

(11) Número de Publicação: **PT 2059587 E**

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

C12N 9/02 (2011.01) **C12N 1/20** (2011.01)
C12N 15/00 (2011.01) **C12Q 1/00** (2011.01)
C12Q 1/34 (2011.01) **C12Q 1/68** (2011.01)
C12P 21/06 (2011.01) **C12P 21/04** (2011.01)
A61K 38/44 (2011.01) **C07H 21/04** (2011.01)
C07K 1/00 (2011.01)

(22) Data de pedido: **2007.08.31**

(30) Prioridade(s): **2006.09.01 US 824402 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.05.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.01.04**
014/2012

(73) Titular(es):

VERENIUM CORPORATION
4955 DIRECTORS PLACE SAN DIEGO, CA 92121
US
BASF SE **DE**

(72) Inventor(es):

SYLKE HAREMZA, DR. **DE**
JANNE SAMULI KEROVUO **US**
OLIVER KOCH **DE**
TILO HABICHER **DE**
DAN ROBERTSON **US**

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **LACASES PARA BIO-BRANQUEAMENTO DE PASTA**

(57) Resumo:

AQUI SÃO FORNECIDAS ENZIMAS LACASES ISOLADAS E OS ÁCIDOS NUCLEICOS QUE AS CODIFICAM. TAMBÉM SÃO FORNECIDOS MEDIADORES PARA REAÇÕES DE LACASES. TAMBÉM FORNECIDOS AQUI SÃO MÉTODOS PARA A UTILIZAÇÃO DE LACASES PARA OXIDAR LIGNINAS E OUTROS COMPOSTOS FENÓLICOS E AROMÁTICOS, TAIS COMO PARA BIO-BRANQUEAMENTO E DESCOLORAÇÃO DE PASTA DE MADEIRA EM CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PH ELEVADOS, PARA FACILITAR UMA REDUÇÃO SUBSTANCIAL DA UTILIZAÇÃO DE QUÍMICOS DE BRANQUEAMENTO, ASSIM COMO PARA O TRATAMENTO DE FIBRAS.

RESUMO

"LACASES PARA BIO-BRANQUEAMENTO DE PASTA"

Aqui são fornecidas enzimas lacases isoladas e os ácidos nucleicos que as codificam. Também são fornecidos mediadores para reações de lacases. Também fornecidos aqui são métodos para a utilização de lacases para oxidar ligninas e outros compostos fenólicos e aromáticos, tais como para bio-branqueamento e descoloração de pasta de madeira em condições de temperatura e pH elevados, para facilitar uma redução substancial da utilização de químicos de branqueamento, assim como para o tratamento de fibras.

DESCRIÇÃO

"LACASES PARA BIO-BRANQUEAMENTO DE PASTA"

REFERÊNCIA CRUZADA COM DEPÓSITOS RELACIONADOS

Este depósito reclama prioridade em relação à U.S. Provisional Application 60/824,402, intitulado "LACCASES FOR PULP BIO-BLEACHING", submetido a 1 de setembro de 2006.

ACORDO ENTRES PARTE DE INVESTIGAÇÃO CONJUNTA

O assunto aqui divulgado é resultante de um acordo de investigação conjunta entre Verenium Corporation e BASF Aktiengesellschaft.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS, TABELAS OU LISTAGEM DE PROGRAMAS DE COMPUTADOR

O presente pedido é submetido juntamente com uma Listagem de Sequências em formato eletrônico. A Listagem de Sequências está disponível como ficheiro intitulado DIVERSA.014VPC.TXT, criado a 30 de agosto de 2007, o qual tem um tamanho de 15,7 KB. A informação em formato eletrônico da listagem de sequências está aqui incorporada como referência na sua totalidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da invenção

A invenção refere-se ao campo da bioquímica. Aqui são fornecidas enzimas lacases isoladas e os ácidos nucleicos que as codificam. Também são fornecidos mediadores para reações de lacases. Também fornecidos aqui são métodos para a utilização de lacases para oxidar ligninas e outros compostos fenólicos e aromáticos, tais como para bio-branqueamento e descoloração de pasta de madeira em condições de temperatura e pH elevados, para facilitar uma

redução substancial da utilização de químicos de branqueamento, assim como para o tratamento de fibras.

Descrição do estado da técnica relacionada

A fibra de madeira é uma estrutura multicamada consistindo, principalmente, em celulose, hemicelulose e lignina. A lignina é um polímero complexo insolúvel de compostos fenólicos. Até 90% da lignina é solubilizada e removida durante o processo de pastação. A lignina restante é a causa principal para a cor residual na pasta e tem de ser removida por degradação oxidativa ou branqueamento. O processo de branqueamento requer a aplicação de químicos agressivos e de condições que são de intensidade energética relevante. O uso de enzimas que auxiliam o processo de branqueamento pode permitir a redução do uso de químicos de branqueamento, aumentar a eficiência energética das fábricas de pasta e possuir benefícios ambientais, devido à redução das cadeias de desperdícios químicos.

Os fungos filamentosos são capazes de degradar eficientemente a lignina pela ação de várias classes de enzimas secretadas. Destas, as lacases atraíram um interesse considerável na aplicação de bio-branqueamento de pasta. As lacases são oxidases de multi-cobre que acoplam a oxidação direta de compostos aromáticos com a redução de oxigénio molecular a água. Durante a degradação da lignina, pensa-se que as lacases atuam em pequenos fragmentos de lignina fenólica, que então reagem com o polímero de lignina, resultando na sua degradação. Em alternativa, podem ser fornecidos compostos mediadores artificiais para acelerar o processo de degradação da lignina.

O processo de pastação da madeira pode envolver condições alcalinas. No entanto, as lacases mais conhecidas são

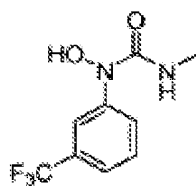
enzimas ácidas. Apenas foram descritas algumas lacases neutras ou alcalinas; uma lacase oriunda de *Rhus vernificera* tem um pH_{opt} 9 e uma lacase oriunda de *Melanocarpus albomyces* tem pH_{opt} neutro em substratos fenólicos. No entanto, estas duas lacases só são capazes de oxidar mediadores de potencial redox relativamente baixo que provavelmente não oxidam a lignina. As lacases também são suscetíveis de serem expostas a temperaturas relativamente elevadas na aplicação em bio-branqueamento da pasta. São desejáveis enzimas lacase que funcionem bem sob as temperaturas elevadas e condições de pH típicas de processos de pastação.

Hernandez et al em *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer, Berlim, Alemanha, volume 70, número 2, 1 de Março de 2006, páginas 212-221, descreve a produção, a caracterização parcial e o estudo da espectrometria de massa da atividade extracelular da lacase oriunda de *Fusarium proliferatum*. Ruijssenaars et al em *Applied Microbiology and Biotechnology*, Editora Springer, Berlim, Alemanha, volume 65, número 2, 24 de fevereiro de 2004, páginas 177-182, descreve uma oxidação multi-cobre de *Bacillus holodurans* clonada, a qual apresenta atividade da lacase alcalina. Sulistyaningdyah et al em *FEMS microbiology letters*, volume 230, número 2, 30 de janeiro de 2004, páginas 209-214, descreve a caracterização de atividade da lacase alcalina no sobrenadante da cultura de *Myrothecium verrucaria* 24G-4.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece um polipéptido isolado, contendo: uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 90%, 95%, 97%, 99% ou 100% de homologia com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO 4, em que o polipéptido isolado

referido contém atividade de lacase, oxida lignina sob condições de pH iguais ou superiores a um pH 8 e retém atividade da lacase por pelo menos mais de 5 minutos a temperaturas iguais ou superiores a 60°C, tem um pH de reação ótimo $\geq 8,0$ na oxidação da siringaldazina (SGZ) à temperatura ambiente e/ou tem um pH de reação ótimo de 8,0 na oxidação de

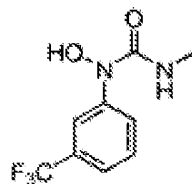


(Mediador 71) à temperatura ambiente.

Algumas formas de realização referem-se a variantes da SEQ ID NO: 4 que têm pelo menos uma substituição de um aminoácido, em que a posição de pelo menos uma substituição na SEQ ID NO: 4 é selecionada a partir do grupo constituído pelo resíduo de aminoácidos 162, 163, 164, 166, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 208, 210, 212, 213, 214, 215, 216, 218, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 351, 352, 353, 354, 452, 454, 470, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 540, 541, 542, 545, 546, 547, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 597, 598, 599, 603, 604, 605, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 616, 618, 619, e 620, ou qualquer combinação dos mesmos.

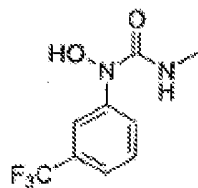
Em algumas formas de realização, as variantes polipeptídicas de lacase não possuem o péptido de sinalização associado, enquanto noutras formas de realização, os polipéptidos de lacase ou as variantes de polipéptidos de lacase incluem uma sequência de sinalização.

De acordo com outro aspeto, a invenção fornece um polinucleótido isolado, contendo: uma sequência com pelo menos 80%, 90%, 95%, 97%, 99% ou 100% de homologia com a sequência do polinucleótido SEQ ID NO: 3, em que o polinucleótido referido codifica um polipéptido contendo atividade de lacase, oxida lignina sob condições de pH iguais ou superiores a um pH 8 e retém atividade de lacase por pelo menos cerca de 5 minutos a temperaturas iguais ou superiores a 60°C, tem um pH de reação ótimo $\geq 8,0$ na oxidação da siringaldazina (SGZ) à temperatura ambiente e/ou tem um pH de reação ótimo de 8,0 na oxidação de



(Mediador 71) à temperatura ambiente.

Aqui também são fornecidos métodos para mediar a oxidação de um substrato fenólico ou aromático, tal como descrito na reivindicação 10. Em algumas formas de realização, o mediador é



Em algumas formas de realização, o substrato fenólico ou aromático é também colocado em contacto com um mediador selecionado a partir do grupo constituído por ácido violúrico; 2,6,6,-tetrametilpiperidina-1-ilóxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxiftalimida, 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina;

antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); e ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHB); ou qualquer combinação dos mesmos.

Aqui também são fornecidos métodos de deslignificação de uma composição contendo lignina, compreendendo o contato entre o substrato fenólico referido e o polipéptido isolado da reivindicação 1.

A invenção também fornece um método de oxidação de uma composição contendo uma fibra, compreendendo o contato entre a composição referida e o polipéptido isolado da reivindicação 1.

A invenção também fornece um método de branqueamento de uma composição contendo pasta de papel, compreendendo o contato entre a composição e o polipéptido isolado da reivindicação 1.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é um gráfico mostrando o consumo de oxigênio (nmol/mL) ao longo do tempo, indicador da oxidação do Mediador 71, a um pH 8 pela lacase *Trametes versicolor*, medido tal como descrito no Exemplo 5.

A Figura 2 é um gráfico mostrando o consumo de oxigênio (nmol/mL) ao longo do tempo, indicador da oxidação do Mediador 71, a um pH 8 pela lacase BD22449, medido tal como descrito no Exemplo 5.

A Figura 3 é um gráfico mostrando o consumo de oxigênio (nmol/mL) ao longo do tempo, indicador da oxidação do

Mediador 71, a um pH 8 pela lacase BD22865, medido tal como descrito no Exemplo 5.

A Figura 4 é um gráfico mostrando a atividade relativa da lacase *Trametes versicolor* (triângulos), da lacase BD22449 (diamantes) e da lacase BD22865 (quadrados), no Mediador 71, aos pHs indicados, à temperatura ambiente, medida tal como descrito no Exemplo 5.

As Figuras 5A-5C são gráficos mostrando a atividade residual da lacase *Trametes versicolor* (triângulos), da lacase BD22449 (diamantes) e da lacase BD22865 (quadrados), no 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6 sulfônico) (ABTS), após o tratamento durante os tempos indicados, a 50°C (Figura 5A), a 60°C (Figura 5B) e a 70°C (Figura 5C), medida tal como descrito no Exemplo 6.

A Figura 6 mostra a cinética da oxidação do Mediador 71 pela lacase BD22449 (quadrados) e pela lacase BD22865, a um pH 8, à temperatura ambiente, medida tal como descrito no Exemplo 7.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA FORMA DE REALIZAÇÃO PREFERIDA

Aqui são fornecidos lacases, polinucleótidos codificando estas enzimas, mediadores para reações de lacase ou outras reações de oxidação e métodos de utilização das lacases e dos mediadores.

As lacases catalisam a oxidação de compostos fenólicos ou outros compostos aromáticos com a redução concomitante de oxigénio a água (Malmström, B. G., "Early and more recent history in the research on multi-copper oxidases" em Multi-copper oxidases, ed Messerschmidt, A. (1997), World

Scientific, Singapura). Tal como é usado aqui, o termo "lacase" engloba qualquer polipéptido ou enzima com qualquer atividade de lacase, por exemplo, a oxidação e/ou despolimerização da lignina, e/ou a oxidação de 1-hidroxibenzotriazol (HBT), N-benzoíl-N-fenil hidroxilamina (BPHA), N-hidroxiftalimida, 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona, promazina, 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona, fenoxazina, antraquinona, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, fenotiazina, siringaldazina, antrona, antraceno, antrarufina, antrarobina, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS); dimetoxifenol (DMP), ácido ferúlico, catequina, epicatequina, ácido homovanílico (HMV), ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHB), 2,2,6,6,-tetrametilpiperidina-1-ilóxi (TEMPO), dimetoxifenol ou ácido dihidroxifumárico (DHF) ou compostos equivalentes.

Polipéptidos

Algumas formas de realização fornecem polipéptidos que possuem atividade de lacase, isto é, "polipéptidos de lacase" tais como polipéptidos que contêm polipéptidos da SEQ ID NO: 4, ou variantes destes, isto é, variantes da lacase. "Variante polipeptídica de lacase" significa um polipéptido ativo da lacase tal como definido anteriormente ou a seguir, possuindo pelo menos cerca de 80% de homologia com a sequência de aminoácidos em relação à extensão total de uma sequência polipeptídica de lacase, tal como é divulgada aqui (isto é, SEQ ID NO: 4, ou variantes desta) ou qualquer fragmento de um polipéptido de lacase tal como é divulgado aqui. Estas variantes polipeptídicas de lacase incluem, por exemplo, polipéptidos de lacase em que são adicionados, ou removidos, um ou mais resíduos de aminoácidos, na extremidade N- ou C- da extensão total da sequência de aminoácidos da lacase. Normalmente, uma

variante polipeptídica de lacase terá pelo menos cerca de 80% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 81% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 82% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 83% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 84% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 85% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 86% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 87% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 88% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 89% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 90% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 91% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 92% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 93% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 94% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 95% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 96% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 97% de homologia com a sequência de aminoácidos, em alternativa pelo menos cerca de 98% de homologia com a sequência de aminoácidos e em alternativa pelo menos cerca de 99% de homologia com a sequência de aminoácidos em relação à extensão total da sequência polipeptídica de lacase, tal como é aqui divulgada (por exemplo, SEQ ID NO: 4), ou qualquer outro fragmento especificamente definido de uma sequência

polipeptídica da lacase de extensão total, tal como é aqui divulgada. Normalmente, as variantes polipeptídicas da lacase têm uma extensão aproximada de pelo menos 10 aminoácidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 20 aminoácidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos pelo menos 30 aminoácidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 40 aminoácidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 50 aminoácidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 60 aminoácidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 70 aminoácidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 80 aminoácidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 90 aminoácidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 100 aminoácidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 150 aminoácidos, ou mais.

A "percentagem (%)" de homologia com a sequência de aminoácidos, relativamente às sequências polipeptídicas de lacase aqui identificadas, é definida como sendo a percentagem de resíduos de aminoácidos numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência polipeptídica da lacase específica, depois de alinhar as sequências e de preencher as interrupções, se necessário, de modo a atingir a percentagem máxima de homologia com a sequência, sem considerar qualquer substituição conservativa como parte de homologia com a sequência. O alinhamento com o fim de determinar a percentagem de homologia com a sequência de aminoácidos pode ser realizado de maneiras diversas, as quais estão abrangidas pelo estado da técnica, por exemplo, usando programas de computador disponíveis publicamente tais como os programas BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR).

Os peritos na técnica podem determinar os parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo qualquer algoritmo necessário para atingir o alinhamento máximo ao longo da extensão total das sequências comparadas. No entanto, para os presentes objetivos, os valores da % de homologia com a sequência de aminoácidos são gerados usando o programa de computador para a comparação de sequências ALIGN-2, em que o código base completo do programa de computador ALIGN-2 está disponível na forma aqui descrita. O programa de computador para a comparação de sequências ALIGN-2 é da autoria da Genentech, Inc. e o código base foi arquivado com a documentação do utilizador no U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, onde está registado sob U.S. Copyright Registration No. TXU510087. O programa ALIGN-2 está publicamente disponível através da Genentech, Inc., South San Francisco, Califórnia ou pode ser compilado a partir do código base fornecido abaixo na Tabela 1. O programa ALIGN-2 deve ser compilado para ser usado no sistema operativo UNIX, de preferência o Digital UNIX v4.0D. Todos os parâmetros de comparação das sequências são ajustados pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Nas situações em que o ALIGN-2 é utilizado para a comparação de sequências de aminoácidos, a % de homologia com a sequência de aminoácidos de uma dada sequência de aminoácidos A para, com ou contra uma dada sequência de aminoácidos B (a qual pode, em alternativa, pode ser redigida como uma dada sequência de aminoácidos A que tem ou inclui uma certa % de homologia com a sequência de aminoácidos para, com ou contra uma dada sequência de aminoácidos B) é calculada do seguinte modo:

100 vezes a fração X/Y

em que X é o número de resíduos de aminoácidos avaliados pelo programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 como pares idênticos no alinhamento de A e B efetuado por esse programa, e em que Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Será compreendido o fato de, nos casos em que a extensão da sequência de aminoácidos A não é igual à extensão da sequência de aminoácidos B, a % de homologia com a sequência de aminoácidos de A para B não igualar a % de homologia com a sequência de aminoácidos de B para A. Como exemplo de cálculos da % de homologia com a sequência de aminoácidos usando este método, é aqui demonstrado um método para calcular a % de homologia com a sequência de aminoácidos de uma sequência de aminoácidos denominada "proteína de comparação" com a sequência de aminoácidos denominada "lacase", em que a "lacase" representa uma sequência de aminoácidos de um polipéptido de lacase de interesse, a "proteína de comparação" representa uma sequência de aminoácidos de um polipéptido contra o qual o polipéptido de lacase de interesse é comparado, e "X", "Y" e "Z" representam cada um dos diferentes resíduos de aminoácidos hipotéticos.

A não ser que seja especificamente afirmado em contrário, todos os valores da % de homologia com a sequência de aminoácidos aqui usados são obtidos tal como é descrito no parágrafo imediatamente anterior, usando o programa de computador ALIGN-2. No entanto, os valores da % de homologia com a sequência de aminoácidos também podem ser obtidos tal como é abaixo descrito, pela utilização do programa de computador WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). A maior parte dos parâmetros de busca do WU-BLAST-2 são ajustados por defeito. Aqueles que não são ajustados por defeito, isto é,

os parâmetros ajustáveis, são ajustados com os seguintes valores: overlap span = 1, overlap fraction = 0,125, word threshold (T) = 11 e scoring matrix = BLOSUM62. Quando o WU-BLAST-2 é utilizado, um valor da % de homologia com a sequência de aminoácidos é determinado pela divisão de (a) número de pares idênticos de resíduos de aminoácidos entre a sequência de aminoácidos do polipéptido de lacase de interesse contendo uma sequência derivada a partir do polipéptido de lacase e a sequência de aminoácidos de interesse (isto é, a sequência contra a qual o polipéptido de lacase de interesse está a ser comparada, a qual pode ser uma variante polipeptídica de lacase), tal como determinado pelo WU-BLAST-2, por (b) pelo número total de resíduos de aminoácidos do polipéptido de lacase de interesse. Por exemplo, na afirmação um polipéptido contendo uma sequência de aminoácidos A, a qual tem ou tendo pelo menos 80% de homologia com a sequência de aminoácidos em relação sequência de aminoácidos B, a sequência de aminoácidos A é a sequência de aminoácidos comparativa de interesse e a sequência de aminoácidos B é a sequência de aminoácidos do polipéptido de lacase de interesse.

