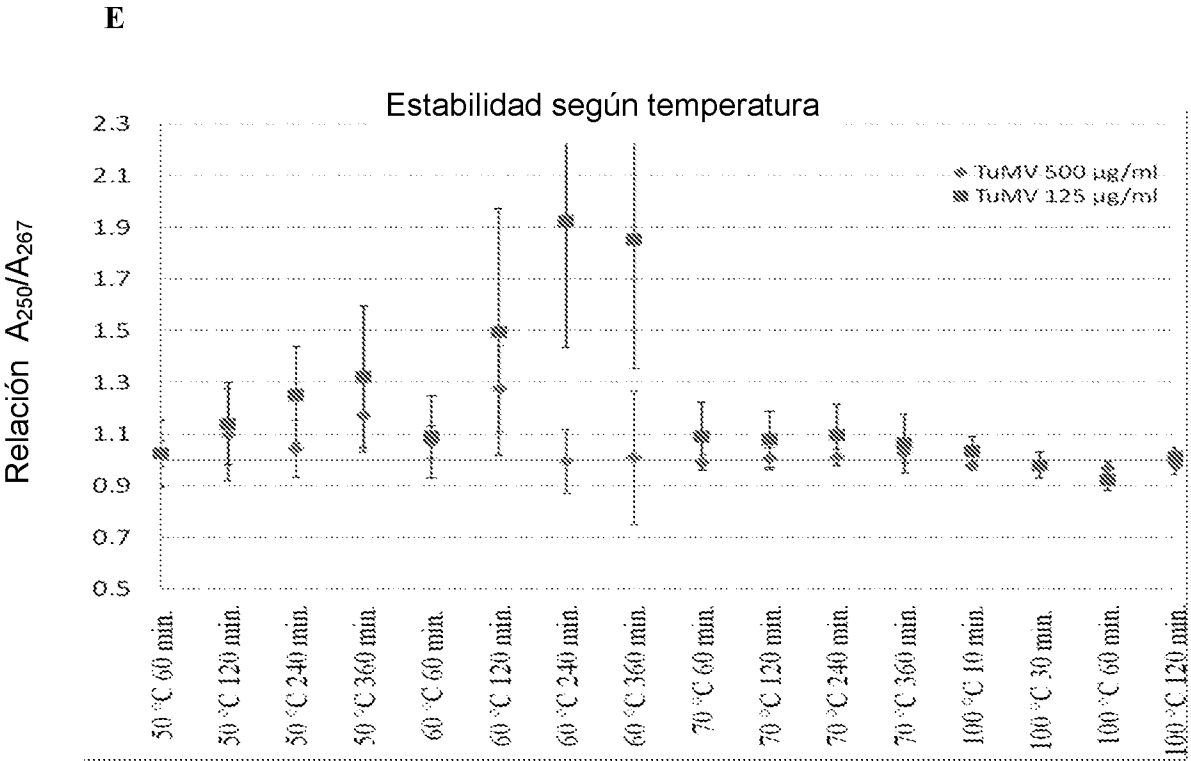


FIG. 2 (cont.)

