

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
27 de mayo de 2010 (27.05.2010)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/058057 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 9/02 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2009/070516

(22) Fecha de presentación internacional:

19 de noviembre de 2009 (19.11.2009)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200803322

21 de noviembre de 2008 (21.11.2008)

ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (90%)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) (10%)** [FR/FR]; 147, Rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **CAMARERO FERNÁNDEZ, Susana** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **CAÑAS PORTILLA, Ana Isabel** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **MARTÍNEZ FERRER, Ángel** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **PLOU GASCA, Francisco José** [ES/ES]; Instituto De Catálisis Y Petroleoquímica (ICP), Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **BALLESTEROS OLMO, Antonio** [ES/ES]; Instituto De Catálisis Y Petroleoquímica (ICP), Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, María Jesús** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **RECORD, Éric** [FR/FR]; L'institut National De La Recherche

Agronomique (INRA), 147, Rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR). **ASTHER, Marcel** [FR/FR]; L'institut National De La Recherche Agronomique (INRA), 147, Rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR). **ALCALDE GALEOTE, Miguel** [ES/ES]; Instituto De Catálisis Y Petroleoquímica (ICP), Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

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

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

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: LACCASES HAVING HIGH REDOX POTENTIAL OBTAINED THROUGH DIRECTED EVOLUTION

(54) Título : LACASAS DE ALTO POTENCIAL REDOX OBTENIDAS POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA

(57) Abstract: Method for generating extracellular, functional and soluble laccases having high redox potential and improved activity towards one or more substrates, sequences encoding said laccases, and uses.

(57) Resumen: Método para generar lacasas de alto potencial redox, extracelulares, funcionales y solubles con actividad mejorada hacia uno o más sustratos, secuencias que codifican dichas lacasas, y usos.



WO 2010/058057 A1

LACASAS DE ALTO POTENCIAL REDOX OBTENIDAS POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA.

La invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular, la tecnología del ADN recombinante y la biotecnología. Específicamente se refiere a enzimas oxidasas de tipo lacasa mejoradas en su expresión funcional y actividad catalítica, sus usos y el procedimiento para su obtención. La expresión funcional y mejora de actividad de las lacasas se lleva a cabo en células eucariotas de *Saccharomyces cerevisiae* a través de un proceso de evolución molecular dirigida. Dichas enzimas pueden emplearse como catalizadores en procesos industriales relacionados con la transformación de la biomasa lignocelulósica para la obtención de biocombustibles o la elaboración de productos de madera y papel con nuevas propiedades, para el sector alimentario, la producción textil y el sector químico, así como para la biorremediación de efluentes y contaminantes ambientales.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son un grupo de oxidasas ampliamente distribuido en plantas superiores y en hongos, aunque también se han descrito en algunas bacterias e incluso en cutículas de insectos (Alcalde, 2007. *En: Industrial enzymes. Structure, function and applications*. Ed. Polaina, J. y MacCabe, A.P. Springer, Heidelberg (Alemania), pp. 459-474). Pertenecen a la familia de las oxidasas multicobre azul (junto con las ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina), y se presentan generalmente como glicoproteínas monoméricas extracelulares.

Las lacasas, individualmente, catalizan la oxidación de un amplio espectro de sustancias orgánicas aromáticas. Entre ellas se encuentran los orto y para-difenoles, los fenoles metoxi-substituidos, los bencenotioles, los hidroxindoles, el 1-naftol y la siringaldazina (Gianfreda *et al.*, 1999. *Bioremediation Journal* 3:1-25). Los radicales libres resultantes sufren

diferentes reacciones dependiendo de su estructura y de las condiciones de reacción. El acoplamiento de radicales libres generando productos diméricos o poliméricos y las descarboxilaciones oxidativas son las reacciones más frecuentes. También son sustratos de lacasas los compuestos metálicos inorgánicos/orgánicos. El Mn^{2+} es oxidado a Mn^{3+} y también el $Fe(EDTA)^{2-}$ es aceptado por la enzima (Thurston, 1994. *Microbiology-UK* 140:19-26).

La oxidación de todos estos sustratos va acoplada a la reducción del oxígeno molecular a dos moléculas de agua. Esto significa que por cada molécula de oxígeno reducida, se oxidan 4 moléculas de sustrato sin producir peróxido de hidrógeno. Por estos motivos, las lacasas se consideran como los catalizadores “verdes” ideales ya que emplean O_2 como co-sustrato generando únicamente H_2O como subproducto.

Las lacasas contienen un cobre de tipo 1 (T1) donde tiene lugar la oxidación del sustrato reductor, y un centro o *cluster* trinuclear con tres cobres, un T2 y dos T3, donde tiene lugar la reducción del O_2 . El mecanismo de reacción debe funcionar como una batería, almacenando electrones de las reacciones de oxidación individuales para reducir el oxígeno molecular y producir agua (Davies, 2002. Laccase. *En: Handbook of Metallproteins*. (ed A. Messerschmidt *et al*), pp. 1359-1368. John Wiley and Sons, LTD, New York).

El potencial redox formal (E°) de las lacasas tiene una relación directa con la energía requerida para arrancar un electrón al sustrato reductor, constituyendo una de las características fundamentales de estas enzimas. De hecho, el comportamiento catalítico de las lacasas sobre la mayoría de los sustratos reductores depende del E° en el Cu T1 (aceptor de electrones). De este modo, las lacasas con un mayor E°_{T1} son de especial interés en biotecnología debido a que son capaces de oxidar sustratos con mayor E° como ciertos hidrocarburos aromáticos policíclicos o diversos colorantes orgánicos sintéticos. El E° de diferentes lacasas ha sido

ampliamente estudiado mediante técnicas espectroelectroquímicas (principalmente voltamperometría cíclica y valoraciones redox) haciendo uso de diferentes tipos de electrodos y mediadores redox (Xu, F. *et al.*, 1998. *Biochem. J.* 334:63-70; Shleev, S.V. *et al.* 2004. *Biochimie* 86:693-703).