A percentagem de homologia com a sequência de aminoácidos também pode ser determinada pela utilização do programa para a comparação de sequências NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). O programa para a comparação de sequências NCBI-BLAST2 pode ser descarregado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ou obtido de outro modo a partir do National Institute of Health, Bethesda, MD. O NCBI-BLAST2 utiliza diversos parâmetros de busca, sendo que todos esses parâmetros de busca são ajustados por defeito, incluindo, por exemplo, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10,

minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0,01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 e scoring matrix = BLOSUM62.

Nas situações em que o NCBI-BLAST2 é utilizado para a comparação de sequências de aminoácidos, a % de homologia com a sequência de aminoácidos de uma dada sequência de aminoácidos A para, com ou contra uma dada sequência de aminoácidos B (a qual pode, em alternativa, ser redigida como uma dada sequência de aminoácidos A que tem ou inclui uma certa % de homologia com a sequência de aminoácidos para, com ou contra uma dada sequência de aminoácidos B) é calculada do seguinte modo:

100 vezes a fração X/Y

em que X é o número de resíduos de aminoácidos avaliados pelo programa de alinhamento de sequências NCBI-BLAST2 como pares idênticos no alinhamento de A e B efetuado por esse programa, e em que Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Será compreendido o fato de, nos casos em que a extensão da sequência de aminoácidos A não é igual à extensão da sequência de aminoácidos B, a % de homologia com a sequência de aminoácidos de A para B não igualar a % de homologia com a sequência de aminoácidos de B para A.

Opcionalmente, a variação é pela substituição de pelo menos um aminoácido por um outro aminoácido num ou mais domínios do polipéptido. Orientações para determinar qual o resíduo de aminoácido que pode ser inserido, substituído ou removido sem afetar de forma adversa a atividade desejada, podem ser encontradas pela comparação da sequência polipeptídica com aquela proveniente de moléculas de proteínas homólogas conhecidas, e pela minimização do

número de alterações na sequência de aminoácidos efetuadas em regiões de elevada homologia. Substituições de aminoácidos podem ser resultado da substituição de um aminoácido por um outro aminoácido contendo uma estrutura e/ou propriedades químicas semelhantes, tal como a substituição de uma leucina por uma serina, isto é, substituições conservativas de aminoácidos. Opcionalmente, inserções ou remoções podem situar-se num intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. As variações permitidas podem ser determinadas pela execução sistemática de inserções, remoções ou substituições de aminoácidos na sequência e testando as variantes obtidas relativamente à atividade exibida pela sequência com extensão total, ou pela sequência nativa processada.

Em formas de realização particulares, substituições conservativas de interesse são mostradas abaixo sob a designação de substituições preferidas. Se tais substituições resultarem numa alteração da atividade biológica, então são introduzidas alterações mais substanciais, mostradas abaixo como substituições exemplificativas, ou descritas mais adiante em referência a classes de aminoácidos, e os produtos são avaliados.

<u>Resíduo original</u>	<u>Substituições exemplares</u>	<u>Substituições preferidas</u>
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	Iys; gln; asn	Iys
Asn (N)	gln; his; Iys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; Iys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu

Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Formas de realização preferidas fornecem variantes de lacase da SEQ ID NO: 4 que têm uma ou mais substituições de aminoácidos, de tal modo que os resíduos nas posições 162, 163, 164, 166, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 208, 210, 212, 213, 214, 215, 216, 218, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 351, 352, 353, 354, 452, 454, 470, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 540, 541, 542, 545, 546, 547, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 597, 598, 599, 603, 604, 605, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 616, 618, 619, ou 620, ou qualquer combinação dos mesmos, na SEQ ID NO: 4, são alterados para qualquer outro aminoácido.

Em algumas formas de realização, as variantes da lacase não possuem sequências de sinalização. Por exemplo, são fornecidas variantes de lacase da SEQ ID NO: 4 que não possuem ou contêm a sua sequência de sinalização associada, ou péptido de sinalização. O péptido de sinalização associado para a SEQ ID NO: 4 foi identificado por tentativas como correspondendo aos resíduos 1-26. Observa-se, no entanto, que a fronteira da extremidade C- do péptido de sinalização pode variar, mas, na maioria dos casos, em não mais do que 5 aminoácidos em cada um dos

lados da fronteira da extremidade C- do péptido de sinalização tal como aqui identificado inicialmente, em que a fronteira da extremidade C- do péptido de sinalização pode ser identificada em conformidade com os critérios utilizados de forma rotineira na técnica de identificação deste tipo de elementos nas sequências de aminoácidos (por exemplo, Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) e von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Além disso, também é reconhecido o fato de, em alguns casos, a clivagem de uma sequência de sinal a partir de um polipéptido secretado não ser inteiramente uniforme, resultando em mais do que uma espécie secretada. Portanto, algumas formas de realização fornecem estes polipéptidos e os polinucleótidos que os codificam. Para os fins do presente pedido, o péptido de sinalização do polipéptido de lacase da SEQ ID NO: 4 estende-se desde o aminoácido 1 até X da SEQ ID NO: 4, em que X é qualquer aminoácido desde o 1 até ao 31 da SEQ ID NO: 4, e variantes deste. Formas processadas das variantes da SEQ ID NO: 4 aqui fornecidas são polipéptidos contendo os aminoácidos de X até 660 da SEQ ID NO: 4, em que X é qualquer aminoácido desde o 1 até ao 31 da SEQ ID NO: 4.

Em algumas formas de realização, as variantes polipeptídicas aqui fornecidos têm a atividade da lacase aumentada quando comparada com o tipo selvagem correspondente, por exemplo, SEQ ID NO: 4, sob condições especificadas. Em algumas formas de realização, as variantes polipeptídicas têm a atividade diminuída quando comparada com o tipo selvagem correspondente sob condições especificadas. Em algumas formas de realização, a atividade da variante da lacase é alterada de tal modo que exhibe atividade aumentada quando sujeita a um conjunto de condições, e atividade diminuída quando sujeita a outro

conjunto de condições. Exemplos não restritivos de atividades aqui fornecidas, as quais podem ser alteradas em variantes da lacase em comparação com o tipo selvagem correspondente, incluem o pH ótimo, estabilidade térmica, potencial redox e cinética enzimática. Por exemplo, em algumas formas de realização, as variantes da lacase exibem atividade aumentada com um pH 7, pH 8, pH 9, pH 10 ou superiores, ou qualquer número intermédio, em comparação com o tipo selvagem correspondente, por exemplo, a SEQ ID NO: 4. Em algumas formas de realização, a variante de lacase exibe estabilidade térmica em comparação com os tipos selvagens correspondentes, por exemplo, SEQ ID NO: 4. Em algumas formas de realização, a variante de lacase retém atividade por um período de tempo mais longo, por exemplo, 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 60 minutos ou mais, a temperaturas acima da temperatura ambiente, em comparação com os tipos selvagens correspondentes, por exemplo, a SEQ ID NO: 2 ou a SEQ ID NO: 4. Em algumas formas de realização, a variante de lacase exibe o potencial redox aumentado em comparação com o tipo selvagem correspondente, por exemplo, a SEQ ID NO: 4.

Em formas de realização preferidas, os polipéptidos de lacase e as variantes polipeptídicas de lacase aqui divulgados exibem uma atividade ótima com um pH alcalino, por exemplo, com aproximadamente pH 7,25, pH 7,5, pH 7,75, pH 8,0, pH 8,25, pH 8,5, pH 8,75, pH 9,0, pH 9,25, pH 9,5, pH 9,75, pH 10, pH 10,25, pH 10,5, pH 10,75, pH 11, pH 11,25, pH 11,5, ou superiores. Por exemplo, as lacases ou as variantes da lacase podem ter um pH alcalino ótimo para a oxidação de mediadores tais como os compostos da Fórmula I ou da Fórmula II, discutidos abaixo, ou qualquer outro mediador conhecido hoje em dia ou descoberto no futuro, por

exemplo, ácido violúrico; 2,6,6,-tetrametilpiperidina-1-ilóxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoíl-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxiftalimida, 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); e ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHB); ou afins. De preferência, as lacases ou as variantes da lacase podem oxidar mediadores com potencias redox mais elevados tais como o ácido violúrico, TEMPO, Mediador 71 (aqui descrito), ou mediadores com potenciais redox mais elevado, a um pH 8 ou superior.

De preferência, os polipéptidos de lacase e as variantes polipeptídicas de lacase são termicamente estáveis e mantêm a atividade a temperaturas superiores a 22°C, por exemplo acima de aproximadamente 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, ou superiores. Em algumas formas de realização, os polipéptidos de lacase mantêm a atividade da lacase durante pelo menos aproximadamente 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 35 minutos, 40 minutos, 45 minutos, 50 minutos, 60 minutos, 70 minutos, 80 minutos, 90 minutos, 100 minutos, ou mais, ou qualquer número intermédio, a temperaturas superiores a aproximadamente 22°C, por exemplo 65°C, 70°C, 80°C ou superiores.

Polinucleótidos

Aqui também são divulgados polinucleótidos da lacase. Tal como são aqui usados, os "polinucleótidos da lacase" referem-se a polinucleótidos que codificam polipéptidos de lacase. Por exemplo, polinucleótidos da lacase incluem polinucleótidos que incluem a sequência SEQ ID NO: 3, ou variantes ou fragmentos desta.

"Variante polinucleotídica de lacase" ou "variante da sequência de ácido nucleico de lacase" significa uma molécula de ácido nucleico, a qual codifica um polipéptido de lacase ativo, tal como é definido abaixo, e a qual tem pelo menos cerca de 80% de homologia com a sequência de ácido nucleico em relação a uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência polipeptídica de lacase de extensão total tal como é aqui divulgado, uma sequência polipeptídica de lacase de extensão total com carência de péptido de sinalização tal como é aqui divulgado, um domínio extracelular de um polipéptido de lacase, com ou sem péptido de sinalização, tal como é aqui divulgado ou qualquer outro fragmento de uma sequência polipeptídica de lacase de extensão total, tal como é aqui divulgado. Normalmente, uma variante polipeptídica de lacase terá pelo menos cerca de 80% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 81% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 82% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 83% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 84% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 85% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 86% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 87% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa

pelo menos cerca de 88% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 89% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 90% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 91% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 92% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 93% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 94% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 95% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 96% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 97% de homologia com a sequência de ácido nucleico, em alternativa pelo menos cerca de 98% de homologia com a sequência de ácido nucleico e em alternativa pelo menos cerca de 99% de homologia com a sequência de ácido nucleico com uma sequência de ácido nucleico que codifica a extensão total de uma sequência nativa da sequência polipeptídica da lacase, tal como é aqui divulgado, ou qualquer outro fragmento da extensão total de uma sequência polipeptídica da lacase, tal como é aqui divulgado.

Normalmente, as variantes polinucleotídicas de lacase têm uma extensão aproximada de pelo menos 30 nucleótidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 60 nucleótidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 90 nucleótidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 120 nucleótidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 150 nucleótidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 180 nucleótidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 210 nucleótidos, em alternativa uma extensão

aproximada de pelo menos 240 nucleótidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 270 nucleótidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 300 nucleótidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 450 nucleótidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 600 nucleótidos, em alternativa uma extensão aproximada de pelo menos 900 nucleótidos, ou mais.

A "percentagem (%) de homologia com a sequência de ácido nucleico" com respeito às sequências de ácido nucleico que codificam lacase aqui identificadas é definida como sendo a percentagem de nucleótidos numa sequência candidata que são idênticos aos nucleótidos na sequência de ácido nucleico da lacase de interesse, depois de alinhar as sequências e de preencher as interrupções, se necessário, de modo a atingir a percentagem máxima de homologia com a sequência. O alinhamento com o fim de determinar a percentagem de homologia com a sequência de ácido nucleico pode ser alcançado de maneiras diversas, as quais estão abrangidas pelo estado da técnica, por exemplo, usando programas de computador disponíveis publicamente tais como os programas BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). No entanto, para os presentes objetivos, os valores da % de homologia com a sequência de ácido nucleico são gerados usando o programa de computador para comparação de sequências ALIGN-2, em que o código base completo do programa de computador ALIGN-2 está disponível na forma aqui descrita. O programa de computador para a comparação de sequências ALIGN-2 é da autoria da Genentech, Inc. e o código base foi arquivado com a documentação do utilizador no U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, onde está registado sob U.S. Copyright Registration No. TXU510087. O programa ALIGN-2 está publicamente disponível através da Genentech, Inc.,

South San Francisco, Califórnia ou pode ser compilado a partir do código base fornecido abaixo na Tabela 1. O programa ALIGN-2 deve ser compilado para ser usado no sistema operativo UNIX, de preferência o Digital UNIX v4.0D. Todos os parâmetros de comparação das sequências são ajustados pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Nas situações em que o ALIGN-2 é utilizado para a comparação de sequências de ácido nucleico, a % de homologia com a sequência de ácido nucleico de uma dada sequência de ácido nucleico C para, com ou contra uma dada sequência de ácido nucleico D (a qual pode, em alternativa, ser redigida como uma dada sequência de ácido nucleico C que tem ou inclui uma certa % de homologia com a sequência de ácido nucleico para, com ou contra uma dada sequência de ácido nucleico D) é calculada do seguinte modo:

100 vezes a fração W/Z

em que W é o número de nucleótidos avaliados pelo programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 como pares idênticos no alinhamento de C e D efetuado por esse programa, e em que Z é o número total de nucleótidos em D. Será compreendido o fato de, nos casos em que a extensão da sequência de ácido nucleico C não é igual à extensão da sequência de ácido nucleico D, a % de homologia com a sequência de ácido nucleico de C para D não igualar a % de homologia com a sequência de ácido nucleico de D para C. Como exemplo de cálculos da % de homologia com a sequência de ácido nucleico, as Tabelas 4 e 5 demonstram como calcular a % de homologia com a sequência de ácido nucleico de uma sequência de ácido nucleico designada por "ADN de comparação" para a sequência de ácido nucleico designada por "ADN de lacase", em que "ADN de lacase" representa uma

sequência de ácido nucleico de interesse hipotética que codifica OspA, o "ADN de comparação" representa a sequência de nucleótido de uma molécula de ácido nucleico contra a qual a molécula de ácido nucleico "ADN de lacase" de interesse é comparada, e "N", "L" e "V" representam cada um diferentes nucleótidos hipotéticos.

A não ser que seja especificamente afirmado em contrário, todos os valores da % de homologia com a sequência de ácido nucleico aqui usados são obtidos tal como é descrito no parágrafo imediatamente anterior, usando o programa de computador ALIGN-2. No entanto, os valores da % de homologia com a sequência de ácido nucleico também podem ser obtidos tal como é abaixo descrito, pela utilização do programa de computador WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). A maior parte dos parâmetros de busca do WU-BLAST-2 são ajustados por defeito. Aqueles que não são ajustados por defeito, isto é, os parâmetros ajustáveis, são ajustados com os seguintes valores: overlap span = 1, overlap fraction = 0,125, word threshold (T) = 11 e scoring matrix = BLOSUM62. Quando o WU-BLAST-2 é utilizado, um valor da % de homologia com a sequência de ácido nucleico é determinado pela divisão de (a) número de pares idênticos de nucleótidos entre a sequência de ácido nucleico da molécula de ácido nucleico de interesse que codifica o polipéptido de lacase contendo uma sequência derivada a partir do ácido nucleico que codifica a sequência nativa do polipéptido de lacase e a molécula de ácido nucleico de comparação de interesse (isto é, a sequência contra a qual a molécula de ácido nucleico de interesse que codifica o polipéptido de lacase está a ser comparada, a qual pode ser uma variante polinucleotídica da lacase), tal como é determinado pelo WU-BLAST-2, por (b) pelo número total de nucleótidos da

molécula de ácido nucleico de interesse que codifica o polipéptido de lacase. Por exemplo, na afirmação "uma molécula isolada de ácido nucleico contendo uma sequência de ácido nucleico A, a qual tem ou tendo pelo menos 80% de homologia com a sequência de ácido nucleico em relação a sequência de ácido nucleico B, a sequência de ácido nucleico A é a molécula de ácido nucleico comparativa de interesse, e a sequência de ácido nucleico B é a sequência de ácido nucleico da molécula de ácido nucleico de interesse que codifica o polipéptido de lacase.

A percentagem de homologia com a sequência de ácido nucleico também pode ser determinada pela utilização do programa para comparação de sequências NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). O programa para a comparação de sequências NCBI-BLAST2 pode ser descarregado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ou obtido de outro modo a partir do National Institute of Health, Bethesda, MD. O NCBI-BLAST2 utiliza diversos parâmetros de busca, sendo que todos esses parâmetros de busca são ajustados por defeito, incluindo, por exemplo, `unmask = yes`, `strand = all`, `expected occurrences = 10`, `minimum low complexity length = 15/5`, `e-value multi-pass = 0,01`, `constant for multi-pass = 25`, `dropoff for final gapped alignment = 25` e `scoring matrix = BLOSUM62`.

Nas situações em que o NCBI-BLAST2 é utilizado para a comparação de sequências, a % de homologia com a sequência de ácido nucleico de uma dada sequência de ácido nucleico C para, com ou contra uma dada sequência de ácido nucleico D (a qual pode, em alternativa, ser redigida como uma dada sequência de ácido nucleico C que tem ou inclui uma certa % de homologia com a sequência de ácido nucleico para, com ou

contra uma dada sequência de ácido nucleico D) é calculada do seguinte modo:

100 vezes a fração W/Z

em que W é o número de nucleótidos avaliados pelo programa de alinhamento de sequências NCBI-BLAST2 como pares idênticos no alinhamento de C e D efetuado por esse programa, e em que Z é o número total de nucleótidos em D. Será compreendido o fato de, nos casos em que a extensão da sequência de ácido nucleico C não é igual à extensão da sequência de ácido nucleico D, a % de homologia com a sequência de ácido nucleico de C para D não igualar a % de homologia com a sequência de ácido nucleico de D para C.

Podem ser feitas variações na sequência dos polipéptidos aqui descritos, por exemplo, usando qualquer uma das técnicas e orientações para as mutações conservativas e não conservativas estabelecidas, por exemplo, em U.S. Patent No. 5,364,934. As variações podem consistir em substituição, remoção ou inserção de codões que codificam o polipéptido que resulta na alteração da sequência de aminoácidos do polipéptido, quando comparada com a sequência polipeptídica nativa.

Em outras formas de realização, as variantes polinucleotídicas da lacase são moléculas de ácido nucleico que codificam um polipéptido ativo da lacase e que são capazes de hibridizar, de preferência sob condições rigorosas de hibridização e lavagem, com sequências de ácido nucleotídico que codificam a extensão total do polipéptido de lacase, tal como é aqui divulgado. As variantes polipeptídicas de lacase podem ser aquelas que

são codificadas por uma variante polinucleotídica da lacase.