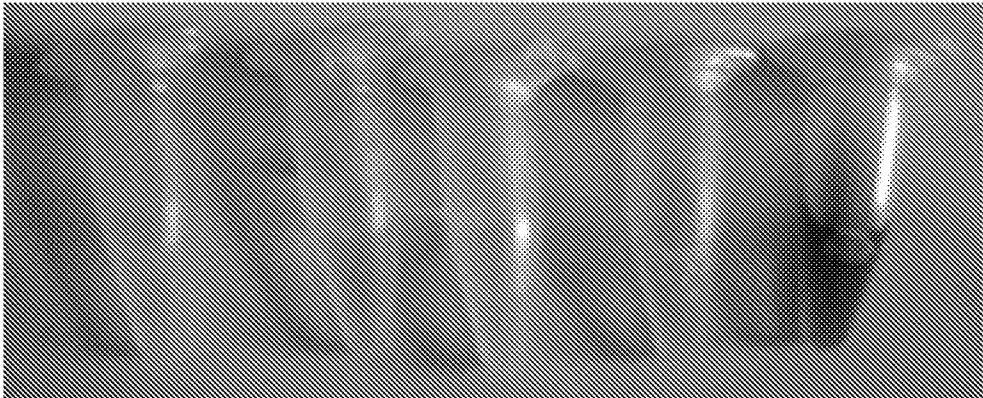


FIG. 3

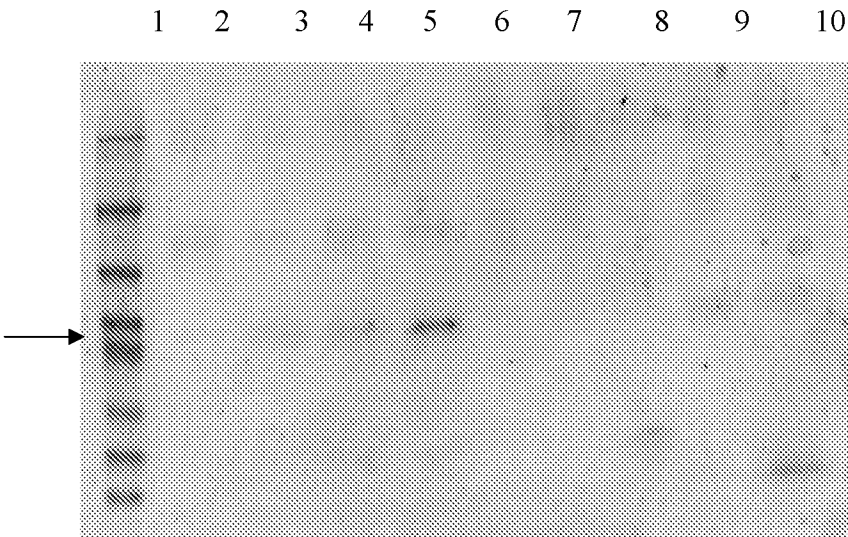


FIG. 4

7/9