El E°_{T1} del Cu T1 de algunas lacasas fúngicas es mayor (E°_{T1} cercano a +800 mV) que el de las lacasas de plantas o bacterianas (por ejemplo la lacasa de *Rhus vernicifera* tiene un E°_{T1} = +400 mV) y otras oxidasas multicobre azul (ascorbato oxidasa E°_{T1} = +340 mV). Sin embargo, es importante señalar que también existen marcadas diferencias en los E°_{T1} de las diferentes lacasas fúngicas, desde +465 mV de la lacasa del ascomiceto *Myceliophthora thermophila* hasta +790 mV de la lacasa del basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus*. En este sentido, se ha realizado un enorme esfuerzo con la intención de dilucidar qué factores determinan estas diferencias en los E°_{T1} , sobre todo si se tienen en cuenta las geometrías de coordinación de los sitios de Cu, prácticamente conservadas. La mayor parte de estos estudios físico-químicos se ha servido del conocimiento aportado por los modelos cristalográficos disponibles. En concreto se ha resuelto a fecha de hoy las estructuras en 3D de 5 lacasas de *Coprinus cinereus*, *Melanocarpus albomyces*, *Bacillus subtilis*, *Trametes versicolor* y *Pycnoporus cinnabarinus*.

Las lacasas de alto potencial redox -procedentes de hongos basidiomicetos de podredumbre blanca- poseen un enorme potencial biotecnológico debido a su amplia especificidad de sustrato (oxidán fenoles, aminas, tioles, antraceno, etc), y sus bajos requerimientos de aplicación (sólo requieren oxígeno, que es transformado en agua durante la reacción). Cuando actúan sobre el polímero de lignina (o compuestos de tipo fenólico) pueden catalizar tanto actividades de degradación como de polimerización. Además, su rango de sustratos puede ser ampliado a compuestos no fenólicos más difíciles de degradar utilizando mediadores redox, de origen natural o sintético, en los

denominados sistemas lacasa-mediador (Camarero *et al.*, 2005. *Appl. Environ. Microb.* 71:1775-1784).

La tecnología de las lacasas de alto potencial redox puede ser empleada en prácticamente la totalidad de la cadena de producción de productos papeleros: la elaboración de la pasta de papel, el blanqueo libre de cloro de las pastas, la eliminación del *pitch* o el tratamiento de efluentes. En la industria de productos forestales dos áreas más de investigación emergentes son a) el diseño de materiales lignocelulósicos con nuevas propiedades de resistencia y estabilidad mediante el injerto de compuestos fenólicos catalizado por lacasa, en la denominada “funcionalización de las fibras de celulosa”; y b) el uso de lacasas para la mejora en la adhesión de tableros de madera (mediante el acoplamiento enzimático *in situ* de la lignina), sin necesidad de utilizar adhesivos tóxicos a base de formaldehído.

Además las lacasas encuentran aplicaciones en los siguientes sectores (Xu, 2005. *Industrial Biotechnology* 1:38-50):

- i) La industria alimentaria: procesamiento de bebidas o de productos de panadería.
- ii) La industria textil: degradación (detoxificación) de los colorantes de los efluentes o blanqueo de tejidos (lavado a la piedra de *jeans*).
- iii) Nanobiotecnología: a) como detectores de fenoles, oxígeno, azidas, morfina, codeína, catecolaminas o flavonoides en la elaboración de biosensores para análisis clínicos y medioambientales; y b) elaboración de biopilas de combustible que ofrecen energía eléctrica limpia (sin utilizar combustibles fósiles) mediante la inmovilización de lacasas en el cátodo.
- iv) Biorremediación: degradación de PAHs, compuestos AOX, etc.
- v) Síntesis química: a) producción de polímeros complejos (ej. policatecol para resinas de cromatografía); b) síntesis de agentes farmacológicos: antitumorales (ej. viblastina), nuevos derivados

antibióticos (ej de la ciclosporina A), o colorantes (Suberasa® de Novozymes); c) cosméticos: tintes de cabello formulados con lacasa.

La aplicación de las lacasas a nivel industrial requiere de sistemas de expresión robustos que proporcionen altos niveles de enzima activa. El empleo de sistemas de expresión heterólogos posibilita la producción de lacasas de diferentes procedencias en un mismo hospedador, así como de nuevas variantes con propiedades mejoradas con respecto a la enzima salvaje.

Por este motivo, se ha estudiado en profundidad la expresión heteróloga de lacasas fúngicas en hospedadores eucariotas (Kunamini *et al. Microbial Cell Factories*. In press. 2008). Se ha realizado especial hincapié en sistemas de expresión basados en hongos filamentosos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae* y *Trichoderma reesei*); y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolicus*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces fragilis*). Gracias a los avances obtenidos en el diseño de biorreactores y a la optimización de las condiciones de expresión en levaduras, se han alcanzado niveles de expresión de unos 20 mg de lacasa activa por litro de cultivo en *Yarrowia lipolytica* o *Pichia pastoris*. Estos niveles son significativamente inferiores a los 135 mg/L obtenidos en *Aspergillus oryzae* o los 920 mg/L en *Trichoderma*. Sin embargo, la elección de levaduras como *S. cerevisiae* como hospedador ofrece la valiosa ventaja de poder mejorar las propiedades catalíticas de las lacasas recombinantes o su estabilidad en las condiciones de operación, mediante técnicas de evolución molecular dirigida.