O "rigor" das reações de hibridização é facilmente determinado por um perito na especialidade, e é geralmente um cálculo empírico dependente do comprimento da amostra, da temperatura de lavagem e da concentração de sal. Em geral, as amostras mais longas requerem temperaturas mais elevadas para a renaturação apropriada, enquanto amostras mais curtas necessitam de temperaturas mais baixas. Geralmente, a hibridização depende da capacidade do ADN desnaturado em se ligar quando estão presentes cadeias complementares num ambiente abaixo das suas temperaturas de fusão. Quanto mais elevado for o grau de homologia entre a amostra e a sequência hibridizada, maior será a temperatura relativa que pode ser usada. Como resultado disso, segue-se que essas temperaturas relativas elevadas tenderiam a tornar as condições da reação mais rigorosas, enquanto as temperaturas mais baixas as tornariam menos. Para detalhes adicionais e explicação sobre o rigor das reações de hibridização, ver Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

As "condições rigorosas" ou as "condições muito rigorosas", tal como é aqui definido, podem ser identificadas como sendo aquelas que: (1) empregam uma força iônica baixa e temperatura de lavagem baixa, por exemplo 0,015 M de cloreto de sódio/0,0015 M de citrato de sódio/0,1% de dodecil sulfato de sódio a 50°C; (2) empregam durante a hibridização um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, formamida 50% (v/v) com 0,1% de albumina de soro bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/50 mM de tampão fosfato de sódio com um pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM de citrato de sódio a 42°C; ou (3)

empregam 50% de formamida, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sódio, 5 x solução de Denhardt, ADN de esperma de salmão sonificado (50 µg/mL), 0,1% de SDS e 10% de sulfato de dextrano a 42°C, com lavagens a 42°C em 0,2 x SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio) e 50% de formamida a 55°C, seguido de uma lavagem altamente rigorosa que consiste em 0,1 x SSC contendo EDTA a 55°C.

As "condições moderadamente rigorosas" podem ser identificadas tal como na descrição de Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nova Iorque: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluem o uso de soluções de lavagem e condições de hibridização (por exemplo, temperatura, força iónica e % SDS) menos rigorosas do que aquelas descrita anteriormente. Um exemplo de condições moderadamente rigorosas é a incubação durante a noite, a 37°C, numa solução contendo: 20% de formamida, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato trissódico), 50 mM fosfato de sódio (pH 7,6), 5 x solução de Denhardt, 10% sulfato de dextrano e 20 mg/mL de ADN de esperma de salmão desnaturado cortado, seguido pela lavagem dos filtros em 1 x SSC a cerca de 37-50°C. O perito na especialidade irá reconhecer o modo de ajustar, se necessário, a temperatura, a força iónica, etc., para adaptar os fatores como o comprimento da amostra e afins.

As variantes polinucleotídicas de lacase são geradas pela utilização que qualquer técnica conhecida pelo perito na especialidade, tais como a mutagénese de saturação, evolução direcionada otimizada, ou afins. O Gene Site Saturation Mutagenesis™, ou "GSSM™", inclui um método que usa primers de oligonucleótidos degenerados para introduzir pontos de mutação no polinucleótido, descrito em detalhe em

U.S. Patent 6,673,552. A evolução direcionada otimizada inclui um método para a remontagem de fragmentos de sequências relacionadas de ácido nucleico, por exemplo, genes relacionados e está descrito em detalhe em U.S. Patent No. 6,361,974 e em U.S. Patent Application Serial No. 09/332,835.

Quando é utilizado "isolado" para descrever os vários polipéptidos aqui divulgados, tal significa que o polipéptido foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Um ácido nucleico "isolado", tal como um ácido nucleico isolado que codifica polipéptidos de lacase ou outro ácido nucleico que codifica polipéptidos, é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada a partir de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante, com a qual é normalmente associada na fonte natural do ácido nucleico que codifica os polipéptidos. Uma molécula isolada de ácido nucleico que codifica polipéptidos é diferente na forma e na configuração em relação àquelas que se encontram na natureza. Por isso, as moléculas isoladas de ácido nucleico que codificam polipéptidos distinguem-se daquelas moléculas específicas de ácido nucleico que codificam polipéptidos que existem nas células naturais. No entanto, uma molécula isolada de ácido nucleico que codifica polipéptidos incluem moléculas de ácido nucleico que codificam polipéptidos, contidas em células que normalmente expressam o polipéptido onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico se encontra numa localização cromossômica diferente daquela relativa às células naturais.

Vetores e células hospedeiras

Os ácidos nucleicos aqui divulgados também podem ser fornecidos em vetores de expressão e veículos de clonagem.

Os vetores de expressão e os veículos de clonagem podem compreender partículas virais, baculovírus, fagos, plasmídeos, fagemídeos, cosmídeos, fosmídeos, cromossomas bacterianos artificiais, ADN viral (por exemplo, vaccinia, adenovírus, vírus da varíola aviária, pseudo-raiva e derivados de SV40), cromossomas artificiais à base de Pl, plasmídeos de levedura, cromossomos de leveduras artificiais, e quaisquer outros vetores específicos para hospedeiros específicos de interesse (tais como Bacillus, Aspergillus e leveduras). Os vetores podem incluir sequências cromossômicas, não cromossômicas e de ADN sintético. São conhecidos pelo perito na especialidade um grande número de vetores apropriados e disponíveis comercialmente. Exemplos de vetores incluem: bacterianos: vetores pQE (Qiagen), plasmídeos pBluescript, vetores pNH, (vetores lambda-ZAP (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); eucarióticos: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). No entanto, qualquer outro plasmídeo ou outro vetor pode ser usado desde que seja replicável e compatível com o hospedeiro. Podem ser utilizados nas formas de realização aqui descritas vetores replicáveis poucas vezes ou replicáveis muitas vezes. O vetor de expressão pode conter um promotor, um local de ligação ribossômica para iniciação da translação e um finalizador da transcrição. O vetor também pode incluir sequências apropriadas para amplificar a expressão. Os vetores de expressão de mamíferos pode conter uma origem da replicação, quaisquer locais de ligação ribossômica, um local de poliadenilação, locais de dadores e aceitadores de splicing, sequências de finalização da transcrição e sequências não transcritas de flanqueamento 5'. Em alguns aspetos, as sequências de ADN derivadas a partir da ligação de SV40 e de locais de poliadenilação podem ser usadas para fornecer os elementos

genéticos não transcritos requeridos. Num aspeto, os vetores de expressão contêm um ou mais marcadores genéticos selecionáveis para permitir a seleção das células hospedeiras contendo o vetor. Tais marcadores selecionáveis incluem genes que codificam dihidrofolato redutase ou genes de resistência a neomicina para cultura de células eucarióticas, genes conferindo resistência a tetraciclina ou ampicilina em *E. coli*, e o gene *S. cerevisiae* TRP1. As regiões promotoras podem ser selecionadas a partir de qualquer gene desejado, usando vetores cloranfenicol transferase (CAT) ou outros vetores com marcadores de seleção. Os vetores para a expressão de polipéptidos ou fragmentos destes em células eucarióticas também podem conter intensificadores para aumentar os níveis de expressão. Exemplos incluem o intensificador SV40 na origem da replicação bp 100 a 270, o intensificador da zona inicial do promotor de citomegalovírus, o intensificador Polyoma da origem da replicação e os intensificadores de adenovírus.

As sequências de ácido nucleico aqui divulgadas podem ser inseridas num vetor através de uma diversidade de processos. Em geral, a sequência pode ser ligada na posição desejada no vetor, seguida de digestão do incerto e do vetor com as endonucleases de restrição apropriadas. Em alternativa, as extremidades blunt, tanto do enxerto quanto do vetor podem, ser ligadas. É conhecida pelo estado da técnica uma variedade de técnicas de clonagem, por exemplo, tal como é descrito em Ausubel e Sambrook. Tais procedimentos e outros são considerados como estando dentro da competência daqueles que são peritos na especialidade. O vetor pode estar na forma de um plasmídeo, de uma partícula viral ou de um fago. Outros vetores possuem sequências de ADN cromossómico, não cromossómico e sintético, derivados

de SV40; plasmídeos bacterianos, ADN de fago, baculovírus, plasmídeos de levedura, vetores derivados de combinações de ADN de fago e plasmídeos, ADN viral tal como vaccinia, adenovírus, vírus da varíola aviária, pseudorraivas. Uma variedade de vetores de clonagem e de expressão para a utilização com hospedeiros procarióticos e eucarióticos estão descritos em, por exemplo, Sambrook. Qualquer vetor pode ser usado desde que seja replicável e compatível com a célula hospedeira. Os vetores bacterianos particulares que podem ser utilizados incluem os plasmídeos disponíveis comercialmente contendo elementos genéticos do bem conhecido vetor de clonagem pBR322 (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia), GEMI (Promega Biotec, Madison, WI, USA) ρQE70, ρQE60, ρQE-9 (Qiagen), pD10, ρsiX174 pBluescript II KS, ρNH8A, ρNH10A, ρNH18A, ρNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, DR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 e pCM7. Vetores eucarióticos particulares incluem pSV2CAT, ρOG44, pXT1, pSG (Stratagene) ρSVK3, pBPV, pMSG, e pSVL (Pharmacia). Vários vetores de expressão fúngica são conhecidos pelos peritos na especialidade e úteis para as formas de realização aqui descritas, por exemplo, aqueles descritos em Campbell et al. Fungal Genetics Newsl. 36:79-81. No entanto, qualquer vetor pode ser usado desde que seja replicável e compatível com a célula hospedeira.

Os ácidos nucleicos aqui divulgados podem ser expressos em cassetes de expressão, vetores ou vírus e expressos de modo transiente ou estável em células de plantas e sementes. Um sistema de expressão transitória exemplificativo utiliza sistemas de expressão episomal, por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), ARN vírico gerado no núcleo por transcrição de um mini-cromossoma episomal contendo ADN super-enrolado, ver, por exemplo, Covey (1990) Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 87:1633-1637. Em alternativa, sequências de codificação, isto é, a totalidade ou os fragmentos de sequências de ácidos nucleicos aqui divulgadas podem ser inseridos no genoma de uma célula hospedeira de uma planta tornando-se uma parte integrante do ADN cromossômico hospedeiro. Os transcritos sense ou antisense podem ser expressos desta maneira.

Um vetor contendo as sequências (por exemplo, promotores ou regiões codificadoras) a partir dos ácidos nucleicos aqui divulgados pode conter um gene marcador que confere um fenótipo selecionável a uma célula de uma planta ou a uma semente. Por exemplo, o marcador pode codificar a resistência a biocidas, em particular resistência antibiótica, tal como a resistência à canamicina, G418, bleomicina, higromicina, ou resistência a herbicidas, tal como a resistência ao clorosulfurano ou Basta. Os vetores de expressão capazes de expressar ácidos nucleicos e proteínas em plantas são bem conhecidos do estado da técnica e podem incluir, por exemplo, vetores provenientes de *Agrobacterium* spp., vírus da batata X (ver, por exemplo, Angell (1997) EMBO J. 16:3675-3684), vírus do mosaico do tabaco (ver, por exemplo, Casper (1996) Gene 173:69-73), vírus bushy stunt do tomate (ver, por exemplo, Hillman (1989) Virology 169:42-50) do vírus etch do tabaco (ver, por exemplo, Dolja (1997) Virology 234:243-252), vírus do mosaico dourado do feijão (ver, por exemplo, Morinaga (1993) Microbiol Immunol. 37:471-476), vírus do mosaico da couve-flor (ver, por exemplo, Cecchini (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:1094-1101), elementos transponíveis Ac/Ds do milho (ver, por exemplo, Rubin (1997) Mol. Cell Biol. 17:6294-6302; Kunze (1996) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204:161-194), e o elemento transponível supressor-modificador (Spm) do milho (ver, por exemplo, Schlappi

(1996) *Plant Mol. Biol.* 32:717-725); e os seus derivados. Em algumas formas de realização, o vetor de expressão pode ter dois sistemas de replicação para lhe permitir ser mantido em dois organismos, por exemplo, em células de mamíferos ou de insetos para expressão, e num hospedeiro procariótico para clonagem e amplificação. Além disso, para a integração de vetores de expressão, o vetor de expressão pode conter pelo menos uma sequência homóloga ao genoma da célula hospedeira. Ele pode conter duas sequências homólogas que flanqueiam a sequência para expressão. O vetor integrado pode ser dirigido a um local específico na célula hospedeira através da seleção da sequência homóloga apropriada para a inclusão no vetor. As construções para integrar vetores são bem conhecidas do estado da técnica.

Os vetores de expressão aqui divulgados podem também incluir um marcador genético selecionável para permitir a seleção de estirpes bacterianas que tenham sido transformadas, por exemplo, genes que tornam as bactérias resistentes a drogas como a ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina, neomicina e tetraciclina. Os marcadores selecionáveis também podem incluir genes biossintéticos, tais como aqueles existentes nas vias biossintéticas da histidina, triptofano e leucina. Os termos "vetor" e "cassete de expressão" tal como são usados aqui podem ser aplicados indiferentemente e referem-se a uma sequência de nucleótidos, a qual é capaz de afetar a expressão de um ácido nucleico, por exemplo, um ácido nucleico mutado de acordo com a invenção. As cassetes de expressão podem incluir pelo menos um promotor operacionalmente ligado com a sequência que codifica o polipéptido; e, opcionalmente, com outras sequências, por exemplo, sinais de finalização de transcrição. Também podem ser usados fatores adicionais necessários ou auxiliares

para efetuar expressão, por exemplo, intensificadores. "Operacionalmente ligado", tal como é aqui usado, refere-se à ligação de um promotor a montante da sequência de ADN tal que o promotor medeia a transcrição da sequência de ADN. Assim, as cassetes de expressão também podem incluir plasmídeos, vetores de expressão, vírus recombinantes, qualquer forma de recombinação do vetor de "ADN nu", e afins. Um "vetor" contém um ácido nucleico que pode infectar, transfectar, transduzir de forma transiente ou permanentemente uma célula. Será reconhecido que um vetor pode ser um ácido nucleico nu ou um ácido nucleico complexo com proteína ou lípido. O vetor contém opcionalmente ácidos nucleicos virais ou bacterianos e/ou proteínas e/ou membranas (por exemplo, uma membrana celular, envelope lipídico viral, etc.). Os vetores incluem, mas não estão limitados a replicões (por exemplo, replicões de RNA, bacteriófagos) aos quais podem ser anexados fragmentos de ADN e serem replicados. Assim, os vetores incluem, mas não estão limitados a ADN ou ARN autónomo autorreplicante, circular ou linear (por exemplo, plasmídeos, vírus e afins, ver, por exemplo, U.S. Patent No. 5,217,879), e incluem ambos os plasmídeos de expressão e não expressão.

A sequência de ADN apropriada pode ser inserida no vetor através de uma diversidade de processos. Em geral, a sequência de ADN é ligada na posição desejada no vetor, seguida da digestão do inserto e do vetor com as endonucleases de restrição apropriadas. Em alternativa, as extremidades blunt, tanto do enxerto quanto do vetor, podem ser ligadas. Uma variedade de técnicas de clonagem é divulgada em Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley 503 Sons, Inc. 1997 e Sambrook et al., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Tais procedimentos e outros

são considerados como estando dentro da competência daqueles que são peritos na especialidade. O vetor pode estar, por exemplo, na forma de um plasmídeo, de uma partícula viral ou de um fago. Outros vetores possuem sequências de ADN cromossômico, não cromossômico e sintético, derivados de SV40; plasmídeos bacterianos, ADN de fago, baculovírus, plasmídeos de levedura, vetores derivados de combinações de ADN de fago e de plasmídeos, ADN viral tal como vaccinia, adenovírus, vírus da varíola aviária, pseudorraivas. Uma variedade de vetores de clonagem e de expressão para a utilização com hospedeiros procarióticos e eucarióticos estão descritos em Sambrook et al, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

As células transformadas que contêm uma sequência de ácido nucleico das formas de realização aqui descritas, por exemplo, uma sequência que codifica um polipéptido de lacase ou uma variante aqui descrita, ou uma cassete de expressão, por exemplo, um vetor aqui descrito, também podem ser produzidas. A célula hospedeira pode ser qualquer uma das células hospedeiras familiares àqueles que são peritos na técnica, incluindo células procarióticas, células eucarióticas, tais como as células de bactérias, células de fungos, células de levedura, células de mamíferos, células de insetos ou células de plantas. Células de bactérias exemplificativas incluem *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* ou qualquer espécie dentro do género *Bacillus*, *Streptomyces* e *Staphylococcus*. Células de insetos exemplificativas incluem *Drosophila S2* e *Spodoptera Sf9*. Células de levedura exemplificativas incluem *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*. De preferência, a célula

hospedeira é uma célula de fungo. Células de fungos exemplificativas incluem espécies de *Aspergillus*, por exemplo, *A. niger*, espécies de *Neurospora*, por exemplo, *N. crassa* e afins. Células animais exemplificativas incluem CHO, COS e melanoma de Bowes ou qualquer linha celular de ratos ou humanos. A seleção de um hospedeiro apropriado está dentro da competência daqueles que são peritos na especialidade. As técnicas para transformar uma ampla variedade de espécies de plantas superiores são bem conhecidas e descritas na literatura técnica e científica. Ver, por exemplo, Weising (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477, U.S. Patent No. 5,750,870. O vetor pode ser introduzido dentro da célula hospedeira usando qualquer uma de diversas técnicas, incluindo transformação, transfecção, transdução, infecção viral, "gene guns" ou transferência genética mediada por Ti. Métodos particulares incluem a transfecção por fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-Dextran, lipofecção ou eletroporação (Davis, L., Dibner, M., Battey, L, *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986)). Num aspeto, os ácidos nucleicos ou vetores de acordo com a invenção são introduzidos dentro das células para avaliação, assim, os ácidos nucleicos entram nas células de um modo adequado para a subsequente expressão do ácido nucleico. O método de introdução é em grande parte ditado pelo tipo de célula alvo. Métodos exemplificativos incluem a precipitação de CaPO_4 , fusão de lipossomas, lipofecção (por exemplo, LIPOFECTINTM), eletroporação, infecção viral, etc. Os ácidos nucleicos candidatos podem ser integrados de modo estável no genoma da célula hospedeira (por exemplo, com introdução retroviral) ou podem existir transitoriamente ou estavelmente no citoplasma (por exemplo, por intermédio do uso de plasmídeos tradicionais, utilizando sequências de regulação, marcadores de seleção, etc.).

As moléculas de ADN exógenas em células hospedeiras podem ser usadas de modo convencional para produzir o produto genético codificado pela sequência recombinante. Dependendo do hospedeiro utilizado no processo de produção recombinante, os polipéptidos produzidos pelas células hospedeiras contendo o vetor, podem ser glicosilados ou ser não glicosilados. Os polipéptidos de acordo com a invenção podem, ou não, incluir também um resíduo de aminoácido metionina inicial. Também pode ser utilizado um sistema de translação livre de células para produzir um polipéptido de acordo com a invenção. Os sistemas de translação livre de células podem usar ARNm transcrito a partir de uma molécula de ADN exógena contendo um promotor operacionalmente ligado com um ácido nucleico que codifica o polipéptido ou fragmentos deste, em alguns aspectos, a construção de ADN pode ser linearizada com o objetivo de conduzir a uma reação de transcrição *in vitro*. O ARNm transcrito é então incubado com um extrato de translação apropriado livre de células, tal como um extrato de reticulócitos de coelho, para produzir o polipéptido desejado ou fragmentos deste. Os vetores de expressão podem conter um ou mais marcadores genéticos selecionáveis para fornecer um traço fenotípico à seleção de células hospedeiras transformadas, tais como resistência a dihidrofolato redutase ou a neomicina em cultura de célula eucariótica, ou tais como resistência a tetraciclina ou a ampicilina em *E. coli*. As células hospedeiras contendo os polinucleótidos de interesse, por exemplo, ácidos nucleicos de acordo com a invenção, podem ser cultivadas em meios nutritivos convencionais, modificados de modo apropriado para ativar os promotores, selecionar os transformadores e amplificar os genes. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e afins, são aquelas utilizadas anteriormente com as células

hospedeiras selecionadas para a expressão, sendo evidentes para o perito na especialidade.

Também são fornecidos métodos para a sobre-expressão de polipéptidos recombinantes de lacase numa célula, compreendendo um vetor contendo um ácido nucleico aqui divulgado, por exemplo, um ácido nucleico contendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos cerca de 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de homologia com a sequência SEQ ID NO: 3, sobre uma região de pelo menos cerca de 100 resíduos ou mais, tal como é descrito anteriormente.