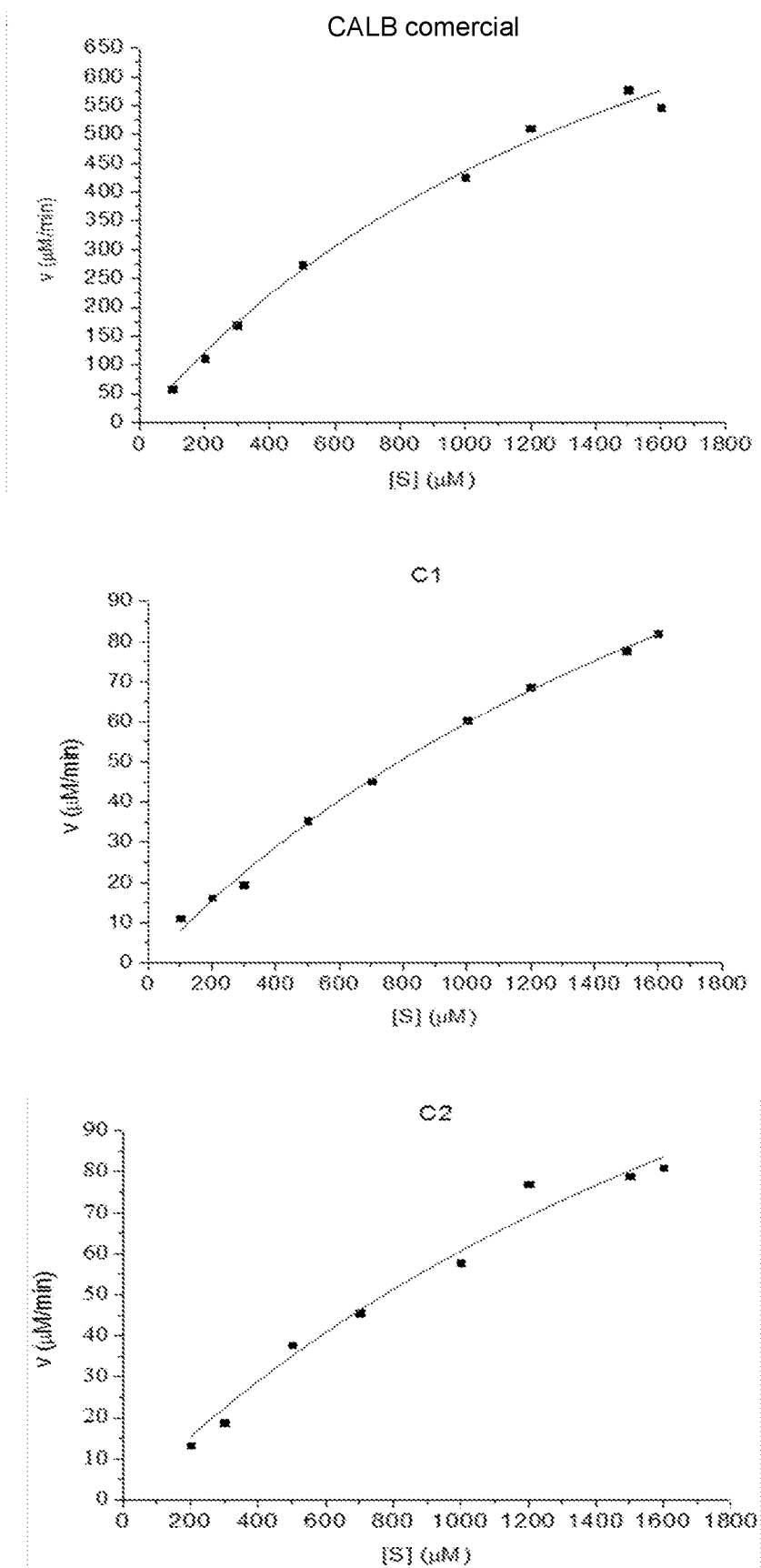


FIG. 5

8/9

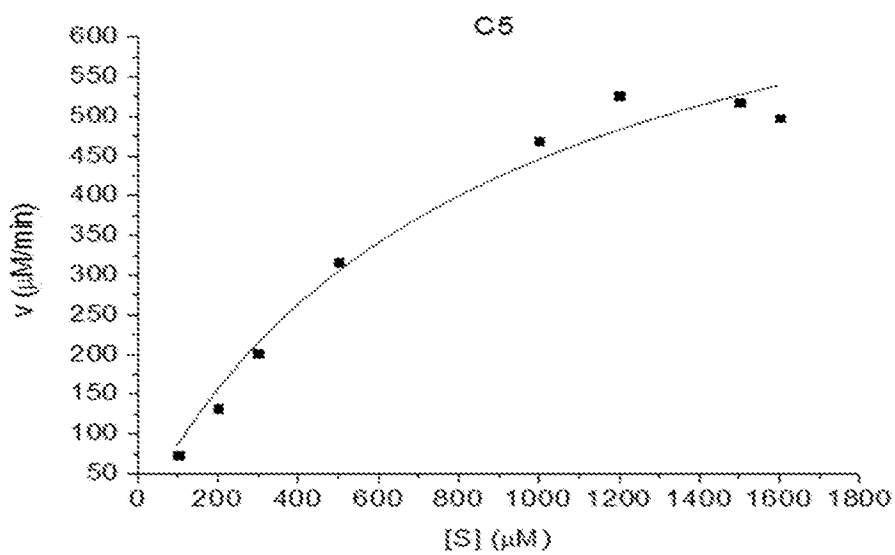
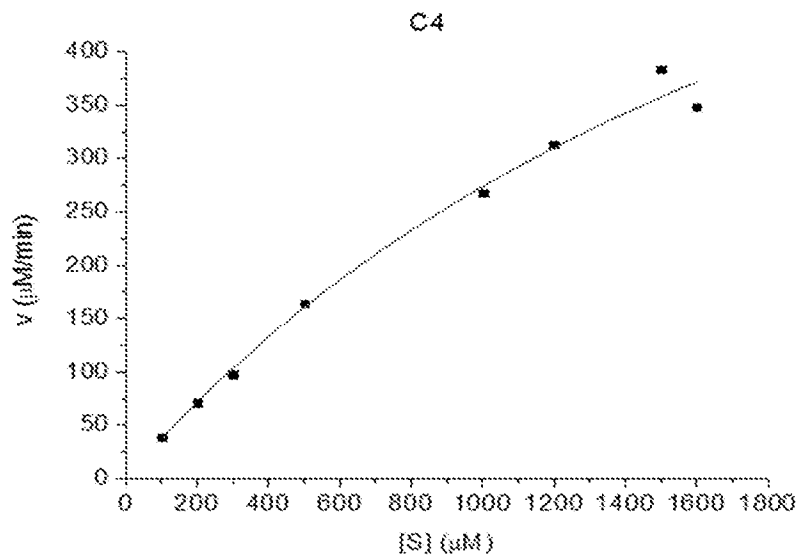