Se ha estudiado la expresión en *S. cerevisiae* de lacasas de los hongos *Coriolus hirsutus*, *Trametes versicolor*, *Melanocarpus albomyces*, *Trametes* sp. strain C30, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus coccineus* y *Pleurotus eryngii*, aunque los niveles de expresión funcional detectados han sido

mínimos (Kunameni *et al.*, 2008. *Microbial Cell Factories*. In press). No obstante, la expresión funcional de lacasas fúngicas en *S. cerevisiae* puede ser incrementada significativamente mediante técnicas de evolución molecular dirigida, que permite el diseño de nuevas funciones enzimáticas no existentes en ambientes naturales o la mejora de ciertas propiedades de la enzima (Arnold, 2001. *Nature* 409:253-257). Esta metodología recrea en el laboratorio los procesos claves de la evolución natural (mutación, recombinación y selección) de manera que es posible diseñar enzimas de gran interés científico y tecnológico. De esta manera, sometiendo los genes seleccionados a ciclos sucesivos de evolución molecular, las diferentes mutaciones puntuales beneficiosas se irán acumulando y combinando hasta adquirir la propiedad deseada, que se ve mejorada de manera exponencial, generación tras generación. Utilizando este procedimiento se consiguió incrementar hasta 18 mg/L la producción de lacasa del ascomiceto *Myceliophthora thermophila* en *S. cerevisiae* (Bulter *et al.*, 2003. *Appl. Environ. Microb.* 69: 987-995. 2003).

En la evolución *in vitro*, mediante mutagénesis aleatoria inducida y/o recombinaciones en el material genético que codifica para una o varias proteínas, se crea una diversidad genética que posteriormente se expresa y explora bajo las condiciones en las que se quiere mejorar la enzima (altas temperaturas o medios no convencionales, pHs extremos, etc.). La mayoría de las características enzimáticas -regioespecificidad, enantioespecificidad, termoestabilidad, estabilidad en disolventes orgánicos, expresión génica, incluso la búsqueda de actividades *de novo* en el caso de anticuerpos catalíticos- pueden ser sometidas a experimentos de evolución dirigida (Tao & Cornish, 2002. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6:858-864.).

Aunque considerando la eficiencia de transformación, la estabilidad del ADN plasmídico y la tasa de crecimiento, *E. coli* es el organismo hospedador más frecuentemente utilizado en la expresión funcional heteróloga de los genes que codifican la proteína de interés, el diferente uso de codones, y la

imposibilidad de realizar las modificaciones post-traduccionales necesarias para la correcta secreción de la proteína madura (como el procesamiento proteolítico o las glicosilaciones) pueden causar un plegamiento inapropiado de la proteína que es acumulada en cuerpos de inclusión, impidiendo su expresión funcional. Esto es especialmente cierto para las lacasas fúngicas para las que no se ha logrado todavía su expresión funcional en *E. coli*. Algunos de estos problemas pueden evitarse si estos genes se expresan en hospedadores eucarióticos cuya maquinaria celular sea más próxima a la nativa, como es el caso de las levaduras. En especial, el uso de *Saccharomyces cerevisiae* es de gran interés ya que posee la habilidad de glicosilar y secretar las proteínas al medio extracelular (lo cual evita en muchos casos pasos intermedios de lisis celular) y tiene una elevada eficiencia de transformación. Además, haciendo uso de un vector episómico adecuado no integra el plásmido dentro de su genoma, facilitando así su posterior manipulación. Otra ventaja muy interesante desde un punto de vista evolutivo es su elevada frecuencia de recombinación de ADN, la cual a diferencia de *E. coli* permite la construcción de genotecas *in vivo* a través de la recombinación homóloga de diferentes genes (conocido como *in vivo* ADN *shuffling* o “barajeo”). Por último, la ligación de los genes mutados en vectores de expresión es, en muchos casos, un paso laborioso que requiere un ajuste fino. En levaduras, el mecanismo reparador de huecos (*in vivo gap repair*) puede sustituir la ligación *in vitro* de una manera rápida y precisa (Bulter & Alcalde, 2003. Directed evolution: library creation. Methods and protocols. Ed. Arnold, F.H. y Georgiou, G. Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU), pp. 17-22.).

La evolución molecular dirigida de lacasas fúngicas presenta como requisito indispensable la expresión funcional de la enzima en *Saccharomyces cerevisiae*. La expresión funcional en *S. cerevisiae* de lacasas de alto potencial redox -procedentes de basidiomicetos- no se ha descrito con éxito hasta el momento. Únicamente se ha reportado la mejora por evolución dirigida de lacasas de bajo potencial de oxido-reducción por nuestro grupo y

colaboradores. Dichos trabajos se han centrado en la lacasa de bajo potencial redox ($E^{\circ}_{T1} = +475$ mV) del ascomiceto *Myceliophthora thermophila*. En estos trabajos, los niveles de expresión funcional en *S. cerevisiae* se lograron beneficiándose de la similitud existente entre el microorganismo de partida (*Myceliophthora thermophila*) y *S. cerevisiae*, ambos ascomicetos. Con este sistema se ha conseguido mediante evolución dirigida: i) su expresión funcional en *S. cerevisiae*, (Bulter *et al.*, 2003. *Appl. Environ. Microb.* 69: 987-995.); y ii) su estabilización en cosolventes orgánicos, (Zumarraga *et al.*, 2007. *Chem. Biol.* 14: 1052-1064.; Zumarraga *et al.*, 2008. *Proteins* 71: 250-260.; Zumarraga *et al.*, 2007 *Biocatal. Biotrans.* 25: 219-228; Alcalde *et al.*, 2005. *J. Biomol. Screen.* 10: 624-631).