A expressão ou a sobre-expressão dos polipéptidos de lacase podem ser efetuados por qualquer meio, por exemplo, uso de um promotor de elevada atividade, um vetor bicistrónico ou pela amplificação genética do vetor. Os polipéptidos codificados pelos ácidos nucleicos aqui divulgados podem ser expressos, ou sobre-expressos, em qualquer sistema de expressão *in vitro* ou *in vivo*. Qualquer sistema de cultura celular pode ser aplicado para expressar, ou sobre-expressar proteína recombinante, incluindo culturas bacterianas, de insetos, de leveduras, fúngicas e de mamíferos. A sobre-expressão pode ser efetuada pela escolha apropriada de promotores, intensificadores, vetores (por exemplo, uso de vetores replicação, vetores bicistrónicos (ver, por exemplo, Gurtu (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229:295-8), meios, sistemas de culturas e afins. Num aspeto, é usada amplificação genética usando marcadores de seleção, por exemplo, glutamina sintetase (ver, por exemplo, Sanders (1987) *Dev. Biol. Stand.* 66:55-63), em

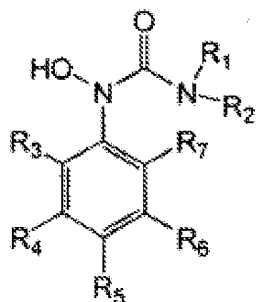
sistemas celulares para sobre-expressar os polipéptidos de acordo com a invenção.

Mediadores

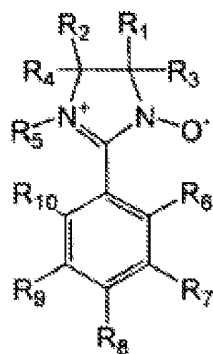
Em alguns casos, a função da lacase para oxidar substratos, para produzir um radical estabilizado que possa subtrair um hidrogênio a partir de outra molécula orgânica, é tal que o substrato inicial torna ao estado base. Nesse caso, o substrato inicial é referido como mediador e o produto final da reação é a forma oxidada do segundo composto orgânico, por exemplo, oxidação da lignina. Portanto, tal com é aqui usado, o termo "mediador" refere-se a qualquer composto que pode ser oxidado por uma lacase e que por sua vez oxida um outro substrato orgânico.

Alguns mediadores úteis para as formas de realização aqui descritas são conhecidos por aqueles que são peritos na especialidade. Exemplos não restritivos de mediadores são ácido violúrico; 2,6,6,-tetrametilpiperidina-1-ilóxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoíl-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxiftalimida, 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); e ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHB). No entanto, será compreendido o fato de os mediadores descobertos no futuro serem também úteis para as formas de realização aqui descritas.

Algumas formas de realização fornecem os seguintes mediadores capazes de mediar reações da lacase, tal como os compostos da Fórmula I e da Fórmula II:

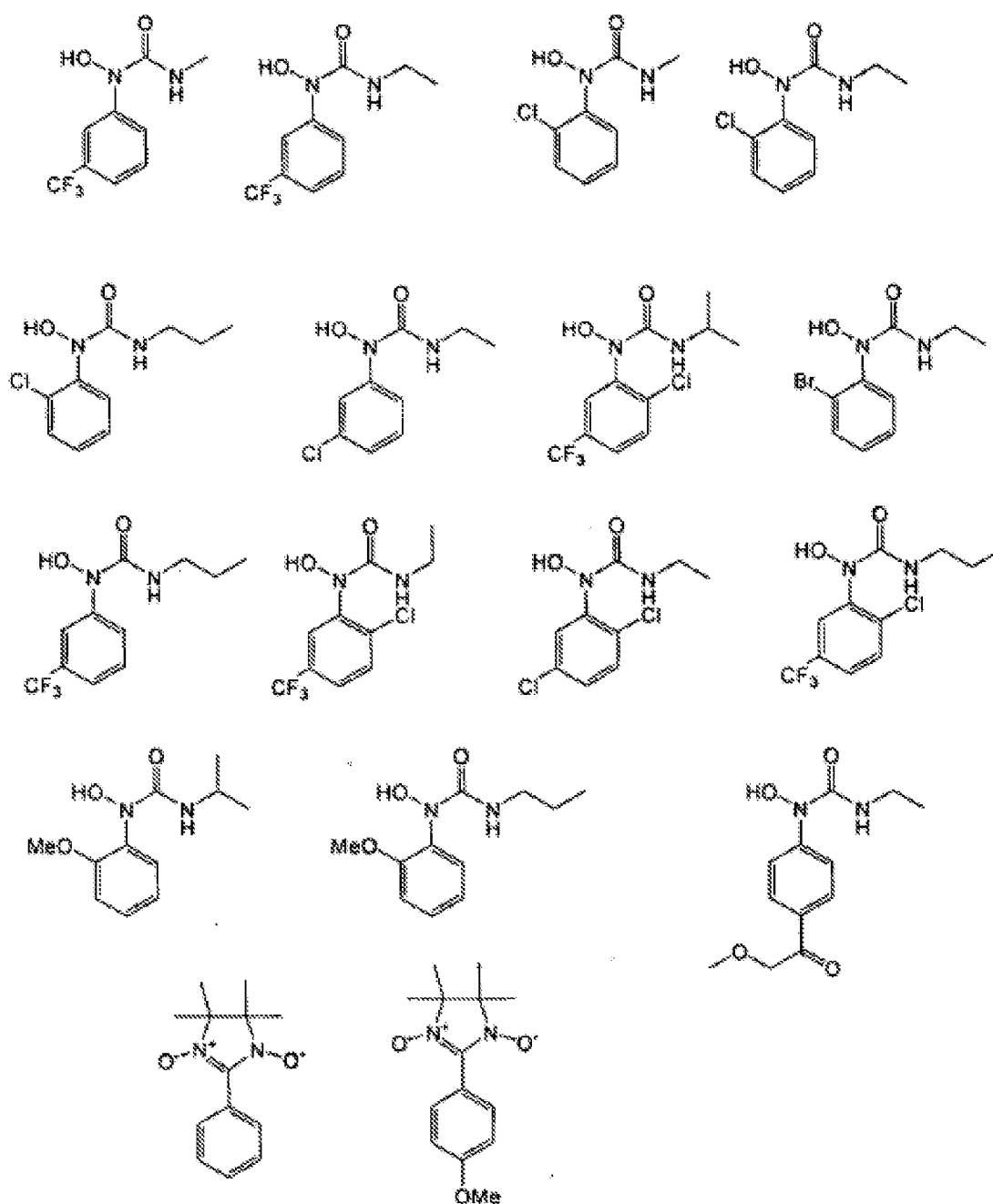


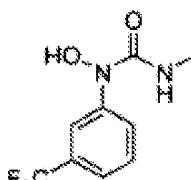
(Fórmula I), em que R_1 a R_7 são selecionados independentemente a partir do grupo constituído por H, CH_3 , CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, CH_3 , alquilo, arilo, heterilo, fenilo, CF_3 , $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, $\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$, CH_2CH_3 , $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $\text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5$, $\text{C}(\text{O})\text{OC}_3\text{H}_7$, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$, COOH , OCH_3 , OH , OCF_3 , NH_2 , $\text{NH}(\text{CH}_3)$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, CH_2NH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, Br e Cl.



(Fórmula II), em que R_1 a R_7 são selecionados independentemente a partir do grupo constituído por H, CH_3 , CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, CH_3 , alquilo, arilo, fenilo, CF_3 , $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, $\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$, CH_2CH_3 , $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, COOH , OCH_3 , OH , O^- , OCF_3 , NH_2 , $\text{NH}(\text{CH}_3)$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, CH_2NH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, Br e Cl.

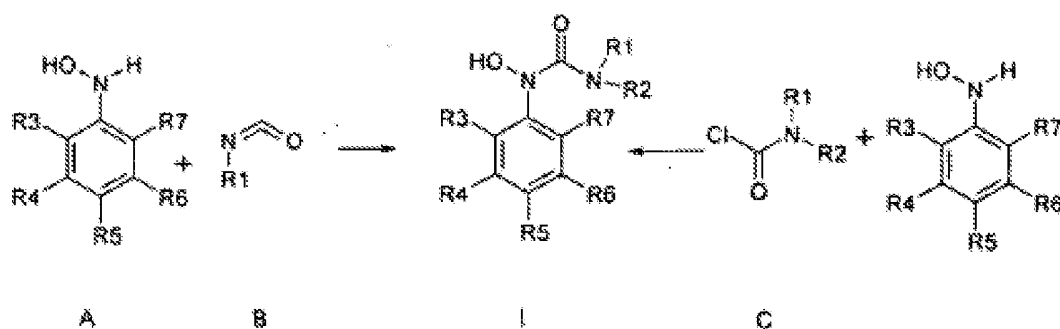
Os mediadores preferidos incluem os seguintes:



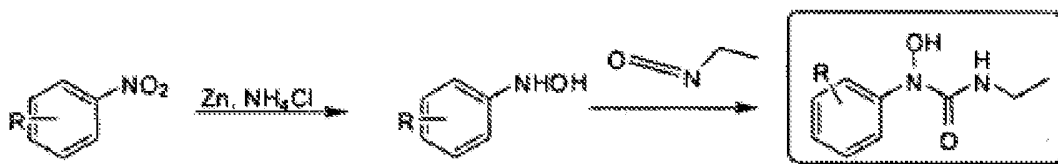
Mais preferencialmente,  (Mediador 71).

Os mediadores aqui divulgados podem ser sintetizados a partir de materiais de partida disponíveis comercialmente,

usando técnicas rotineiras de síntese química. Por exemplo, os mediadores da Fórmula I podem ser sintetizados partindo de hidroxilaminas da Fórmula A, através da reação com um isocianato da Fórmula B ou um cloreto de ácido carbâmico da Fórmula C, para proporcionar as ureias hidroxila da Fórmula I, seguindo os procedimentos conhecidos (por exemplo, Crumbliss, J. Org. Chem. 1982(47) 1171; Tandon, J. Chem. Eng. Data. 1967(12) 143).



Exemplo 1



I. PREPARAÇÃO DE N-(2-CLOROFENIL)HIDROXILAMINA:

Uma suspensão de 2-cloronitrobenzeno (50 g, 0,318 mol) e cloreto de amônio (16,9 g, 0,318 mmol) em 636 mL de água foi aquecida a 65°C. À mistura foi adicionado zinco em porções (60 g, 0,955 mol) durante 20 minutos, e a temperatura foi mantida a 70°C~75°C. Depois de agitar durante 10 minutos, TLC mostrou que a reação estava completa. A mistura foi filtrada e lavada com água (~70°C). Ao filtrado foi adicionado NaCl e arrefecido para -10°C. Depois de 1 hora, a mistura foi filtrada e lavada com petróleo, e depois seca para produzir a hidroxilamina desejada, na forma de um sólido branco (35 g, 76,9%), o

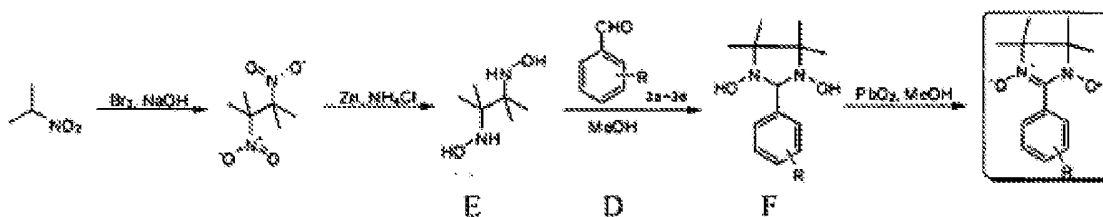
qual foi usado sem purificação no passo seguinte. $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, DMSO): δ 8,36 (s, 2 H), 7,16 (m, 2 H), 6,79 (m, 2 H).

II. PREPARAÇÃO DE 1-(2-CLOROFENIL)-3-ETIL-1-HIDROXIUREIA:

A uma solução de hidroxilamina (35 g, 0,244 mol) em 1000 mL de CHCl_3 foi adicionado composto isocianato de etilo (17,3 g, 0,244 mol), gota a gota, a -10°C . Depois da adição, TLC mostrou que a reação estava completa. A solução foi concentrada e cristalizada para a hidroxilureia desejada, na forma de um sólido branco. $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, DMSO): δ 10,12 (s, 1 H), 7,55 (m, 2 H), 7,29 (m, 2 H), 3,27 (q, 2 H), 1,04 (t, 3 H).

A preparação de 1-(3-trifluórometilfenil)-3-etil-1-hidroxilureia seguiu o mesmo procedimento. $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, DMSO): δ 10,40 (s, 1 H), 7,91 (s, 1 H), 7,78 (m, 1 H), 7,46 (m, 2 H), 7,46 (m, 2 H), 7,27 (m, 1 H), 3,13 (q, 2 H), 1,03 (t, 3 H).

Os compostos da Fórmula II podem ser sintetizados tal como é mostrado no Esquema II. Os carbaldeídos da Fórmula D podem reagir com as 1,2-dihidroxilaminas da Fórmula E para produzir as imidazolininas da Fórmula F, as quais são então oxidadas nos nitronil-N-óxidos correspondentes, através de procedimentos conhecidos (por exemplo, Wu et al. *Bioorganic & Medical Chemistry* 14 (2006) 5711-5720):



Exemplo 2:

III. PREPARAÇÃO DE 2,3-DIMETIL-2,3-DINITROBUTANO:



A -5°C , foi adicionado gota a gota Br_2 (29 mL, 0,55 mol) à solução de 2-nitropropano (100 g, 1,12 mol) em 188 mL (6,0 mol/L) de NaOH aquoso. Foi adicionado etanol (371 mL) à mistura enquanto se agitava. A mistura da reação foi agitada a 84°C durante 3 horas. A mistura da reação quente foi transferida para 1160 mL de água gelada. Os cristais incolores formados foram recolhidos por filtração para produzir o composto desejado (82,56 g, 83%). $^1\text{HNMNR}$ (400 MHz, MeOD): δ 1,7 (s, 3 H).

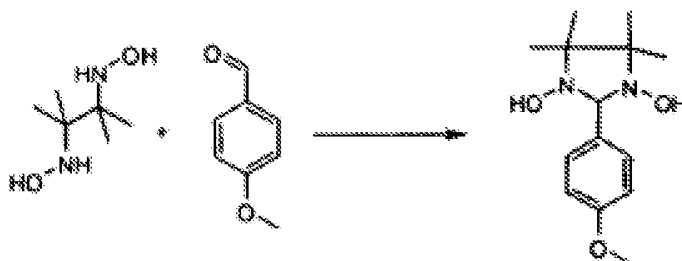
IV. PREPARAÇÃO DE 2,3-BIS(HIDROXILAMINO)-2,3-DIMETILBUTANO:



Foi dissolvido 2,3-dimetil-2,3-dinitrobutano (82,56 g, 0,47 mmol) numa mistura de THF (1407 mL) e água (235 mL). A esta solução arrefecida para $8-10^{\circ}\text{C}$ foi adicionado Zn em pó (126,9 g, 1,95 mol) numa só porção. A esta pasta foi adicionada gota a gota uma solução de NH_4Cl (202,1 g, 3,77 mol) em H_2O (705 mL), sendo agitada continuamente durante 1 hora a 10°C e armazenada durante 16 horas num fraco em água arrefecida. A pasta foi filtrada e o precipitado foi cuidadosamente lavado com THF (4 x 200 mL). O precipitado foi então seco em três lavagens com éter de dietilo e recolhido. A solução foi evaporada em vácuo até o THF parar

de destilar. A solução foi então protegida do ar e foram adicionados carbonato de sódio (235 g) e cloreto de sódio (141 g) com arrefecimento. Foi executada a extração contínua com clorofórmio (1880 mL) durante 18 horas. O filtrado foi concentrado para obter um produto oleoso e então adicionado a esta mistura éter de petróleo e agitado durante 30 minutos à temperatura ambiente, filtrado, seco, para produzir um pó branco (12,8 g, 18,4% de rendimento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ 6,89 (s, 1 H), 5,34 (s, 1 H), 0,96 (s, 3 H).

Preparação de 1,3-dihidroxi-2-(4-metoxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolidina



Uma solução de 2,3-bis(hidroxilamino)-2,3-dimetilbutano (1,3 g, 8,8 mmol) e 4-metoxi-benzaldeído (1,2 g, 8,8 mmol) em metanol (10 mL) foi agitada à temperatura ambiente até ao desaparecimento dos reagentes, conforme indicado por TLC. Foi obtido por filtração 1,3-dihidroxi-2-(4-metoxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolidina, o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida para obter a segunda colheita do composto do título. O composto combinado foi então lavado com éter de petróleo e usado na reação seguinte (0,8 g, 34% de rendimento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ 7,63 (s, 1 H), 7,32 (d, 1 H, $J = 6,8$), 6,87 (d, 1 H, $J = 5,8$), 4,42 (s, 1 H), 3,72 (s, 3 H), 1,06 (s, 3 H), 1,02 (s, 3 H).

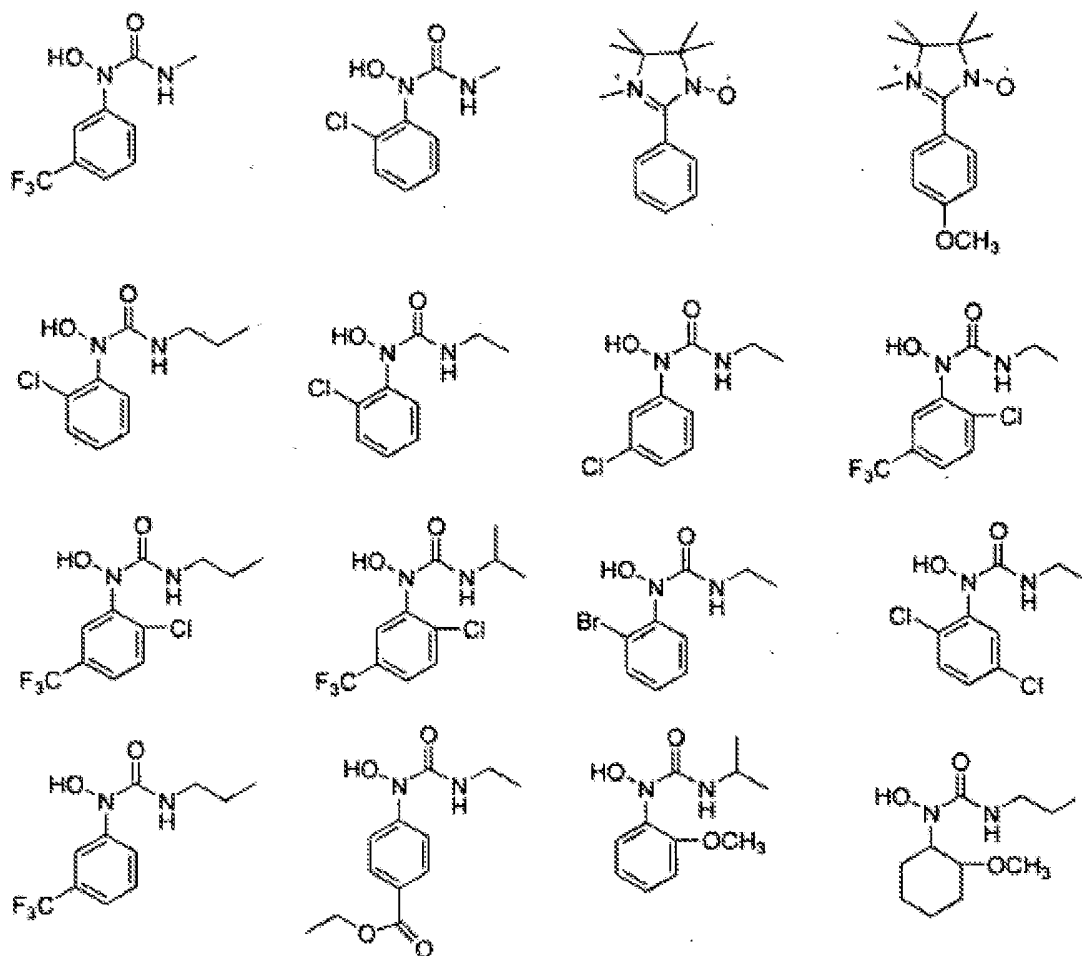
V. PREPARAÇÃO DO NITRONIL-N-ÓXIDOS:

À temperatura ambiente, a suspensão de 0,8 g (3,0 mmol) de 1,3-dihidroxi-2-(4-metoxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolidina e 2,1 g dióxido de chumbo em 30 mL de metanol foi agitada até a mistura da reação se tornar azul. Depois de ser filtrada, o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e purificado numa coluna de cromatografia. A fração combinada foi concentrada e cristalizada, juntamente com a adição de um pouco de éter de petróleo, a -78°C. Depois de ser lavado com um pouco de éter de petróleo frio, o produto azul-escuro cristalino pesava 0,7 g (88%).