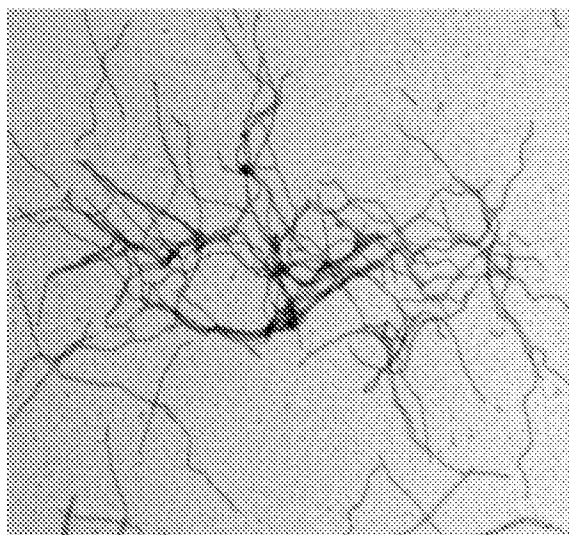


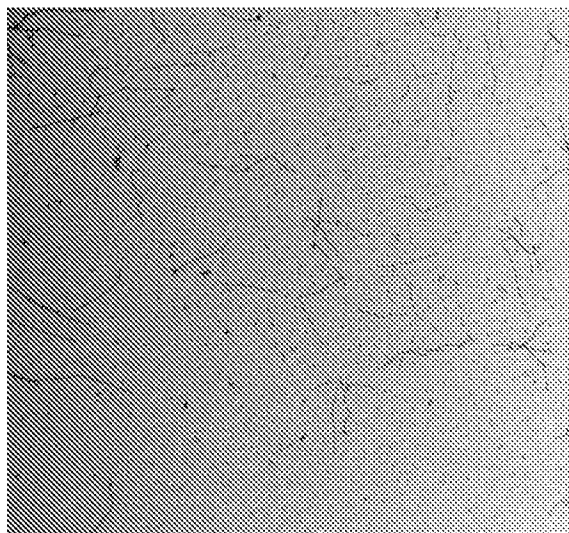
FIG. 5 (cont.)