Dado que el rango de actuación de la lacasa evolucionada de *Myceliophthora thermophila* está limitado por su bajo potencial redox ($E^{\circ}_{T1} = +475$ mV) que le impide catalizar eficientemente la oxidación de moléculas con potenciales redox superiores al suyo, las lacasas de alto potencial redox producidas por hongos basidiomicetos de podredumbre de la madera suponen un punto de partida más adecuado para la mejora de las propiedades de la lacasa por evolución dirigida debido a su mayor aplicabilidad biotecnológica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a polipéptidos o proteínas generadas mediante varios métodos de evolución dirigida de las secuencias polinucleotídicas que comprenden el gen de la lacasa de alto potencial redox ($E^{\circ}_{T1} = +790$ mV) del hongo basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus*, y la secuencia codificante de la secuencia señal nativa del factor α , dando lugar a una expresión funcional mejorada en *S. cerevisiae* y/o a una actividad enzimática aumentada hacia uno o más sustratos.

Todos los polinucleótidos y polipéptidos descritos en la presente invención se resumen en la Tabla 1.

SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS				SECUENCIAS AMINOACÍDICAS			
Secuencia señal del factor alfa		Secuencia de lacasa madura		Secuencia señal del factor alfa		Secuencia de lacasa madura	
SEQIDnº	VARIANTE	SEQIDnº	VARIANTE	SEQIDnº	VARIANTES	SEQIDnº	VARIANTES
22 ^a	3D3	2 ^e	1D12	21	3D3,19C8,2D8	1	1D12,3D3
24	20C7	4	3G10	23	20C7	3	3G10
26 ^b	5F7	6 ^f	20C7	25	5F7,3G10	5	20C7,5D3,9C3
28 ^c	1C9	8	10A7	27	1C9,1F10,1D12	7	10A7
30 ^d	7A9	10	1F10	29	7A9,17B7,9C3,5D3,10A7	9	1F10
32 ^b	Seq factor alfa nativo	12	1C9	31	Seq factor alfa nativo	11	1C9
42	Seq señal de PcL nativo	14	19C8	41	Seq señal de PcL nativo	13	19C8
47 ^a	19C8	16	7A9			15	7A9
48 ^a	2D8	18 ^g	5F7			17	5F7,2D8
49 ^b	3G10	20	17B7			19	17B7
50 ^c	1F10	34	PcL madura nativa			33	PcL madura nativa
51 ^c	1D12	43 ^e	3D3				
52 ^d	17B7	44 ^f	5D3				
53 ^d	9C3	45 ^f	9C3				
54 ^d	5D3	46 ^g	2D8				
55 ^d	10A7						

Tabla 1. Polinucleótidos y polipéptidos de la invención. Se indica con letra en superíndice aquellos mutantes que comparten idéntica secuencia aminoacídica, tanto para las secuencias nucleotídicas del factor alfa como para las secuencias nucleotídicas de las lacasas maduras.

Así, en un primer aspecto de esta invención se proporciona un polinucleótido que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 29.

Los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19 corresponden a variantes de la

lacasa nativa de *Pycnopus cinnabarinus* (la lacasa nativa de *Pycnopus cinnabarinus* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 33), obtenidas mediante un proceso de evolución dirigida, cuya actividad catalítica y/o expresión funcional ha sido mejorada mediante un procedimiento de evolución molecular dirigida.

Los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 29 corresponden a variantes de la secuencia codificante de la secuencia señal nativa del factor α (secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 31) con mutaciones introducidas mediante un proceso de evolución dirigida para mejorar la expresión de polipéptidos a los que se encuentran operativamente enlazados.

Por tanto, los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19 podrán dar lugar a lacasas cuya actividad catalítica y/o expresión funcional ha sido mejorada, mientras que los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 29, mejoraran la expresión de los polipéptidos a los que se encuentran operativamente enlazados, particularmente lacasas.

Así, en otro aspecto de esta invención se proporciona un polinucleótido que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la

SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante primer polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 1.

El primer polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipetídica se recoge en la SEQ ID NO: 1, secuencia que presentan los mutantes 1D12 y 3D3 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 2 ó la SEQ ID NO: 43, o en sus cadenas complementaria,
- b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de (a),
- c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante segundo polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 3.

El segundo polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipetídica se recoge en la SEQ ID NO: 3, secuencia que presenta el mutante 3G10 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica

aislada que consiste en la SEQ ID NO: 4, o en su cadena complementaria,

b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante tercer polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 5.

El tercer polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipetídica se recoge en la SEQ ID NO: 5, secuencia que presentan los mutantes 20C7, 5D3 y 9C3 de los ejemplos de la invención y que corresponde a:

a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 44 o la SEQ ID NO: 45, o en sus cadenas complementarias,

b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante cuarto polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 7.

El cuarto polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante

de una variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipéptica se recoge en la SEQ ID NO: 7, secuencia que presenta el mutante 10A7 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 8, o en su cadena complementaria,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante quinto polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 9.

El quinto polinucleótido de la invención, constituye la secuencia codificante de una variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipéptica se recoge en la SEQ ID NO: 9, secuencia que presenta el mutante 1F10 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 10, o en su cadena complementaria,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante sexto polinucleótido de la invención,

que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 11.

El sexto polinucleótido de la invención, constituye la secuencia codificante de una variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipetídica se recoge en la SEQ ID NO: 11, secuencia que presenta el mutante 1C9 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 12, o en su cadena complementaria,
- b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante séptimo polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 13.

El séptimo polinucleótido de la invención, constituye la secuencia codificante de una variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipetídica se recoge en la SEQ ID NO: 13, secuencia que presenta el mutante 19C8 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 14, o en su cadena complementaria,
- b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b)

debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante octavo polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 15.

El octavo polinucleótido de la invención, constituye la secuencia codificante de una variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipetídica se recoge en la SEQ ID NO: 15, secuencia que presenta el mutante 7A9 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 16, o en su cadena complementaria,
- b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante noveno polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 17.