Métodos

São fornecidos aqui métodos de tratamento de papel ou pasta e/ou destintagem. Por exemplo, alguns métodos para o processamento de pasta ou papel para, por exemplo, despolimerizar lignina e prevenir a descoloração da pasta causada por ligninas. Tratamento de papel, pasta e composições contendo lignina tal como descrito, por exemplo, em U.S. Pat. Nos. 5,179,021, 5,116,746, 5,407,827, 5,405,769, 5,395,765, 5,369,024, 5,457,045, 5,434,071, 5,498,534, 5,591,304, 5,645,686, 5,725,732, 5,759,840, 5,834,301, 5,871,730, 6,057,438, 5,486,468 e 5,770,012.

Em algumas formas de realização, a composição contendo lignina (por exemplo, pasta de madeira) é colocada em contacto com pelo menos um composto da Fórmula I ou da Fórmula II, sob condições em que a lignina é despolimerizada, amolecida ou liquidificada. De preferência, o papel, pasta ou composições contendo lignina são colocados em contacto com um dos seguintes compostos, ou qualquer combinação dos mesmos:



A concentração final dos compostos (por exemplo, compostos da Fórmula I ou da Fórmula II) pode ser facilmente determinada pelo perito na especialidade. Em algumas formas de realização, o composto da Fórmula I ou II é fornecido na concentração final de 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 300 μM , 500 μM , 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM, 1 M, 2 M, 5 M ou superior, ou qualquer valor intermédio.

Em algumas formas de realização, o papel, a pasta de madeira ou a composição contendo lignina também podem ser colocados em contacto com um mediador selecionado a partir de um ou mais dos seguintes: ácido violúrico; 2,6,6,-tetrametilpiperidina-1-ilóxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol

(HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxiftalimida, 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); e ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHB); ou qualquer combinação dos mesmos.

De preferência, o papel, a pasta ou a composição contendo lignina são tratados sob condições alcalinas, tais como a pH 7,25, 7,5, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9,0, 9,25, 9,5, 9,75, 10,0, 10,25, 10,5, 10,75, 11 ou superiores.

Em algumas formas de realização, o papel, a pasta ou a composição contendo lignina são tratados a temperaturas superiores a 22°C, por exemplo, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, ou superiores, ou qualquer valor intermédio. Em formas de realização preferidas, o papel, a pasta ou a composição contendo lignina são tratados a temperaturas superiores a 60°C, tais como 65°C a 70°C, ou superiores. Portanto, em algumas formas de realização, o papel, a pasta ou a composição contendo lignina são tratados entre 65°C e 75°C, a um pH 8 ou superior, tal como pH 9, 9,5 ou 10 ou superior.

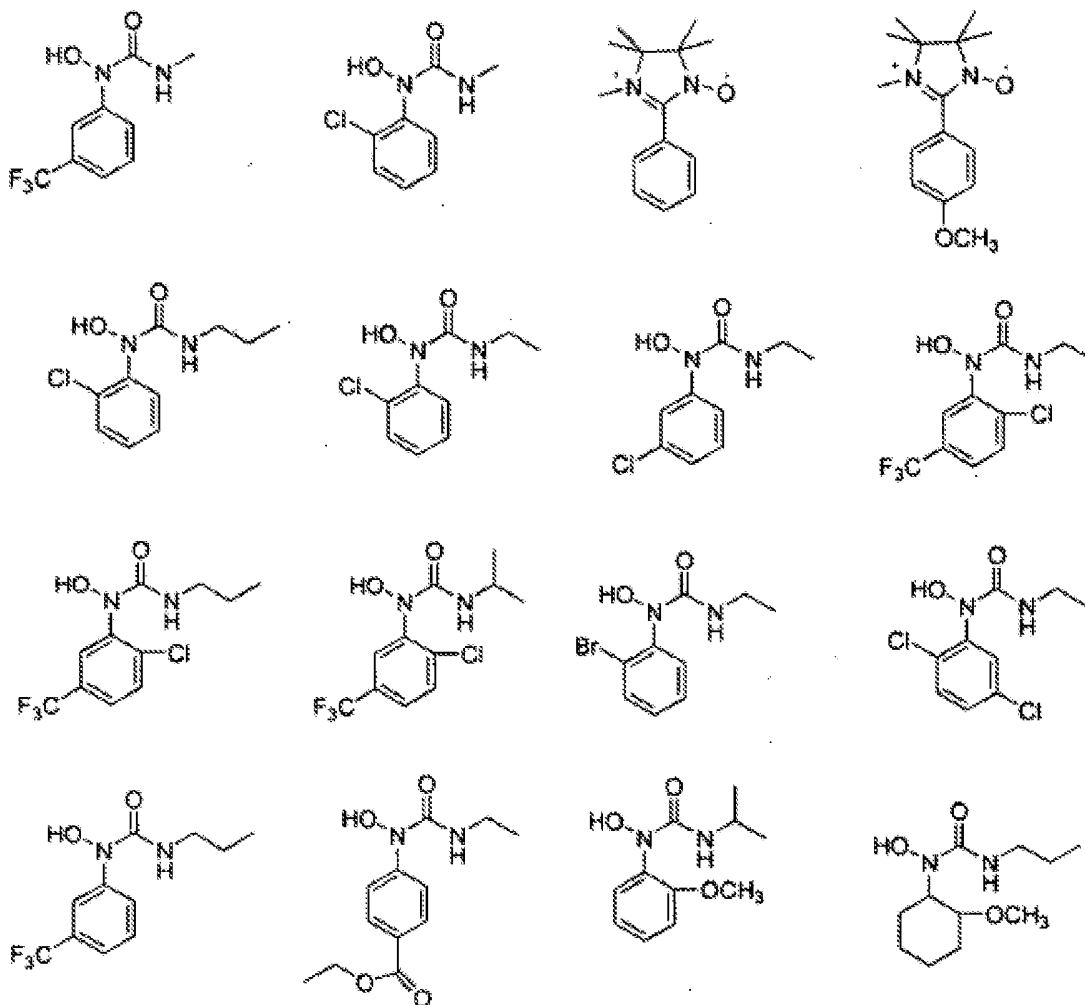
Em algumas formas de realização, o papel, a pasta ou a composição contendo lignina também são colocados em contacto com a lacase. Por exemplo, o papel, a pasta ou a composição contendo lignina são colocados em contacto com o polipéptido de lacase aqui descrito, tal como o polipéptido

da SEQ ID NO: 4, ou variante do mesmo. Contudo, será compreendido o fato de lacases conhecidas hoje em dia (ver, por exemplo, em U.S. Patent No. 5,480,801 e em U.S. Patent Application Serial No. 10/567,536), ou da SEQ ID NO: 2, ou variantes da mesma, ou descobertas no futuro, serem úteis para os métodos aqui descritos. De preferência, a lacase é uma lacase alcalina termicamente estável.

Em algumas formas de realização, o tratamento do papel, da pasta ou da composição contendo lignina também pode incluir qualquer combinação de outras enzimas tais como catalases, celulases, endoglicosidases, endo-beta-1,4-lacases, amiloglucosidases, glicose isomerases, glicosiltransferases, lipases, fosfolipases, lipo-oxigenases, beta-lacases, endo-beta-1, 3 (4)-lacases, cutinases, peroxidases, amilases, glucoamilases, pectinases, redutases, oxidases, descarboxilases, fenoloxidasas, ligninases, pululanases, arabinanases, hemicelulases, mananases, xilolacases, xilanases, pectina acetil esterases, ramnogalacturonan acetil esterases, proteases, peptidases, proteinases, poligalacturonases, ramnogalacturonases, galactanases, pectina liases, transglutaminases, pectina metilesterases, celobiohidrolases e/ou transglutaminases.

Outras formas de realização fornecem métodos de oxidação, rompimento ou disrupção de uma composição contendo lignina, por intermédio do contato da composição contendo lignina com um ou mais polipéptidos de lacase aqui divulgados. Por exemplo, em algumas formas de realização, a composição contendo lignina pode ser colocada em contacto com um polipéptido que contém, consiste essencialmente em ou consiste em polipéptido da SEQ ID NO: 4, ou qualquer variante da mesma.

Em algumas formas de realização, a composição contendo lignina (por exemplo, pasta de madeira) também é colocada em contacto com pelo menos um composto da Fórmula I ou da Fórmula II, sob condições em que a lignina é despolimerizada, amolecida ou liquidificada. De preferência, o papel, pasta ou composições contendo lignina é colocada em contacto com um dos seguintes compostos, ou qualquer combinação dos mesmos:



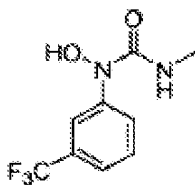
Em algumas formas de realização, o papel, a pasta de madeira ou a composição contendo lignina também podem ser colocados em contacto com um mediador selecionado a partir

de um ou mais dos seguintes: ácido violúrico; 2,6,6,-tetrametilpiperidina-1-ilóxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoíl-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxiftalimida, 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); e ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHB); ou qualquer combinação dos mesmos.

De preferência, o papel, a pasta ou a composição contendo lignina são tratados sob condições alcalinas, tais como a pH 7,25, 7,5, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9,0, 9,25, 9,5, 9,75, 10,0, 10,25, 10,5, 10,75, 11 ou superiores.

Em algumas formas de realização, o papel, a pasta ou a composição contendo lignina são tratados a temperaturas superiores a 22°C, por exemplo, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, ou superiores, ou qualquer valor intermédio. Em formas de realização preferidas, o papel, a pasta ou a composição contendo lignina são tratados a temperaturas superiores a 60°C, tais como 65°C a 70°C, ou superiores. Portanto, em algumas formas de realização, o papel, a pasta ou a composição contendo lignina são tratados entre 65°C e 75°C, a um pH 8 ou superior, tal como pH 9, 9,5 ou 10 ou superior.

Por exemplo, em algumas formas de realização, o composto contendo lignina é colocado em contacto com o polipéptido da SEQ ID NO: 4, ou variantes desta, e



(Mediador 71), sob condições alcalinas, por exemplo pH 8 ou superior. Em algumas formas de realização, o tratamento é processado entre 55°C-70°C.

Outras formas de realização relatam métodos de oxidação de um substrato fenólico ou aromático. O substrato fenólico pode ser colocado em contato com um composto da Fórmula I ou II. Em formas de realização preferidas, com um ou mais dos seguintes: ácido violúrico; 2,6,6-tetrametilpiperidina-1-ilóxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6 sulfônico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxi-ftalimida, 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); e ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHB); ou qualquer combinação dos mesmos.

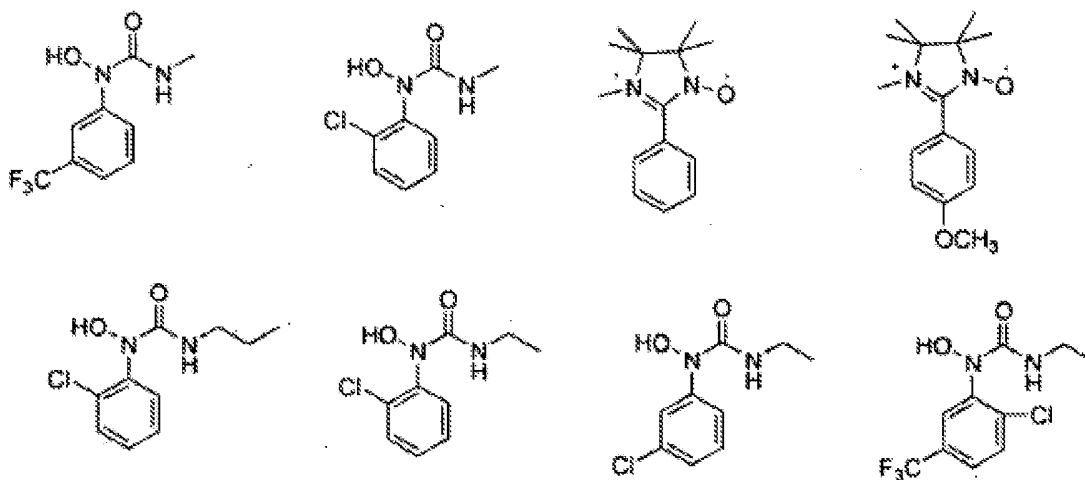
De preferência, o substrato fenólico é tratado sob condições alcalinas, tais como a pH 7,25, 7,5, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9,0, 9,25, 9,5, 9,75, 10,0, 10,25, 10,5, 10,75, 11 ou superiores.

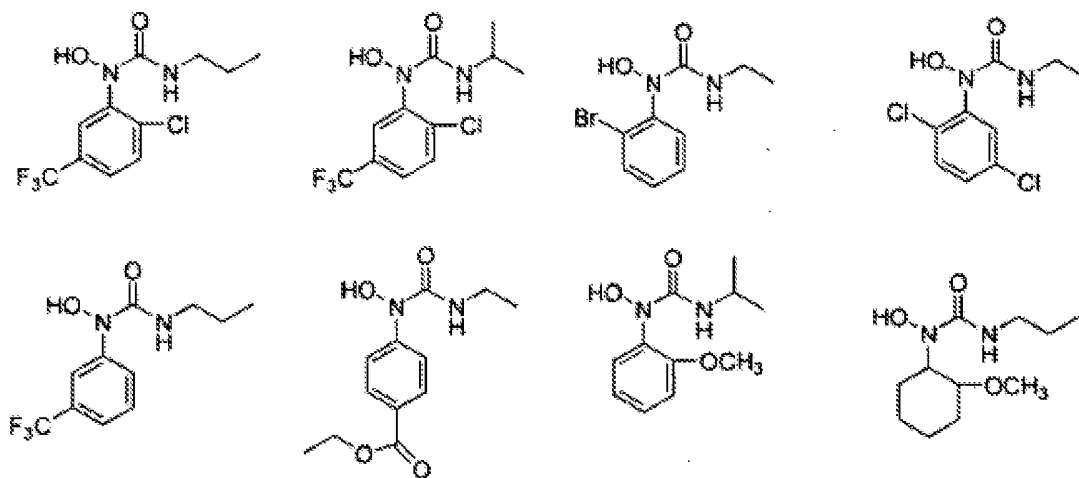
Em algumas formas de realização, o substrato fenólico é tratado a temperaturas superiores a 22°C, por exemplo, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C,

80°C, 85°C, 90°C, 95°C, ou superiores, ou qualquer valor intermédio. Em formas de realização preferidas, o substrato fenólico é tratado a temperaturas superiores a 60°C, tais como 65°C a 70°C, ou superiores. Portanto, em algumas formas de realização, o substrato fenólico é tratado entre 65°C e 75°C, a um pH 8 ou superior, tal como pH 9, 9,5 ou 10 ou superior.

Aqui também são fornecidos métodos de oxidação de uma composição contendo fibras. Por exemplo, em algumas formas de realização, a composição contendo fibras pode ser colocada em contacto com um polipéptido que contém, consiste essencialmente em ou consiste em polipéptido da SEQ ID NO: 4, ou qualquer variante desta.

Em algumas formas de realização, a composição contendo fibras também é colocada em contacto com pelo menos um composto da Fórmula I ou da Fórmula II. De preferência, a composição contendo fibras é colocada em contacto com um dos seguintes compostos, ou qualquer combinação dos mesmos:





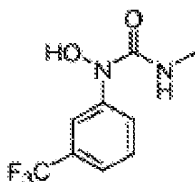
Em algumas formas de realização, a composição contendo fibras também pode ser colocada em contacto com um mediador selecionado a partir de um ou mais dos seguintes: ácido violúrico; 2,6,6,-tetrametilpiperidina-1-ilóxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoíl-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxiftalimida, 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); e ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHB); ou qualquer combinação dos mesmos.

De preferência, a composição contendo fibras é tratada sob condições alcalinas, tais como a pH 7,25, 7,5, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9,0, 9,25, 9,5, 9,75, 10,0, 10,25, 10,5, 10,75, 11 ou superiores.

Em algumas formas de realização, a composição contendo fibras é tratada a temperaturas superiores a 22°C, por exemplo, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, ou superiores, ou

qualquer valor intermédio. Em formas de realização preferidas, a composição contendo fibras é tratada a temperaturas superiores a 60°C, tais como 65°C a 70°C, ou superiores. Portanto, em algumas formas de realização, a composição contendo fibras é tratada entre 65°C e 75°C, a um pH 8 ou superior, tal como pH 9, 9,5 ou 10 ou superior.

Por exemplo, em algumas formas de realização, a composição contendo fibras é colocada em contato com o polipéptido da SEQ ID NO: 4, ou variantes desta, e



(Mediador 71), sob condições alcalinas, por exemplo pH 8 ou superior. Em algumas formas de realização, o tratamento é processado entre 55°C-70°C.

Quando é fornecida uma gama de valores, deve compreender-se como estando abrangidos pela invenção, qualquer valor interveniente até à décima da unidade do limite inferior, excetuando os casos em que o contexto ditar claramente outra coisa, entre os limites superior e inferior daquela gama de valores e qualquer outro valor interveniente ou determinado naquela gama de valores determinada. Os valores superior e inferior destas pequenas gamas de valores podem ser incluídos de forma independente em gamas de valores mais reduzidas que também estão abrangidos pela invenção, sujeitos a qualquer exclusão dos limites específicos da gama de valores determinada. Quando a gama de valores determinada inclui um ou ambos os limites, as gamas de valores que excluem um ou ambos os limites incluídos estão também incluídos na invenção.

Excetuando os casos em que é referido o contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm a mesma interpretação que é dada pelo perito na especialidade, na qual esta invenção se enquadra. Apesar de métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos poderem também ser utilizados na prática ou na experimentação da presente invenção, são agora descritos métodos e materiais representativos e ilustrativos.

Tendo assim descrito a invenção na generalidade, a mesma será mais bem entendida através da referência a exemplos específicos, os quais estão aqui incluídos somente para fins ilustrativos e não têm a intenção de ser restritivos, a não ser que seja especificada o contrário.

Exemplo 1: Isolamento de genes da lacase fúngica

O exemplo seguinte descreve o isolamento de genes da lacase fúngica. Uma coleção de estirpes fúngicas foi obtida a partir de um ambiente com um pH elevado (pH ≥ 8). Foi construída uma árvore filogenética usando sequências de ácidos nucleicos conhecidas publicamente, assim como sequências genômicas determinadas a partir da coleção de estirpes fúngicas. A árvore filogenética da sequência SWISSPORT™ Pfam HMM Cu-oxidase e as previsões genéticas a partir de genomas fúngicos apresentam cinco filos principais: lacases a partir de *Viridiplantae*, várias funções a partir de várias fontes, lacases a partir de *Ascomycetes*, lacases a partir de *Arthropoda* e lacases a partir de *Basidiomycetes*.