A - x40K



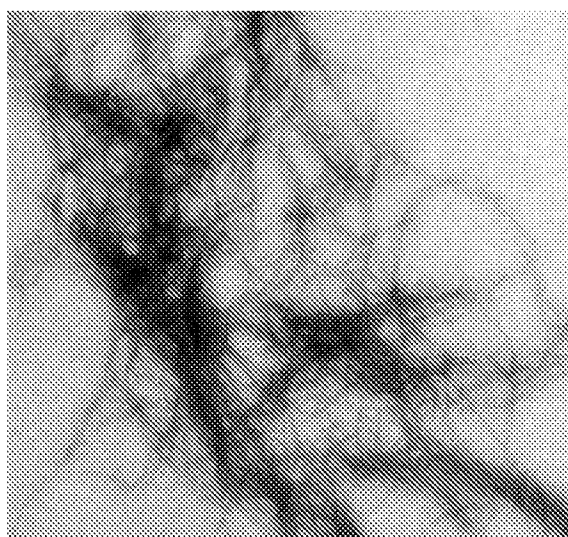
B - x40K



C - x15K



D - x50K



E - x40K

FIG. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070646

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N11/06 (2006.01)

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)

C12N

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)

EPODOC, INVENES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101113433 A (UNIV ZHEJIANG TECHNOLOGY UNIV ZHEJIANG TECHNOLOGY) 30/01/2008, (abstract) WPI [bases of datos in line] Derwent Publications LTD. [retrieved on 16.01.2014]. Retrieved of Epoque. Accession Number: 2009-A80585, the whole document.	1-6, 8-14, 16-47, 49-51
A		7,15,48
A	21/09/2012, ALJABALI ALAA A A et al. Controlled immobilisation of active enzymes on the cowpea mosaic virus capsid..Nanoscale England (2012), vol. 4 no: 18, págs: 5640 - 5645 , the whole the document.	1-51

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document 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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"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 documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17/01/2014

Date of mailing of the international search report
(22/01/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. Hernandez Cuellar

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498409

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070646

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	19/11/2007, TORRES et al. Acetylation of vitamin E by Candida antarctica lipase B immobilized on different carriers.Process Biochemistry, 20071119 Elsevier, NL 19/11/2007 VOL: 43 No: 2 Pags: 145 - 153 ISSN 1359-5113	1-51
A	STEINMETZ N F ET AL, "Potato virus X as a novel platform for potential biomedical applications" Nano Lett. (2010), vol.10, n° 1, pág. 305–312, the whole document.	1-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070646

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN101113433 A	30.01.2008	CN101113433B B	29.06.2011
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2013/070646

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD **C12N11/06** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	CN 101113433 A (UNIV ZHEJIANG TECHNOLOGY UNIV ZHEJIANG TECHNOLOGY) 30/01/2008, (resumen) WPI [bases de datos en línea] Derwent Publications LTD. [recuperado el 16.01.2014]. Recuperado de Epoque. Nº de acceso: 2009-A80585, todo el documento.	1-6, 8-14, 16-47, 49-51
A		7,15,48
A	21/09/2012, ALJABALI ALAA A A et al. Controlled immobilisation of active enzymes on the cowpea mosaic virus capsid..Nanoscale England (2012), vol. 4 no: 18, págs: 5640 - 5645 , todo el documento.	1-51

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
17/01/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
22 de enero de 2014 (22/01/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Hernandez Cuellar
Nº de teléfono 91 3498409

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070646

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	19/11/2007, TORRES et al. Acetylation of vitamin E by Candida antarctica lipase B immobilized on different carriers.Process Biochemistry, 20071119 Elsevier, NL 19/11/2007 VOL: 43 No: 2 Pags: 145 - 153 ISSN 1359-5113	1-51
A	STEINMETZ N F ET AL, "Potato virus X as a novel platform for potential biomedical applications" Nano Lett. (2010), vol.10, nº 1, pág. 305-312, todo el documento.	1-51

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2013/070646

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
CN101113433 A -----	30.01.2008 -----	CN101113433B B -----	29.06.2011 -----