El noveno polinucleótido de la invención, constituye la secuencia codificante de una variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipetídica se recoge en la SEQ ID NO: 17, secuencia que presentan los mutantes 5F7 y 2D8 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 46, o en sus

cadenas complementarias,

b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante décimo polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 19.

El décimo polinucleótido de la invención, constituye la secuencia codificante de una variante de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipéptida se recoge en la SEQ ID NO: 19, secuencia que presenta el mutante 17B7 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 20, o en su cadena complementaria,

b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Se reportan, por tanto, las secuencias polinucleotídicas de los mutantes obtenidos por evolución dirigida que codifican para variantes de lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con actividad mejorada.

El organismo *Pycnoporus cinnabarinus* pertenece al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, Phylum *Basidiomycota*, Clase *Agaricomycetes*, Orden *Polyporales*, Familia

Polyporaceae y Género Pycnoporus.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 29.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante undécimo polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 21.

El undécimo polinucleótido de la invención, constituye la secuencia codificante de la secuencia señal del factor α con mutaciones para mejorar la expresión de polipéptidos operativamente enlazados, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 21, secuencia que presentan los mutantes 3D3, 19C8 y 2D8 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO 47 o la SEQ ID NO: 48, o en sus cadenas complementarias,

b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante duodécimo polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 23.

El duodécimo polinucleótido de la invención, constituye la secuencia codificante de la secuencia señal del factor α con mutaciones para mejorar la expresión de polipéptidos operativamente enlazados, cuya secuencia polipetídica se recoge en la SEQ ID NO: 23, secuencia que presenta el mutante 20C7 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 24, o en su cadena complementaria,
- b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante decimotercer polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 25.

El decimotercer polinucleótido de la invención, constituye la secuencia codificante de la secuencia señal del factor α con mutaciones para mejorar la expresión de polipéptidos operativamente enlazados, cuya secuencia polipetídica se recoge en la SEQ ID NO: 25, secuencia que presentan los mutantes 5F7 y 3G10 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 26 o la SEQ ID NO: 49, o en su cadena complementaria,
- b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante decimocuarto polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 27.

El decimocuarto polinucleótido de la invención, constituye la secuencia codificante de la secuencia señal del factor α con mutaciones para mejorar la expresión de polipéptidos operativamente enlazados, cuya secuencia polipetídica se recoge en la SEQ ID NO: 27, secuencia que presentan los mutantes 1C9, 1F10 y 1D12 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 28 la SEQ ID NO: 50 ó la SEQ ID NO: 51, o en sus cadenas complementarias,
- b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido, de ahora en adelante decimoquinto polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 29.

El decimoquinto polinucleótido de la invención, constituye la secuencia codificante de la secuencia señal del factor α con mutaciones para mejorar la expresión de polipéptidos operativamente enlazados, cuya secuencia polipetídica se recoge en la SEQ ID NO: 29, secuencia que presentan los mutantes 7A9, 17B7, 9C3, 5D3 y 10A7 de los ejemplos de la invención, y que corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica

aislada que consiste en la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 52, la SEQ ID NO: 53, la SEQ ID NO: 54 ó la SEQ ID NO: 55, o en sus cadenas complementarias,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

Otro aspecto se refiere a una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante construcción genética de la invención, que comprende, uno de los siguientes tipos de secuencias:

- a. un polinucleótido que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*,
- b. una moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de a), ó
- c. secuencia de nucleótidos de a), ó b), preferiblemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc...

Esta construcción genética incluye los vectores de clonación y expresión que comprenden los polinucleótidos aislados de la invención. Tales vectores de expresión incluyen secuencias de control, tales como, por ejemplo, elementos de control de la traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión). Los vectores conforme a la invención pueden incluir plásmidos y virus, y otros vectores de acuerdo con procedimientos bien conocidos y documentados en la técnica, y pueden expresarse en una variedad de sistemas de expresión diferentes, asimismo bien conocidos y documentados en la técnica.

Se conoce, así mismo, una variedad de técnicas que pueden utilizarse para introducir tales vectores en células procarióticas o eucarióticas (células hospedantes) para su expresión. Técnicas adecuadas de transformación o transfección están bien descritas en la bibliografía.

Un “vector” es un replicón al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido.

Un “replicón” es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleótida dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control.

“Secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificadoras a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal, y señales de terminación; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria

para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

“Unidos de forma operativa” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a una secuencia codificadora está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Un “marco de lectura libre” (ORF) es una región de una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido; esta región puede representar una porción de una secuencia codificadora o una secuencia codificadora completa.

Una “secuencia codificadora” es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe a ARNm y/o se traduce a un polipéptido cuando está bajo control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora se determinan mediante un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificadora puede incluir, pero no se limita a ARNm, ADNc, y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la construcción genética de la invención comprende, además, uno de los siguientes tipos de secuencias;

a) un polinucleótido que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 29, ó

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de a),

operativamente enlazado con un polinucleótido que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*.

Según se muestra en los ejemplos, el mutante 79A presentaría una actividad catalítica y/o expresión funcional superior al resto de los mutantes obtenidos. La secuencia señal del factor α del mutante 79A se recoge en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 29, y la secuencia de la enzima lacasa correspondiente al mutante 79A se recoge en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 15.

Por tanto, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO: 29 se encuentra operativamente enlazado con el polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 15.

La presente invención permite producir, en cantidades hasta ahora no disponibles, lacasas fúngicas de alto potencial redox que presentan una mayor expresión funcional así como una mayor actividad catalítica.

Así, otro aspecto se refiere al uso de los polinucleótidos aislados de la invención y/o de la construcción genética de la invención para producir lacasas fúngicas de alto potencial redox con mayor expresión funcional y/o mayor actividad catalítica

Los polinucleótidos aislados de la invención y/o la construcción genética de la invención pueden introducirse (o transfectarse) en una célula hospedadora. Dicha célula hospedadora puede crecerse en un medio de cultivo adecuado, expresandose la lacasa codificada por los polinucleótidos o construcciones genéticas de la invención.