Foram usados alinhamentos das sequências para identificar sequências conservadas a partir de sub-filos de *Ascomycete* e *Basidiomycete*, as quais incluem *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium verticillioides* e *Botrytis cinerea*

1. Os primers degenerados concebidos com base nas sequências conservadas, para amplificar fragmentos de ADN na gama de valores 0,5-1 quilobase (kb). DNA cromossómico foi isolado a partir de estirpes fúngicas usando protocolos de rotina e utilizado como modelo nas reações de PCR com primers degenerados.

Os produtos do PCR com dimensões na gama de valores 0,5-1 quilobase (kb) foram clonados e sequenciados para confirmar a amplificação dos fragmentos do gene da lacase. Os fragmentos de DNA confirmaram que os genes da lacase foram aumentados por intermédio de várias amplificações de PCR adicionais usando técnicas de biologia molecular de rotina, para obter genes de extensão total. A análise da sequência foi efetuada para determinar os possíveis genes da lacase com extensão total, codões de início/finalização e junções intrão/exão. Foram descobertos 36 genes da lacase com extensão total a partir de isolados de *Ascomycete* e 5 genes da lacase com extensão total a partir de isolados de *Basidiomycete*.

As sequências foram alinhadas com a utilização do algoritmo BLAST com a base de dados NCBI não redundante. Os pares de pontuação elevada (HSPs) corresponderam aproximadamente aos exões que alinharam bem com as sequências da lacase publicamente conhecidas, e foram aumentadas ou cortadas manualmente em correspondência com os limites exão/intrão corretos. Os exões em falta na extremidade 5' do gene foram procurados por intermédio de inspeção visual das translações 3-frame da sequência do clone, de modo a identificar o codão de início mais provável.

Os possíveis genes da lacase a partir de *Cochliobolus*, *Fusarium* e *Botrytis* situados no filo *Ascomycete* foram localizados para análises posteriores.

Exemplo 2: Sub-clonagem e expressão da lacase

As sequências codificantes das lacases candidatas determinadas anteriormente foram clonadas num vetor de expressão que pode ser integrado num genoma de *Aspergillus niger* por intermédio de uma recombinação homóloga, de tal modo que as sequências codificantes foram operacionalmente ligadas a um promotor de glucoamilase. A seguir à transformação protoplástica mediada por PEG, transformantes contendo a cassete de expressão foram selecionados usando um marcador selecionável também presente no vetor. As sequências peptídicas de sinalização nativas dos genes da lacase foram incluídas na molécula de ADN exógena.

Após a verificação da sequência, as moléculas de ADN exógenas foram usadas para transformar *Aspergillus niger*, selecionando em meio de regeneração seletiva para a utilização de acetamida como única fonte de nitrogénio. Seis transformantes oriundos de cada candidato foram plaqueados em meio seletivo para colónias simples e deixados crescer durante cinco dias a 30°C. Uma única colónia de cada estirpe foi então plaqueada em agar de dextrose e batata (PDA) para colónias individuais, seguido da seleção de uma colónia e separação para crescimento confluyente em PDA (incluindo 0,5 mM CuSO₄ no PDA usado para esporulação). A suspensão de esporos foi recuperada para cada transformante e usada para inocular culturas iniciais de Seclin CSL. Depois do crescimento durante a noite, as culturas iniciais foram usadas para inocular CSM/MES em frascos defletores. As culturas CSM/MES foram cultivadas a 30°C durante cinco dias.

Para verificar que os transformantes de *Aspergillus* expressam e secretam uma proteína com atividade de lacase, amostras de sobrenadantes de cultura foram analisadas relativamente à capacidade de oxidar ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) a pH 5,2. Resumidamente, uma amostra de 1 mL de cultura foi centrifugada a 5.000 rpm durante 5 minutos. 20 µL do sobrenadante da cultura foram adicionados a 180 µL de ABTS 1 mM em 50 mM de acetato de sódio pH 5,2, em placas de 96 poços. A atividade de lacase é medida seguindo $\Delta A_{420\text{nm}}/\text{min}$ com um espectrofotômetro. Uma unidade de ABTS é a quantidade de lacase resultando na diferença de uma unidade de absorvância em um minuto. Os transformantes que resultaram na maior quantidade de lacase no sobrenadante foram usados para testes adicionais.

Exemplo 3: Determinação do pH ótimo em siringaldazina por lacases candidatas

Para determinar o pH ótimo das lacases expressas em *Aspergillus*, as lacases foram estudadas relativamente à sua atividade num mediador siringaldazina (SGZ) de baixo potencial redox, numa gama de pH de 4-11, à temperatura ambiente. As taxas iniciais para cada lacase em SGZ foram medidas à temperatura ambiente com uma gama de pH de 4-11. A oxidação de SGZ foi determinada pelo tampão de Britten-Robinson, pH 5,0 a 11,0, com etanol a 10% (derivado da solução stock de SGZ), pela monitorização da diferença de absorvância a 530 nm, com um coeficiente de extinção de $65 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Bauer e Rupe, 1971, Analytical Chemistry 43:421-425), à temperatura ambiente. A atividade de lacase usando SGZ como substrato foi avaliada misturando 800 µL de tampão de ensaio (40 µM CuSO_4 - 25 mM acetato de sódio, pH 5,5) com 20 µL de sobrenadante de cultura isolado como descrito

no Exemplo 2, e 60 μ L de siringaldazina 0,28 mM em etanol a 50%. A absorvância a 530 nm foi medida ao longo do tempo num espectrofotómetro de UV-VIS.

Foram testadas mais de trinta lacases. A maioria das lacases candidatas testadas mostrou atividade elevada numa gama acídica (pH_{opt} 4-6). Contudo, duas lacases (BD22449 de *Cochliobolus heterostrophus* e BD22865 de *Fusarium verticillioides*) exibiram um $\text{pH}_{\text{opt}} \geq 8$ em SGZ. As duas lacases foram adicionalmente analisadas.

Exemplo 4: Oxidação de TEMPO, ácido violúrico e HTB por lacases candidatas

As lacases que exibiram um $\text{pH}_{\text{opt}} \geq 8$ em SGZ tal como descrito no Exemplo 3 foram adicionalmente caracterizadas, ensaiando a sua capacidade para oxidar 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-iloxi (TEMPO), a pH 8 à temperatura ambiente. Resumidamente, 50 μ L de sobrenadantes de cultura isolados como descrito no Exemplo 2 foram incubados com 950 μ L de TEMPO (1 mM em tampão Britton-Robinson, a pH 8), a 22°C num instrumento de medição de oxigénio OXYTHERM™ (Hansatech, Inglaterra). O consumo de oxigénio foi medido ao longo do tempo de acordo com as instruções do fabricante.

A BD22449 (SEQ ID NO: 2) não apresentou oxidação de TEMPO a pH 8 à temperatura ambiente. A BD22865 (SEQ ID NO: 4) apresentou oxidação de TEMPO com uma taxa de consumo de oxigénio de 250 nmol/min/mg. Também foi testada a capacidade de BD22865 (SEQ ID NO: 4) para oxidar mediadores com potenciais redox elevados tais como o ácido violúrico e 1-hidroxibenzotriazol (HBT) a pH 8 à temperatura ambiente. Resumidamente, 50 μ L de sobrenadante de cultura BD22865 isolados como descrito no Exemplo 2, foram incubados com 950 μ L de ácido violúrico (1 mM em tampão Britton-Robinson

a pH 8), ou HBT (1 mM em tampão Britton-Robinson) a pH 8 a 22°C, num instrumento de medição de oxigénio OXYTHERM™. O consumo de oxigénio foi medido como descrito anteriormente. A SEQ ID NO: 4 (BD22865) foi capaz de oxidar tanto o ácido violúrico quanto o HBT, com taxas de consumo de oxigénio de 150 nmol/min/mg e 100 nmol/min/mg, respetivamente, sob as condições aqui descritas. Estes resultados indicam que BD22865 é uma lacase com potencial redox elevado, e BD22449 é uma lacase com potencial redox médio.

Exemplo 5: Oxidação de mediadores capazes de oxidação de lignina

(3-(3'-trifluormetilfenil)-3-hidroxi-metilureia), "mediador 71", é capaz de deslignificar pasta. O mediador 71 foi identificado como o mediador 71t mais eficiente a pH 5 e pH 8. BD22449 (SEQ ID NO: 2), BD22865 (SEQ ID NO 4) e lacase de *Trametes versicolor* (usada como controlo) foram estudadas relativamente à sua capacidade para oxidar Mediador 71 a pH 8, usando eletrodo de oxigénio. Resumidamente, 50 µL de sobrenadante de cultura BD22449 ou BD22865, isolados como descrito no Exemplo 2, foram incubados com 950 µL de mediador 71 dissolvido em tampão de Britton-Robinson, para uma concentração final de 1 mM a pH 8. O consumo de oxigénio foi medido à temperatura ambiente num instrumento de medição de oxigénio OXYTHERM™ ao longo do tempo, como descrito anteriormente. Os resultados das experiências são apresentados nas Figuras 1, 2 e 3. A lacase de *Trametes* não oxidou o mediador 71 a pH 8, ao passo que as lacases BD22449 e BD22865 apresentaram atividades específicas de 677 nmol/min/mg e 1350 nmol/min/mg, respetivamente (atividades específicas para preparação de lacase, não para a proteína purificada).

A seguir, o pH_{opt} para a catálise da oxidação de mediador 71 foi determinado para cada lacase. 50 μ L de sobrenadante de cultura de BD22449 ou BD22865 isolados como descrito no Exemplo 2, foram incubados com 950 μ L de mediador 71 dissolvido em tampão Britton-Robinson, para uma concentração final de 1 mM a pH 5, 6, 7, 8, 9, ou 10. O consumo de oxigénio ao longo de 20 minutos à temperatura ambiente foi determinado num instrumento de medição de oxigénio OXYTHERM™, ao longo do tempo como descrito anteriormente. Os resultados são apresentados na Figura 4. Tanto BD22865 quanto BD22849 exibiram oxidação ótima de mediador 71 a pH 8. Contrariamente, a lacase de *Trametes* não demonstrou atividade no mediador 71 a pH 7 ou superior.

Exemplo 6: Tolerância térmica de lacases fúngicas

As lacases BD22449 e BD22865, identificadas e caracterizadas nos Exemplos 1-5 anteriores foram testadas relativamente à sua tolerância térmica. Resumidamente, cada lacase foi testada a 50°C, 60°C e 70°C durante 0-60 minutos, em que a atividade residual em ABTS foi medida. Os sobrenadantes das culturas de *Aspergillus* expressando BD22449 (SEQ ID NO: 2) e BD22865 (SEQ ID NO: 4) foram isolados como descrito no Exemplo 2. Os sobrenadantes foram incubados a 50°C, 60°C ou 70°C, durante 1 min, 5 min, 10 min, 30 min e 60 min. Para cada ponto, a oxidação de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) pela lacase foi medido usando um instrumento de medição de oxigénio OXYTHERM™.

Os resultados são mostrados nas Figuras 5A-C. Ambas as lacases BD22499 (SEQ ID NO: X) e BD22865 (SEQ ID NO: X) toleraram bem a exposição de calor a 50°C durante 1 hora, mas a lacase de *Trametes* foi de certa forma alterada (resultados não mostrados). A 60°C, a BD22449 permaneceu

estável durante 1 hora. A BD22865 apresentou uma meia-vida a 60°C de ~40 min e a lacase de Trametes de < 5 min. A exposição a 70°C desnaturou rapidamente as três lacases.

A BD22449 permaneceu aproximadamente 100% ativa após uma hora a 60°C, o que é provável que seja a temperatura mais elevada à qual uma lacase seria exposta no estágio D(0) (ponto mais provável de aplicação de lacases). A BD22865 permaneceu cerca de 40% ativa após uma hora a 60°C; contudo, apresentou uma atividade específica cerca de duas vezes superior no mediador 71 quando comparado com a BD22449.

Exemplo 7: Cinética da atividade da lacase fúngica

A cinética da catálise da oxidação do mediador 71 pelas lacases fúngicas descritas anteriormente foi determinada. Usando o instrumento de medição de oxigénio OXYTHERM™, as taxas de consumo de oxigénio a pH 8 à temperatura ambiente por BD22449 (SEQ ID NO: 2) e BD22865 (SEQ ID NO: 4) foram medidas para diferentes concentrações de mediador. Os resultados são apresentados na Figura 6.

Ambas as lacases obedeceram à cinética de Michaelis-Menten (ou saturação). Ambas as lacases apresentaram cinéticas de saturação semelhantes relativamente à concentração de mediador 71: K_M no mediador 71 foi ~ 500 μM para ambas as lacases. A taxa máxima foi obtida a concentrações de mediador excedendo ~ 2,5 mM e K_M foi cerca de 500 μM para ambas as lacases. O K_M para o oxigénio não foi medido, mas a concentrações de mediador excedendo 1 mM, ambas as lacases consumiram de forma eficiente todo o oxigénio na câmara de reação do eletrodo de oxigénio. Isto indica um K_M no oxigénio sub-micromolecular para ambas as lacases, uma vez que 4 moléculas de mediador são oxidadas por molécula

de oxigénio, e a concentração de oxigénio inicial na câmara de reação foi de $\sim 250 \mu\text{M}$.

Exemplo 8: Deslignificação de pasta de madeira com lacase e mediador

As lacases BD22449 e BD22865, identificadas e caracterizadas nos Exemplos 1-5 anteriores foram avaliadas relativamente à deslignificação de pasta de madeira com mediador 71. Resumidamente, 1 grama de pasta de madeira de coníferas foi tratado com 3 mL de sobrenadante de cultura de BD22449 ou BD22865, isolado como descrito no Exemplo 2, com 50 mg de mediador 71, a 5% de consistência, em tampão borato pH 8, a 22°C. O tratamento com lacase/mediador foi seguido de um estágio de extração com 2,5% de NaOH, 2% H₂O₂ a 75°C. Foram preparadas folhas a partir da pasta tratada e foi medido o aumento de brilho devido ao tratamento com lacase/mediador, usando o Brightmeter Micro S-5 (Technidyne Corp. New Albany, Indiana, EUA). O aumento de brilho obtido com BD22449 e BD22865 com mediador 71 foi de $\sim 30\%$ (resultados não apresentados).

Exemplo 9: Oxidação de C6 em glucopiranosido com lacase e mediador

A lacase BD22865, identificada e caracterizada nos Exemplos 1-5 anteriores, é testada relativamente à oxidação glucopiranosido com o mediador TEMPO. 14,25 unidades ABTS de BD22865 são incubadas em 12 mM de TEMPO, 1 mg/mL de glucopiranosido em 50 mM de tampão borato pH 8, durante 16 horas, a 22°C. A mistura de reação é diluída 1:100 e sujeita a cromatografia líquida e espetrometria de massa numa coluna Agilent C18, usando H₂O:acetonitrilo (60:40) como fase móvel a uma taxa de 1 mL/min. A formação de glucopiranosido devido ao tratamento lacase/TEMPO é

detetada pela identificação da forma carboxilato no espectro LCMS/MS.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> VERENIUM CORPORATION
Janne Samuli Kerovuo
Sylke Haremza
Oliver Koch
Tilo Habicher
Dan Robertson
Grace DeSantis
Ryan McCann
Peter Luginbuhl

<120> LACASES PARA BIO-BRANQUEAMENTO DE PASTA

<130> DIVERSA.Q14VFC

<140> PCTUS0719124

<141> 2007-09-20

<150> 60/824,402

<151> 2006-09-01

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2105

<212> DNA

<213> Cochlicoccus heterotrophus

<400> 1

```

atggtctctt caatttcgag ggtgggtaac gcccttgggc ttcttttgcg caetgtcaci 60
tcattctgtt tacctcataa aagtctcggc cccagaacac cggaggttcc ttggaagaac 120
actggtctct teagtggaca cagcaaacga caaggatatg agactgcctg taatcatggt 180
ccagaatcaa gaggatgctg gattgacgac ttcaacatcg acaccgacat ggatggtgaa 240
tggccagata ctggaasgac agtcaagtat cacctgaccc tcaaccaaac cactggaggt 300
ccagacgggt ttgaaaggcc gatgttcttg attaatggcc aatacccagy accagtfaat 360
gctgtgttaa aatgccaaat attcttttct aatgagtcac agactattac tggcagctgg 420
ggagatgttc tagagatcac agttaccaat ggctttgaae acaacggtag aggtatacat 480
tggcaagggtc tgaggcaact cgggcaaacg gaacaagatg gcgttaaatg tatcactgaa 540
tggccaatcg caccgggtga ctccaagctc tacagattca sagcaactca atatggcact 600
accgtaagta tccaccactg tgtgtgtatg acatgtttcc ggaagacgyc taaccgtagc 660
agtggatata ctgcactac tgggtgcagt atggtgacgg catcgtgggt cctctgatca 720
tcaaaggacc ctcaacggcg aactacgata ttgatcttgg cgctttccca atgactgacc 780
ggtttcacgc aaccsccttc accgtcaacg ctgcagccgt tcatgcaaat ggcctccaa 840
ctgctgacaa tgtcttgtc aatggtcca tgacctcacc ttttggcggc aagtacgccc 900
aaagatcctt aactccggga aatctcact tctgtcgttt gatgaacgtt ggtatataca 960
actaccitca tgtcggcctc gatgggcacc agttccaggt catctcgggt gatctcagc 1020
ccattgaacc tttctacacg gacagcttgg tctttgcagt cggtaagttg aaccgaggtt 1080
gtgtccagat gcaagccctt tttgtttatc acaacatcgt tctgtgtgac gscaccocgg 1140
ccacgsgaat gtagtcaaaa tagccactgt tgatgaaagt ttaactaaca acgtcggcag 1200
gtcaacggta tgaagtccac atcaacgcaa ctgaagctgt gggcaactac tggctacgtg 1260
ttggtaccgg cggtaactgc gacggtccca atgccaatgc agcaaatatc aggagtatct 1320
tccgatatgc tggcgtccca actgaaagcc cagacacgac tggttcgctt ccgtcgggt 1380
gctacgatga ggtgttcta ccttatgcca agacgactgt tcttcaggag atgcccgaac 1440
agttgagcgt gggcttcaac cctaactgga ctagtgcagt gacgcaaaat cagggctctg 1500
tccaatggct cgtcaacggt aatcccatgg cagttgatct tgaagtcctt actctgcagt 1560
cgggtgttga tggcaatggt acctacggaa acaaccgcca cgtgtttgca gtcgacgaga 1620

aacaccaagt aagtcgtccc ctgtacttag tactgtttaa tggtcattaa caaaggttc 1680
agtggcaata ttgggtcacc caacaaaaca gttctaaccc accacttctt caccocatcc 1740
acctccacgg ccacgacttc tacgtcctcg cacaggtcga aaacgcagtc tggaaagag 1800
atatttcaac cctgagagcg gacaaoccca tccgtcggga caaggccgat ctccocgtg 1860
gaggctactt ggtccttgcct ttcgagtcgg acaaccctgg cgcctggctt atgcactgcc 1920
acatccctt ccacgttgtt gccggtctcg gtgtccagtt cctcagagcc gsatccgaaa 1980
tcaagcccca agatggatc gcagagatgc acaggacatg tctaaactgg cagtcatgcc 2040
gctacaagta ccatcccaat ggcctcttct tccccggtga ctctggtcta cgtctgacga 2100
actaa 2185

```

<210> 2

<211> 601

<212> PRT

<213> *Cochlicobolus heterostrophus*

<400> 2

```

Met Val Ser Ser Ile Ser Arg Val Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Leu
 1          5          10          15
Pro Thr Val Thr Ser Ser Val Val Pro His Lys Ser Leu Ala Pro Arg
 20          25          30
Thr Pro Glu Val Pro Trp Lys Asn Thr Gly Leu Phe Ser Gly His Ser
 35          40          45
Lys Arg Gln Gly Tyr Glu Thr Ala Cys Asn His Gly Pro Glu Ser Arg
 50          55          60
Gly Cys Trp Ile Asp Asp Phe Asn Ile Asp Thr Asp Met Asp Val Glu
 65          70          75          80
Trp Pro Asp Thr Gly Lys Thr Val Lys Tyr His Leu Thr Ile Thr Asn
 85          90          95