Tal y como se usa en esta memoria, el término “transfección” se refiere a la introducción o transferencia de una molécula de ácido nucléico exógena en una célula eucariota, incluyendo, pero no limitándose a ella, una molécula de ácido ribonucleico o desoxiribonucleico (por ejemplo, ARN ó ADN desnudo).

Medios de cultivos adecuados son conocidos en el estado de la técnica. Un “hospedador” o “célula hospedadora” o “célula hospedante”, como se emplea en esta memoria, se refiere a un organismo, célula o tejido que sirve como diana o recipiente del polinucleótido que codifica una proteína recombinante de interés, donde la célula hospedadora se transforma con un vector de expresión conteniendo el polinucleótido de interés. En esta memoria, la proteína recombinante de interés es una enzima lacasa de origen fúngico, de alto potencial redox, que presenta una mayor expresión funcional y una mayor actividad catalítica.

Preferiblemente, el hospedador es *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular que pertenece al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Saccharomycotina*, Clase *Saccharomycetes*, Orden *Saccharomycetales*, Familia *Saccharomycetaceae* y Género *Saccharomyces*.

La presente invención comprende, por tanto, variantes de genes y enzimas del grupo de las lacasas fúngicas de alto potencial redox que presentan una mayor expresión funcional en *Saccharomyces cerevisiae* así como una mayor actividad catalítica.

Asimismo, la invención incluye el procedimiento para producir dichos polinucleótidos y enzimas de alto potencial redox, extracelulares, funcionales y solubles con actividad mejorada hacia uno o más sustratos, mediante la metodología de evolución molecular dirigida.

Para ello, se generan miles de mutantes a través de protocolos de creación de diversidad *in vitro* o *in vivo* que contienen mutaciones que pueden ser beneficiosas para la propiedad a potenciar. Los mutantes creados de esta manera pueden ser producidos de manera sencilla en *S. cerevisiae*. Para determinar si la lacasa de interés sintetizada por el sistema de expresión tiene mejoras en su expresión y en sus propiedades funcionales, se emplean test convencionales. Por ejemplo, para determinar si el polinucleótido sometido a evolución dirigida y expresado en un hospedador foráneo produce lacasas con actividad mejorada, se pueden diseñar experimentos para determinar la actividad funcional de la proteína. Se pueden analizar una gran cantidad de mutantes de manera precisa y simultánea (*high-throughput*) mediante el diseño de métodos de exploración o *screening*, tras los cuales los mejores mutantes pueden ser aislados, purificados y caracterizados. Los mejores mutantes de cada ciclo evolutivo se emplean como parentales o puntos de partida para el siguiente ciclo evolutivo obteniendo de esta manera mejoras exponenciales sobre el parental inicial debidas a la acumulación de mutaciones beneficiosas de un ciclo a otro.

Por tanto, en otro aspecto de la invención se proporciona un método para generar lacasas de alto potencial redox, extracelulares, funcionales y solubles con actividad mejorada hacia uno o más sustratos, de ahora en adelante método de la invención, que comprende:

- a) diseñar una construcción genética que comprenda el polinucleótido aislado que codifica el polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 31 operativamente enlazada con el polinucleótido aislado que codifica el polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 33.

- b) generar diversidad sobre la construcción genética de (a), y crear las librerías de mutantes,

- d) seleccionar los mejores mutantes de expresión y actividad.

En la construcción genética del procedimiento de la invención se sustituye la

secuencia señal de la lacasa nativa de *Pycnoporus cinnabarinus* (de ahora en adelante, n-PcL) por la secuencia señal del factor α para favorecer la expresión funcional de la lacasa madura (PcL) en *S. cerevisiae*. La secuencia señal de la lacasa nativa de *Pycnoporus cinnabarinus* (n-PcL) se corresponde con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 41, y la secuencia señal del factor α con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 31.

En el contexto de la presente invención, la secuencia señal de la lacasa nativa de *Pycnoporus cinnabarinus* (n-PcL) se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 41, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 42, o en su cadena complementaria,
- b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

En el contexto de la presente invención, la secuencia señal nativa del factor α se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 31, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 32, o en su cadena complementaria,
- b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

En el contexto de la presente invención, la lacasa nativa de *Pycnoporus cinnabarinus* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 33, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucléico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 34, o en su cadena complementaria,
- b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

La secuencia señal del factor α se emplea habitualmente para favorecer la secreción de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae*. Dicha secuencia señal se escinde durante la maduración de la proteína y secreción al medio extracelular, por lo que no forma parte de la enzima madura. La nueva construcción (la secuencia señal del factor α fusionada con el gen que codifica la proteína madura, desde este momento α -PcL) se somete al proceso de evolución dirigida con el fin de aumentar la expresión funcional y los valores de actividad total de PcL. Por lo tanto, la acumulación de mutaciones beneficiosas tiene lugar tanto en la secuencia señal del factor α como en la secuencia de la lacasa madura (PcL).

La generación de diversidad se lleva a cabo empleando dos herramientas diferentes i) introducción aleatoria de mutaciones puntuales en α -PcL mediante la reacción de amplificación del ADN (*polymerase chain reaction*, PCR) sometida a error y denominada desde este momento PCR mutagénica; y ii) recombinación de ADN de diferentes genes mutados de α -PcL para facilitar la acumulación de mutaciones beneficiosas y la eliminación de aquellas que se presentan como deletéreas o neutrales, a través de: a) el

barajeo *in vivo* de ADN mutagenizado o b) la recombinación *in vivo* por ensamblaje en la levadura.

Las librerías de mutantes se constituyen a través del clonaje *in vivo* de los genes mutagenizados con el vector de expresión así como de la recombinación de las mejores variantes y su transformación en células de *S. cerevisiae*.

La exploración de alta capacidad o *high-throughput* para la selección de los mejores mutantes de expresión y actividad comprende i) la micro-fermentación de los clones que contienen los genes mutados y/o recombinados para la expresión funcional de los mejores mutantes de α -PcL en formato placas de 96 pocillos; ii) El *screening* de las actividades de las enzimas recombinantes secretadas, mediante métodos colorimétricos basados en la oxidación de sustratos fenólicos y no fenólicos; iii) *re-screenings* adicionales para garantizar la selección de los genes que expresan mayor proteína y/o actividad lacasa a través del aislamiento, purificación y nuevamente transformación y expresión de los genes previamente seleccionados en *S. cerevisiae*.

En una realización preferida, el método de la invención comprendería la identificación y el mapeo de las mutaciones introducidas en las variantes seleccionadas.

La identificación y mapeo de las mutaciones introducidas en las variantes seleccionadas mediante la secuenciación del ADN de los mutantes del gen α -PcL obtenidos y localización de dichas mutaciones en el plegamiento global de la proteína en base a la estructura cristalográfica de la lacasa salvaje de *Pycnoporus cinnabarinus* (Antorini *et al.*, 2002. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol* 1594:109-114).

La obtención de los polinucleótidos y enzimas mejoradas descritas en la

presente invención podría también llevarse a cabo mediante un método denominado “mutagénesis dirigida” basándose en la información de las mutaciones reportadas en la presente patente. Esto se debe a que para llevar a cabo este procedimiento es necesario conocer la posición exacta y el cambio aminoacídico que se debe incluir en la nueva proteína. Este proceso consiste en la introducción de cambios puntuales en la secuencia de ADN que codifica dicha enzima. Estos cambios se introducen en el ADN codificante (ADNc) complementario del ARN mensajero (ARNm) que codifica la α -PcL (y que carece de las secuencias no codificantes, “intrones”, presentes en el ADN genómico eucariota), clonado en un vector de expresión. El vector resultante se usa como molde en reacciones en cadena de ADN polimerasa (PCR) en las que se emplea una polimerasa de alta fidelidad con objeto de que los cambios en el ADN se limiten a los deseados. Para cada mutación se diseñan al menos dos oligonucleótidos “cebadores” de la reacción de PCR, cuyas secuencias incorporan el cambio adecuado y son complementarias a hebras opuestas de la misma región de ADN. La comprobación de que las cadenas de ADN resultantes de la PCR portan únicamente las mutaciones deseadas puede lograrse mediante su secuenciación.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la construcción genética del paso a) del método de la invención comprende un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de entre la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 y la SEQ ID NO: 31 operativamente enlazado con un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de entre la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 33.

En una realización particular de la presente invención el procedimiento se

aplica en un primer ciclo de evolución dirigida del gen parental α -PcL. La fase 1 del procedimiento se lleva a cabo empleando como molde el vector pGAPZ α de InvitrogenTM y el ADNc *lac1* de *Pycnopus cinnabarinus*, cuya secuencia se encuentra depositada en la base de datos de secuencias de ADN GenBank (Gen Bank accession number: AF170093). El fragmento amplificado de α -PcL es subclonado en el vector lanzadera pJRoc30 (Novozymes) para facilitar la expresión funcional en *S. cerevisiae* y la sobreproducción plasmídica en *Escherichia coli*, (**Fig. 1**). La fase 2 del procedimiento se lleva a cabo a través de la construcción de dos librerías de mutantes con diferente tasa mutacional (promedio de mutaciones puntuales introducidas al azar en el gen parental α -PcL) creadas mediante PCR mutagénica. En la **Fig. 2** se muestran los paisajes de evolución dirigida de ambas librerías. La primera librería se construyó de forma que el 20 % de los clones explorados tuvieran menos del 10 % de la actividad del tipo parental (librería de índice de mutación medio, LMM). La segunda librería se construyó de forma que el 6 % de los clones explorados tuvieran menos del 10 % de la actividad del tipo parental (librería de índice de mutación bajo, LMB). Tanto LMM como LMB fueron librerías apropiadas para la selección de mutantes con mejoras en los niveles de expresión y actividad.

El clonaje de las librerías mutantes con el vector de expresión se lleva a cabo *in vivo* haciendo uso de la maquinaria celular eucariota de *S. cerevisiae*. Para ello, se co-transforma la librería en cuestión con el plásmido de expresión linearizado. Los productos de PCR generados poseen extensiones solapantes de no menos de 50 pares de bases que facilitan el clonaje *in vivo* y la reparación del vector de expresión mediante un proceso de recombinación homóloga. Los extremos solapantes se generan gracias al diseño de oligonucleótidos cebadores de la reacción de PCR mutagénica que confieran dicha homología con los extremos del vector linearizado.

Para la fase 3 del procedimiento se realiza un *screening* doble empleando ensayos de actividad en modo de punto final con sustratos fenólicos y no

fenólicos con la finalidad de eludir la dependencia de los mutantes seleccionados hacia el sustrato escogido. Los protocolos de re-*screenings* (en especial el segundo re-*screening*) se llevan a cabo a partir de células transformantes nuevas para promover la sincronización celular y evitar la selección de falsos positivos. Los detalles citados para esta fase son también aplicables en todas las realizaciones particulares que se describen a continuación referentes a ciclos evolutivos. De la presente realización se seleccionan 4 genes de lacasas mutantes denominados: 1D12, 5F7, 3D3 y 3G10 con mejoras que van desde 12,6 a 2,3 veces mejor actividad total que el parental α -PcL expresado en *S. cerevisiae* (**Tabla 2, Fig. 3**). Desde este momento, se define como actividad total aquella que se deriva de la mejora en el nivel de expresión y la actividad catalítica de la enzima.