```

Thr	Thr	Gly	Ala	Pro	Asp	Gly	Phe	Glu	Arg	Pro	Met	Phe	Leu	Ile	Asn
			100					105					110		
Gly	Gln	Tyr	Pro	Gly	Pro	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Trp	Gly	Asp	Val	Leu
		115					120					125			
Glu	Ile	Thr	Val	Thr	Asn	Gly	Leu	Glu	Asn	Asn	Gly	Thr	Gly	Ile	His
	130					135					140				
Trp	His	Gly	Leu	Arg	Gln	Leu	Gly	Thr	Asn	Glu	Gln	Asp	Gly	Val	Asn
145					150					155					160
Gly	Ile	Thr	Glu	Cys	Pro	Ile	Ala	Pro	Gly	Asp	Ser	Lys	Leu	Tyr	Arg
				165					170						175
Phe	Lys	Ala	Thr	Gln	Tyr	Gly	Thr	Thr	Trp	Tyr	His	Ser	His	Tyr	Ser
		180						185						190	
Val	Gln	Tyr	Gly	Asp	Gly	Ile	Val	Gly	Pro	Leu	Ile	Ile	Lys	Gly	Pro
		195					200					205			
Ser	Thr	Ala	Asn	Tyr	Asp	Ile	Asp	Leu	Gly	Ala	Phe	Pro	Met	Thr	Asp
	210					215					220				
Trp	Phe	His	Ala	Thr	Thr	Phe	Thr	Val	Asn	Ala	Ala	Ala	Val	His	Ala
225					230					235					240
Asn	Gly	Pro	Pro	Thr	Ala	Asp	Asn	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Ser	Met	Thr
				245					250					255	
Ser	Ser	Phe	Gly	Gly	Lys	Tyr	Ala	Glu	Thr	Ile	Leu	Thr	Pro	Gly	Lys
		260						265						270	
Ser	His	Leu	Leu	Arg	Leu	Met	Asn	Val	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	His
		275				280						285			
Val	Gly	Leu	Asp	Gly	His	Gln	Phe	Gln	Val	Ile	Ser	Ala	Asp	Phe	Thr
	290					295					300				
Pro	Ile	Glu	Pro	Phe	Tyr	Thr	Asp	Ser	Leu	Val	Leu	Ala	Val	Gly	Gln
305					310					315					320
Arg	Tyr	Glu	Val	Ile	Ile	Asn	Ala	Thr	Glu	Ala	Val	Gly	Asn	Tyr	Trp
				325					330					335	
Leu	Arg	Val	Gly	Thr	Gly	Gly	Asn	Cys	Asp	Gly	Pro	Asn	Ala	Asn	Ala
			340					345					350		
Ala	Asn	Ile	Arg	Ser	Ile	Phe	Arg	Tyr	Ala	Gly	Ala	Pro	Thr	Gln	Asp
		355					360					365			
Pro	Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Leu	Pro	Ser	Gly	Cys	Tyr	Asp	Glu	Asp	Val
	370					375					380				
Val	Pro	Tyr	Ala	Lys	Thr	Thr	Val	Pro	Gln	Glu	Met	Pro	Glu	Gln	Leu
385					390					395					400
Ser	Val	Gly	Phe	Asn	Pro	Asn	Trp	Thr	Ser	Asp	Val	Thr	Gln	Asn	Gln
			405						410					415	
Gly	Leu	Val	Gln	Trp	Leu	Val	Asn	Gly	Asn	Pro	Met	Ala	Val	Asp	Leu
		420						425					430		
Glu	Val	Pro	Thr	Leu	Gln	Ser	Val	Leu	Asp	Gly	Asn	Val	Thr	Tyr	Gly
	435						440					445			
Asn	Asn	Arg	His	Val	Phe	Ala	Val	Asp	Glu	Lys	His	Gln	Trp	Gln	Tyr
	450					455					460				
Trp	Val	Ile	Gln	Gln	Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	Pro	Leu	Pro	His	Pro	Ile
465					470					475					480
His	Leu	His	Gly	His	Asp	Phe	Tyr	Val	Leu	Ala	Gln	Val	Glu	Asn	Ala
			485						490					495	
Val	Trp	Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	Thr	Leu	Lys	Thr	Asp	Asn	Pro	Ile	Arg
		500						505					510		
Arg	Asp	Thr	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Tyr	Leu	Val	Leu	Ala	Phe
		515					520					525			

Glu	Ser	Asp	Asn	Pro	Gly	Ala	Trp	Leu	Met	His	Cys	His	Ile	Pro	Phe
	530					535				540					
His	Val	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Val	Gln	Phe	Leu	Glu	Arg	Glu	Ser	Glu
545				550					555						560
Ile	Lys	Ala	Gln	Asp	Gly	Tyr	Ala	Glu	Met	His	Arg	Thr	Cys	Ala	Asn
			565					570						575	
Trp	Gln	Ser	Trp	Arg	Tyr	Lys	Tyr	His	Pro	Asn	Gly	Ile	Leu	Phe	Pro
			580					585					590		
Gly	Asp	Ser	Gly	Leu	Arg	Arg	Arg	Asn							
	595							600							

<210> 3

<211> 1983

<212> DNA

<213> *Fusarium verticillioides*

<400> 3

atggtctctca	tggagcaggt	atggcacgcc	tgcgtcagta	tagtgcgatg	gctaaccaatg	60
tggcccacat	ctccatccac	ctcctaccac	cttccccttc	gcccccacca	tccctcacact	120
cacattgaag	accacagccc	tggettccct	atctttcacc	ccccgcaggg	tgatcatgag	180
ttcctctgcg	agtacccega	aatgacaggg	tttgtgcaat	gttcaatccc	agagaacaga	240
gaatggtggc	tgagacatcc	tgatgggcga	gsgttcaaca	ttcatactaa	ctatgagAAC	300
tttggcgcaa	aggggattat	gaggcattat	acgcttaata	ttacggagag	ttgggtataat	360
gctgatgggc	agaactttac	ggaggcaaac	ttgttcaatg	gggagtatcc	tgggccttgg	420
cttgaggctt	gttggggaga	tacgttcaac	attacogtea	taaacegat	gagagggaat	480
ggcacaagta	ttcactggca	cggcattcgt	cagAACcaga	ccatggacat	ggatggtgtc	540
aatggcatca	ctcagtgctc	tattgoccca	ggtgataget	tcagctatat	cttcaaacag	600
scgcagtacg	ggacgtcgtg	gtatcatagc	cactactctg	tgcaatatgc	agatgggtctc	660
caaggccccca	tcacaattca	tggccctcaa	tctgcacctt	atgatgcac	caagaggcca	720
ctgctcatga	cagattggtc	tcacgagagc	gcattcagac	tgctcttccc	aggtctcaaa	780
ttctccaaaca	agaccatcct	tctcaacggc	gtaggcaacg	tctcccacta	cgggtacacc	840
ccaactztgc	ctatccctga	taactatgag	ttatacttca	acaaaactcc	aacccgacaag	900
ccaactcggc	ccaagagata	ctgctctcgc	ctgatcaata	ottcatttga	ctcaaacctc	960
gtcttttcca	ttgataacca	ctggcttcag	atcgctcact	cagatttctg	tccatttgg	1020
ccgtaatctca	atacgtcggc	gttgataggt	atcggccaaa	ggtacaacgt	catcgttgaa	1080
gctaactctc	tgggcgggga	tgtcaatgag	attccagatg	atggaaactt	ctggataagg	1140
acgtgggtcg	ctgatgcctg	cggtatagcc	ccaggaggag	aaggctatga	aaagaccggc	1200
atcctacgat	acaaccctc	cgacaaggct	cttccatctt	ctcaaccttg	ggtcaacatc	1260
agcaaggctt	gttctgatga	gacttatact	tgcctgagac	ccaagattcc	gtggtatata	1320
ggcccagcgg	ccaatgctca	gaatggtgag	aggttcaatg	ttacttttga	tcaaaacgcc	1380
aagaatacgc	ctyagttcca	ggaagagtat	ccagtcgcta	cgtttggctt	tcagagacct	1440
ggccagaact	ttagaccact	gcagattaat	tactctgacc	ctggtatggt	tacttggac	1500
gaaccgaggg	atacttaccr	gccgaagtgg	gtggtgatcc	cggaaagatta	tactgagaaa	1560
gaatgggtgt	actttggtct	cacgatagaa	ggaatcagtg	cgcgtactgg	cgtcatccg	1620
attcaccttc	acggccatga	cttcgctctt	ctgcaacaag	aagagaacca	aacctacgac	1680
ccaagcaggc	tttaacttgas	gcttgataat	cccccaagac	gtgatgtcgt	tctgctaccc	1740
cgcaatggct	ttgtagtgat	tgcgttcaag	gccgataacc	cgggtatctg	gcttatgccc	1800
tgtaacattg	cgcgccatgc	ctctgaaggg	ttggctatgc	aggtcttggc	gagacagggc	1860
gattogaata	agttgttccc	tgttggatcg	ccccaatatga	ttgagggcaga	gaggggttct	1920
aaagtttggg	agaogtggat	ggatggggag	aaggatttct	ttgaggggtga	ctctgggtatt	1980
tca						1983

<210> 4

<211> 660

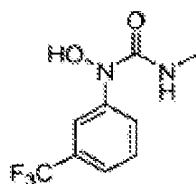
<212> PRF

<213> *Fusarium verticillioides*

<400> 4
Met Ala Leu Ile Glu Arg Val Trp His Ala Cys Val Ser Ile Val Ala
1 5 10 15
Trp Leu Thr Met Trp Pro Thr Ser Pro Ser Thr Ser Tyr Gln His Pro
20 25 30
Leu Arg Pro Asn His Pro His Thr His Ile Glu Asp Pro Ser Pro Gly
35 40 45
Phe Pro Ile Phe His Pro Pro Pro Gly Asp His Glu Phe Leu Cys Glu
50 55 60
Tyr Pro Glu Met Thr Gly Phe Val Gln Cys Ser Ile Pro Glu Asn Arg
65 70 75 80
Glu Cys Trp Leu Arg His Pro Asp Gly Arg Glu Phe Asn Ile His Thr
85 90 95
Asn Tyr Glu Asn Phe Ala Pro Lys Gly Ile Met Arg His Tyr Thr Leu
100 105 110
Asn Ile Thr Glu Ser Trp Tyr Asn Ala Asp Gly Gln Asn Phe Thr Glu
115 120 125
Ala Lys Leu Phe Asn Gly Glu Tyr Pro Gly Pro Trp Leu Glu Ala Cys
130 135 140
Trp Gly Asp Thr Phe Asn Ile Thr Val Ile Asn Ser Met Lys Arg Asn
145 150 155 160
Gly Thr Ser Ile His Trp His Gly Ile Arg Gln Asn Gln Thr Met Asp
165 170 175
Met Asp Gly Val Asn Gly Ile Thr Gln Cys Pro Ile Ala Pro Gly Asp
180 185 190
Ser Phe Ser Tyr Ile Phe Asn Thr Thr Gln Tyr Gly Thr Ser Trp Tyr
195 200 205
His Ser His Tyr Ser Val Gln Tyr Ala Asp Gly Leu Gln Gly Pro Ile
210 215 220
Thr Ile His Gly Pro Gln Ser Ala Pro Tyr Asp Ala Thr Lys Arg Pro
225 230 235 240
Leu Leu Met Thr Asp Trp Ser His Glu Ser Ala Phe Arg Leu Leu Phe
245 250 255
Pro Gly Ser Gln Phe Ser Asn Lys Thr Ile Leu Leu Asn Gly Ala Gly
260 265 270
Asn Val Ser His Tyr Gly Tyr Thr Pro Thr Leu Pro Ile Pro Asp Asn
275 280 285
Tyr Glu Leu Tyr Phe Asn Lys Thr Pro Thr Asp Lys Pro Thr Arg Pro
290 295 300
Lys Arg Tyr Leu Leu Arg Leu Ile Asn Thr Ser Phe Asp Ser Thr Leu
305 310 315 320
Val Phe Ser Ile Asp Asn His Trp Leu Gln Ile Val Thr Ser Asp Phe
325 330 335
Val Pro Ile Glu Pro Tyr Phe Asn Thr Ser Val Leu Ile Gly Ile Gly
340 345 350
Gln Arg Tyr Asn Val Ile Val Glu Ala Asn Pro Leu Gly Gly Asp Val
355 360 365
Asn Glu Ile Pro Asp Asp Gly Asn Phe Trp Ile Arg Thr Trp Val Ala
370 375 380
Asp Ala Cys Gly Ile Ala Pro Gly Gly Glu Gly Tyr Glu Lys Thr Gly
385 390 395 400
Ile Leu Arg Tyr Asn His Ser Asp Lys Ala Leu Pro Ser Ser Gln Pro
405 410 415

REIVINDICAÇÕES

1. Um polipéptido isolado, contendo: uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 90%, 95%, 97%, 99% ou 100% de homologia com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 4, em que o polipéptido isolado referido contém atividade de lacase, oxida lignina sob condições de pH iguais ou superiores a um pH 8 e retém atividade da lacase por pelo menos mais de 5 minutos a temperaturas iguais ou superiores a 60°C; e, adicionalmente, tem um pH de reação ótimo $\geq 8,0$ na oxidação da siringaldazina (SGZ) à temperatura ambiente e/ou tem um pH de reação ótimo de 8,0 na oxidação de



(Mediador 71) à temperatura ambiente.

2. O polipéptido isolado da reivindicação 1, contendo pelo menos uma substituição de um aminoácido, em que a posição de pelo menos uma substituição na SEQ ID NO: 4 é selecionada a partir do grupo constituído pelo resíduo de aminoácidos 162, 163, 164, 166, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 208, 210, 212, 213, 214, 215, 216, 218, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 351, 352, 353, 354, 452, 454, 470, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 540, 541, 542, 545, 546, 547, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 597, 598, 599, 603, 604, 605, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 616, 618, 619, e 620, ou qualquer combinação dos mesmos.

3. O polipéptido isolado da reivindicação 1 e da reivindicação 2, não contendo o péptido de sinalização associado.

4. O polipéptido isolado da reivindicação 1, contendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 4.

5. Um polinucleótido isolado, contendo: uma sequência com pelo menos 80%, 90%, 95%, 97%, 99% ou 100% de homologia com a sequência de SEQ ID NO: 3, em que o polinucleótido referido codifica um polipéptido que tem atividade de lacase, oxida lignina sob condições de pH iguais ou superiores a um pH 8 e retém atividade de lacase por pelo menos cerca de 5 minutos a temperaturas iguais ou superiores a 60°C; e que tem, adicionalmente, um pH de reação ótimo $\geq 8,0$ na oxidação de SGZ à temperatura ambiente e/ou tem um pH de reação ótimo de 8,0 na oxidação do Mediador 71 à temperatura ambiente.

6. O polinucleótido isolado da reivindicação 5, em que o polinucleótido isolado referido contém a sequência que codifica o polipéptido da SEQ ID NO: 4.

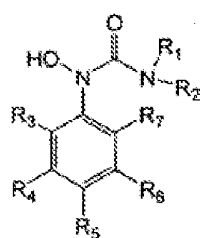
7. O polipéptido isolado da reivindicação 1 ou o polinucleótido isolado da reivindicação 5, em que o polipéptido isolado ou o polipéptido codificado tem um pH de reação ótimo de $\geq 8,0$ na oxidação de SGZ à temperatura ambiente.

8. O polipéptido isolado da reivindicação 1 ou o polinucleótido isolado da reivindicação 5, em que o polipéptido isolado ou o polipéptido codificado tem um pH de reação ótimo de 8,0 na oxidação do Mediador 71 à temperatura ambiente.

9. O polipéptido isolado da reivindicação 1 ou o polinucleótido isolado da reivindicação 5, em que o polipéptido isolado ou o polipéptido codificado tem um pH de reação ótimo de $\geq 8,0$ na oxidação de SGZ à temperatura ambiente e um pH de reação ótimo de 8,0 na oxidação do Mediador 71.

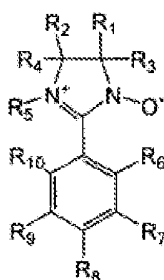
10. Um método para mediar a oxidação de um substrato fenólico ou aromático, compreendendo:

a colocação em contato do substrato fenólico com um mediador, em que o referido mediador é um composto representado pela Fórmula I ou pela Fórmula II, onde a Fórmula I é representada por



Fórmula I

em que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , e R_6 , são selecionados independentemente a partir do grupo constituído por H, CH_3 , CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, CH_3 , alquilo, arilo, fenilo, CF_3 , $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, $\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$, CH_2CH_3 , $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, COOH , OCH_3 , OH , OCF_3 , NH_2 , $\text{NH}(\text{CH}_3)$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, CH_2NH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, Br e Cl, onde a Fórmula II é representada por

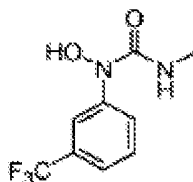


Fórmula II

em que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , e R_{10} são selecionados independentemente a partir do grupo constituído por H, CH_3 , CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, CH_3 , alquilo, arilo, fenilo, CF_3 , $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, $\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$, CH_2CH_3 , $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, COOH , OCH_3 , OH , OCF_3 , NH_2 , $\text{NH}(\text{CH}_3)$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, CH_2NH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, Br e Cl, compreendendo, além disso, contacto entre o substrato fenólico ou aromático referido e uma lacase selecionada a partir do grupo constituído por:

- a) um polipéptido isolado contendo a sequência SEQ ID NO: 4; e
- b) um polipéptido isolado com pelo menos 80% de homologia com a sequência SEQ ID NO: 4, em que o polipéptido isolado referido contém atividade de lacase, oxida lignina sob condições de pH iguais ou superiores a um pH 8 e retém atividade da lacase por pelo menos mais de 5 minutos a temperaturas iguais ou superiores a 60°C ; e, adicionalmente, tem um pH de reação ótimo $\geq 8,0$ na oxidação de SGZ à temperatura ambiente e/ou tem um pH de reação ótimo de 8,0 na oxidação do Mediador 71 à temperatura ambiente.

11. O método da reivindicação 10, em que o mediador é



12. Método da reivindicação 10 ou reivindicação 11, compreendendo, além disso, o contacto entre o substrato fenólico ou aromático e um mediador selecionado a partir do grupo constituído por: ácido violúrico; 2,6,6,-tetrametilpiperidina-1-ilóxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol

(HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxiftalimida, 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); e ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHB); ou qualquer combinação dos mesmos.

13. Um método de deslignificação de uma composição contendo lignina, compreendendo:
o contato entre o substrato fenólico referido e o polipéptido isolado da reivindicação 1.

14. Um método de oxidação de uma composição contendo uma fibra, compreendendo:
o contato entre a composição referida e o polipéptido isolado da reivindicação 1.

15. Um método de branqueamento de uma composição contendo pasta ou papel, compreendendo:
o contato entre a composição referida e o polipéptido isolado da reivindicação 1.

Lisboa, 9 de Janeiro de 2012

Oxidação do Mediador 71 por Lacase de Trametes a pH 8

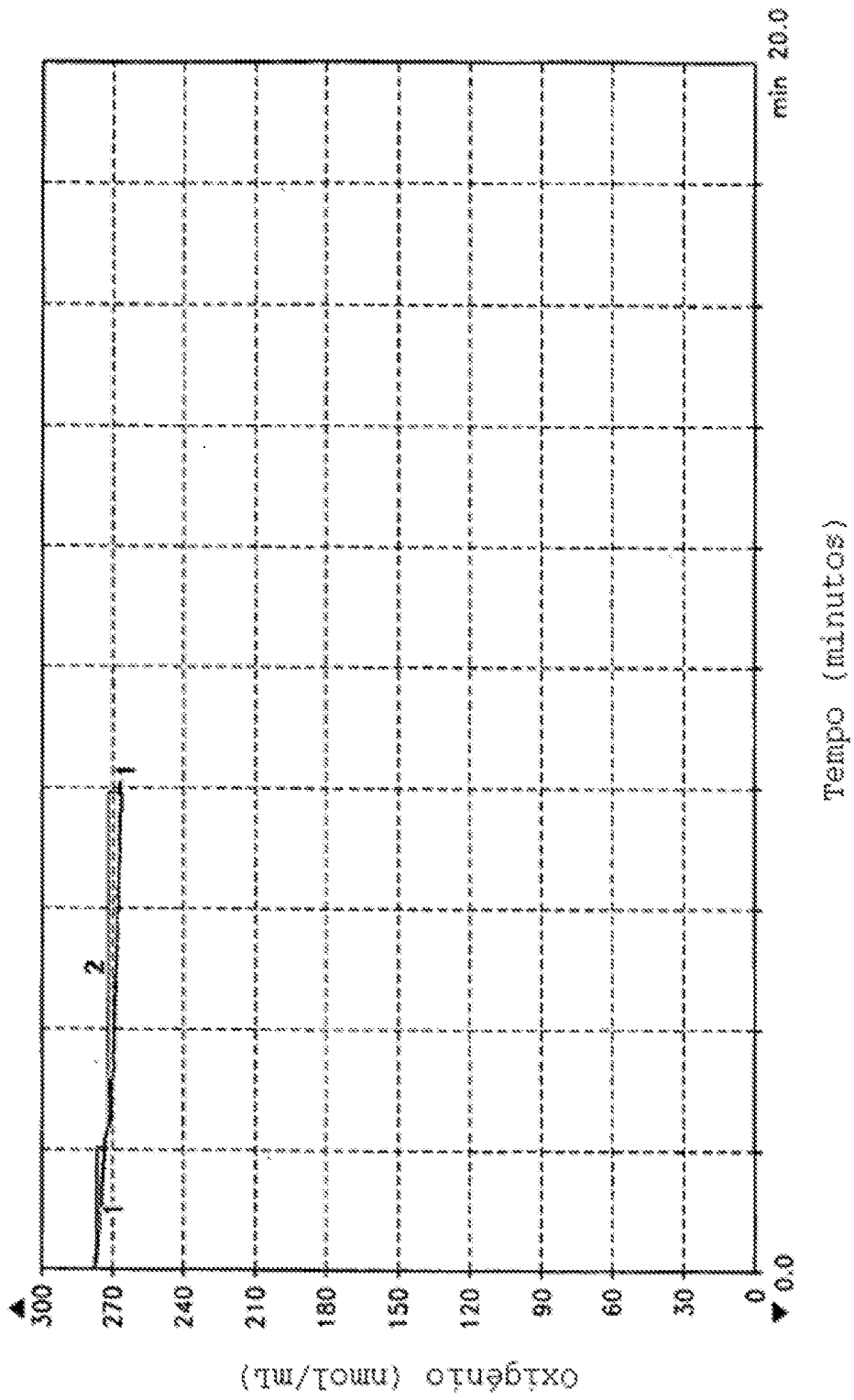


Figura 1

Oxidação do Mediador 71 por lacase BD22559 a pH 8

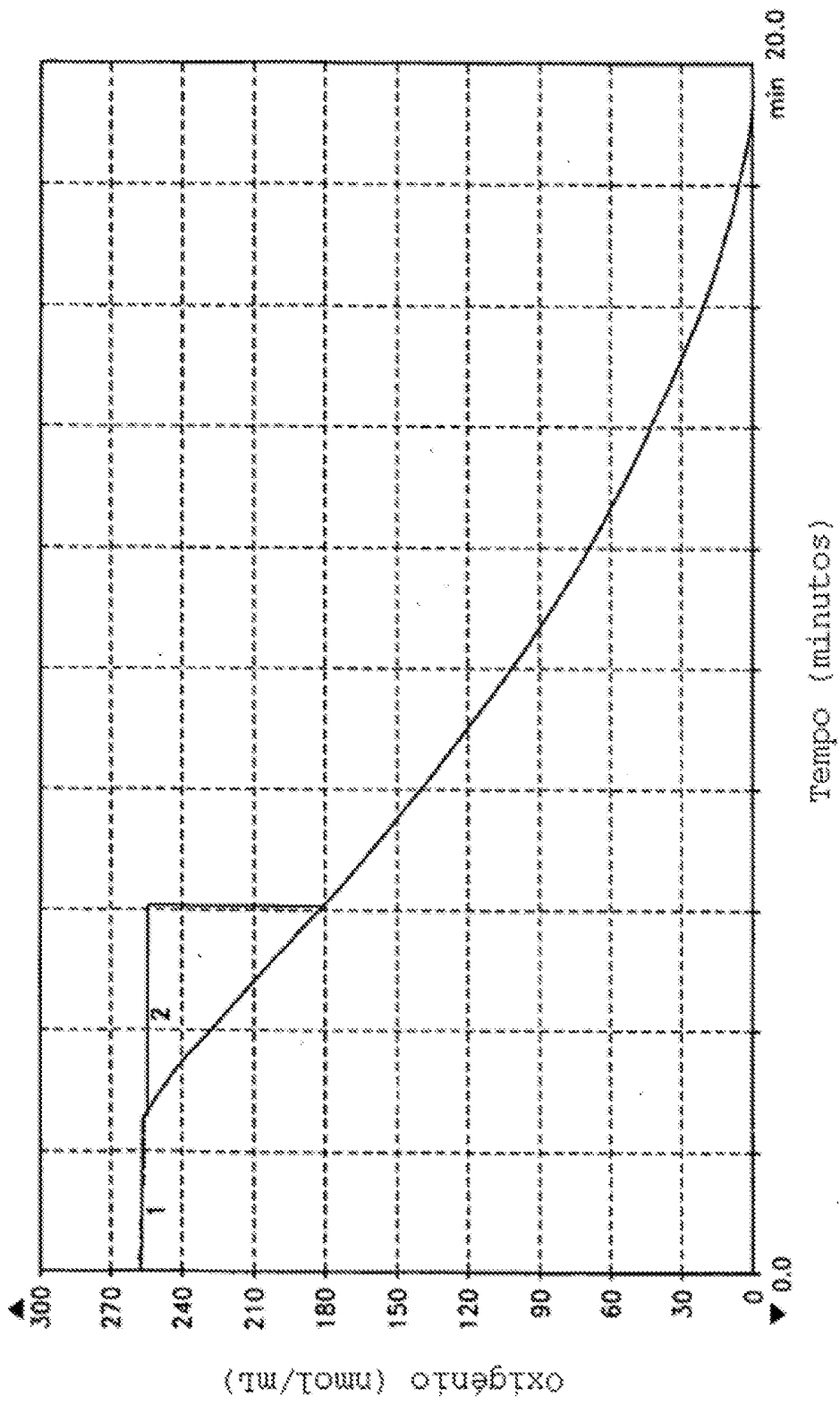


Figura 2

Oxidação do Mediador 71 por lacase BD22865 a pH 8

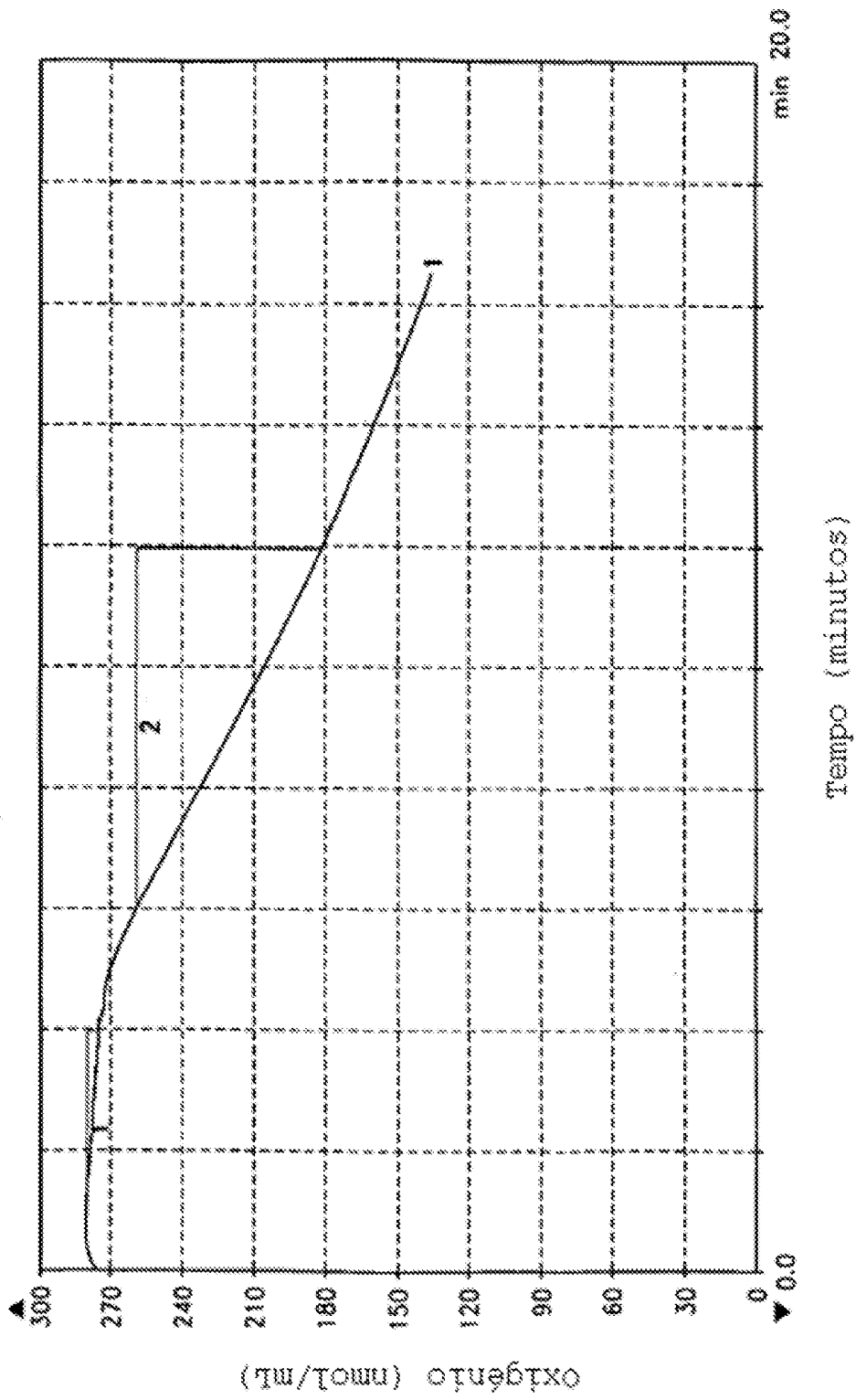


Figura 3

Perfis de pH das lacases Trametes, BD22449,
e BD22865 no Mediador 71

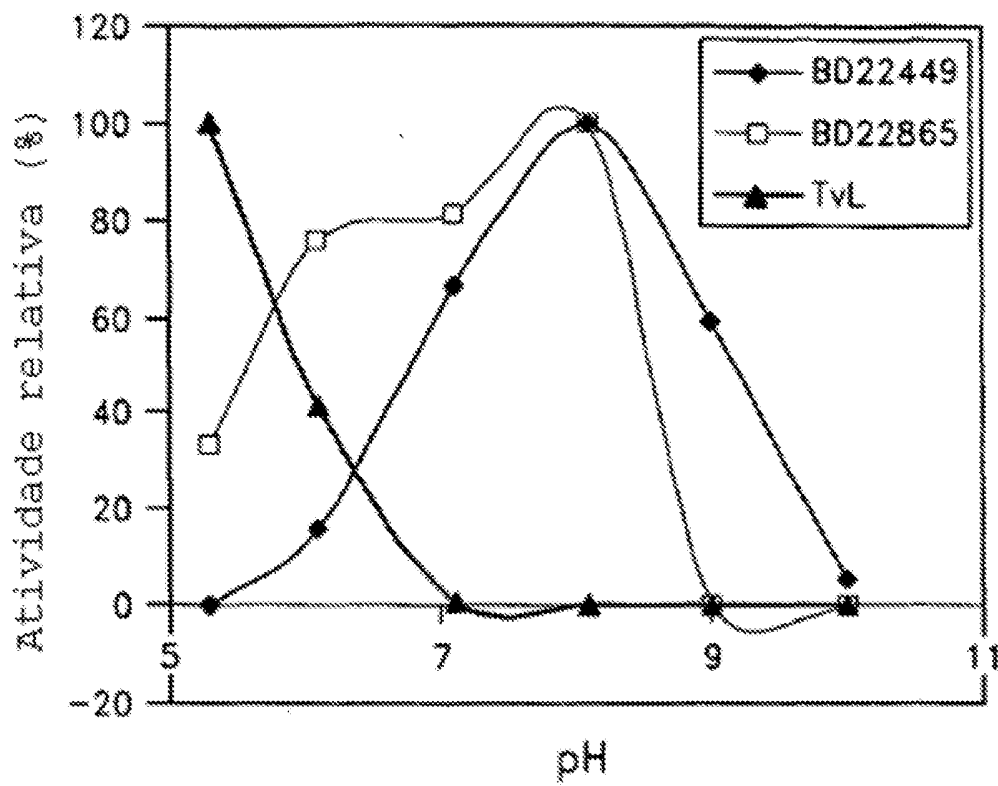


Figura 4

Tolerância térmica e atividades ABTS residuais

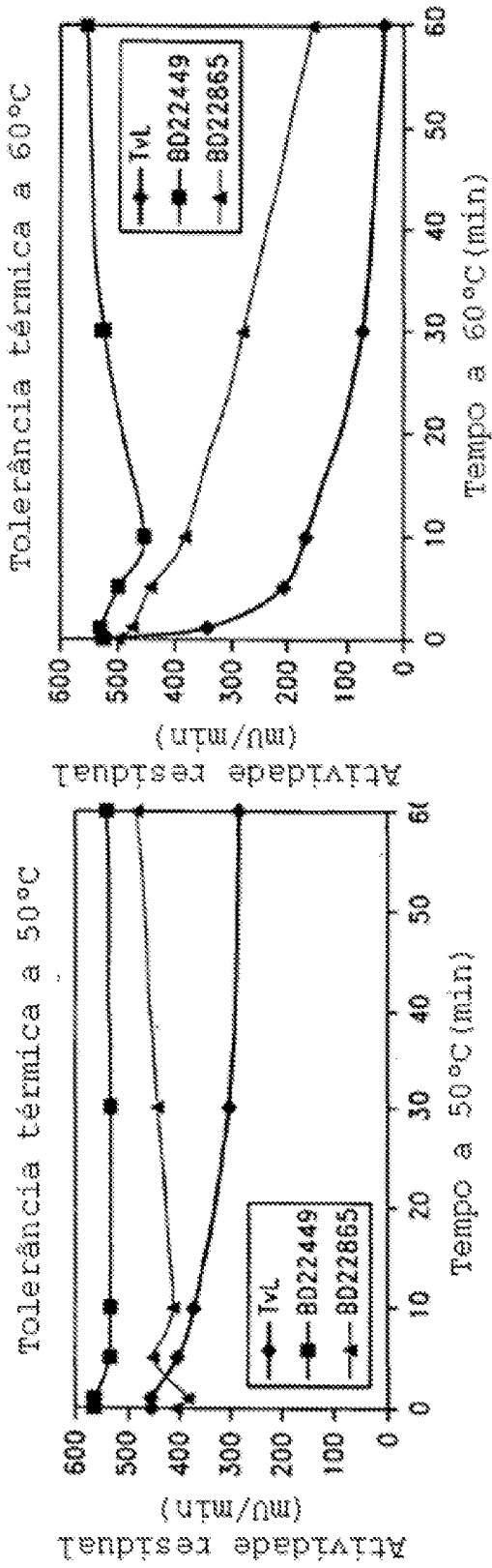


Figura 5A

Figura 5B

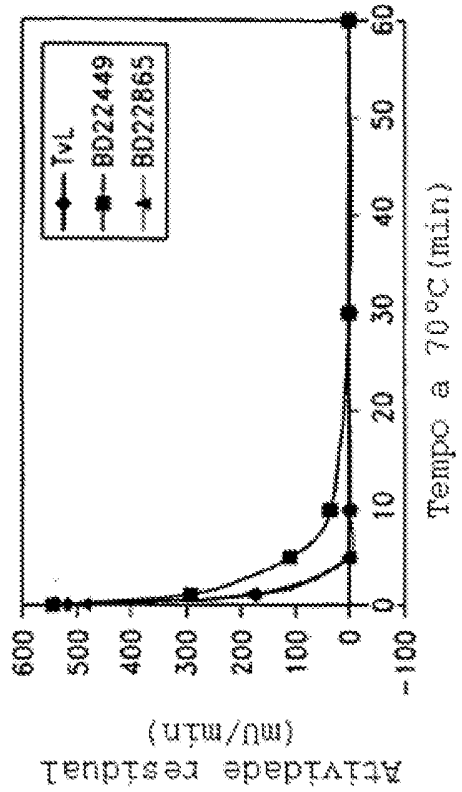


Figura 5C

Cinética do Mediador 71
oxidação a pH 8, temperatura ambiente

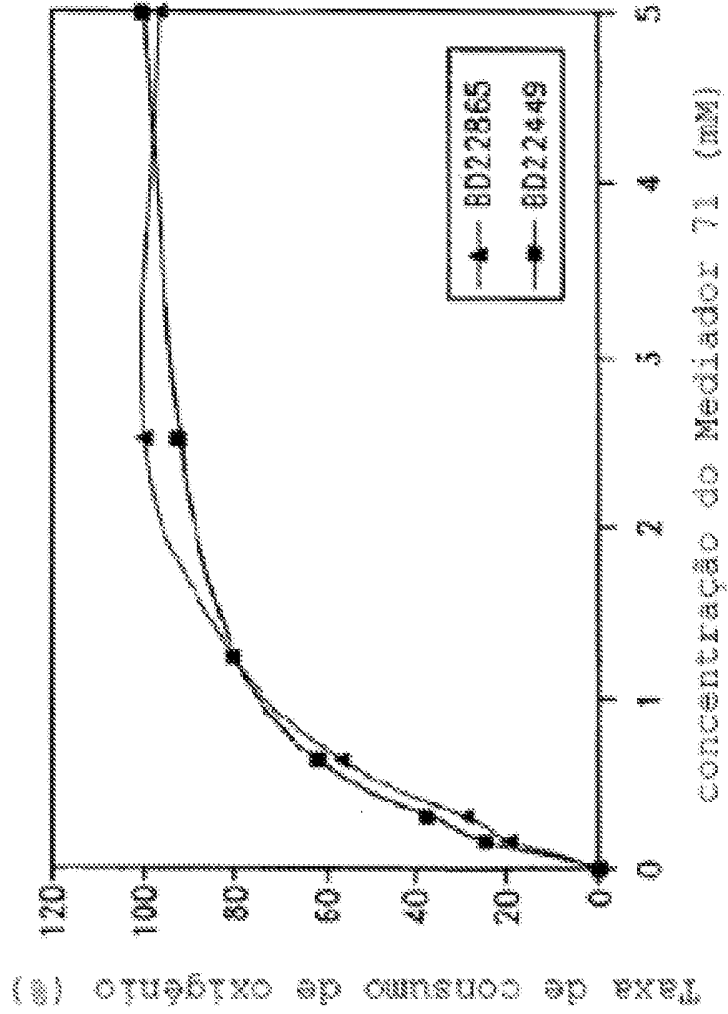


Figura 6