En otra realización particular de la presente invención el procedimiento se aplica en un segundo ciclo de evolución dirigida utilizando como parentales los genes mutantes obtenidos en la primera generación: 1D12, 5F7, 3D3 y 3G10. La fase 2 del procedimiento se lleva a cabo mediante la construcción de una única librería mutagénica a través de un barajeo *in vivo* de los genes parentales previamente mutagenizados. Este enfoque facilita el empuje evolutivo hacia mejoras en la actividad total mediante: i) la recombinación de las mejores mutaciones de los genes parentales, ii) la introducción de nuevas mutaciones puntuales beneficiosas. La recombinación *in vivo* de los mejores parentales se lleva a cabo mediante una co-transformación de los productos de PCR mutagénica de dichos genes con el vector linearizado en *S. cerevisiae*. Los extremos solapantes facilitan el clonaje *in vivo* al tiempo que la elevada tasa de recombinación homóloga de *S. cerevisiae* favorece la recombinación de las mutaciones acumuladas para generar genes quimera.

10 A 7 (2ª G)	3 G 10 (1ª G)	5 F7 (1ª G)	3 D 3 (1ª G)	1 D 12 (1ª G)	Mutante (generación)	Aumento actividad total Respecto Parental (ABTS)
↓				λ	A(α9)D	PRE-PEP
				λ	<u>S409S</u>	PROT
			λ		R(α2)S	PRE-PEP
↓			λ		S(α58)G	PRO-PEP
			λ		<u>D141D</u>	PROT
↓		λ			P394H	PROT
	λ				L46I	PROT
λ					F(α48)S	PRO-PEP
λ					E(α86)G	Sitio corte pep señal
					D341N	PROT
					S135G	PROT
					P34P	PROT
					N336N	PROT
					<u>A361A</u>	PROT
					<u>T295T</u>	PROT
					N208S	PROT
					<u>L457L</u>	PROT
					I453V	PROT
					D490G	PROT
					<u>N227N</u>	PROT
					<u>I(α33)I</u>	PRO- PEP
					N12N	PROT
					<u>T295T</u>	PROT

Tabla 2. Mutaciones del proceso de evolución dirigida.

λ Mutación introducida

↓ Mutación acumulada

X(α n)X Mutación en el péptido señal (pre-prolíder del factor α).

Se subrayan las mutaciones silenciosas.

19 C8 (2ª G)	11.7			↓	↓		↓				λ												
20 C7 (2ª G)	11.1			↓			↓	↓															
1 F10 (2ª G)	9.5	↓					↓				λ												
1 C9 (2ª G)	8.7	↓					↓					λ	λ	λ									
2 D8 (2ª G)	8.7			↓	↓	↓	↓								λ								
7 A9 (3ª G)	3.7	↓			↓		↓		↓	↓	↓					λ	λ						
5 D3 (3ª G)	1.9	↓			↓		↓	↓	↓	↓									λ				
9 C3 (3ª G)	1.7	↓			↓		↓	↓	↓	↓										λ	λ	λ	
17 B7 (3ª G)	1.3	↓			↓		↓		↓	↓							λ	λ					

Tabla 2 (continuación). Mutaciones del proceso de evolución dirigida.

La fase 3 se lleva a cabo mediante protocolos de ensayo de actividad en modo de punto final. En la **Fig. 4** se muestra el paisaje de evolución dirigida de la librería construida, con un 62 % de los clones explorados con menos del 10 % de la actividad del tipo parental. De esta realización se seleccionan 6 genes de lacasas mutantes denominados: 10A7, 19C8, 20C7, 1F10, 1C9, 2D8 con mejoras que van desde 17 a 8,7 veces la actividad total del mejor gen parental de la anterior generación, 1D12 (**Tabla 2, Fig. 3**).

En una realización particular de la presente invención el procedimiento se aplica en un tercer ciclo de evolución dirigida utilizando como parentales los genes mutantes obtenidos en la segunda generación: 10A7, 19C8, 20C7, 1F10, 1C9, 2D8. La fase 2 del procedimiento se lleva a cabo mediante la construcción de una única librería mutagénica a través de un barajeo *in vivo* de los genes parentales previamente mutagenizados, de igual manera que se describe en la realización anterior. La fase 3 se realiza mediante

protocolos de ensayo de actividad en modo cinético, debido a la mayor actividad de partida del tipo parental 10A7. En la **Fig. 5** se muestra el paisaje de evolución dirigida de la librería construida, con un 36 % de los clones explorados con menos del 10 % de la actividad del tipo parental. De esta realización se seleccionan 4 genes de lacasas mutantes denominados: 7A9, 5D3, 9C3, 17B7 con mejoras que van desde 3,7 a 1,3 veces la actividad total del mejor gen parental de la anterior generación, 10A7 (**Tabla 2, Fig. 3**).

En una realización particular de la presente invención, se determinan las mutaciones introducidas en las distintas variantes generadas durante los tres ciclos de evolución dirigida mediante secuenciación de los genes mutados correspondientes (**Tabla 2, Fig. 6, 7**). Para la interpretación de las mutaciones obtenidas, y si no se indica de otra manera, el número determina la posición del residuo mutado en la secuencia de aminoácidos original de PcL madura, el primer aminoácido (a la izquierda del número) es el original en la secuencia de PcL madura y el segundo es aquel por el que se muta. Para el caso de mutaciones en la secuencia señal del factor α , el número va acompañado de la letra " α ". G indica Glicina, V indica Valina, L indica Leucina, I indica Isoleucina, F indica Fenil Alanina, Y indica Tirosina, W indica Triptófano, S indica Serina, T indica Treonina, C indica Cisteína, M indica Metionina, N indica Asparagina, Q indica Glutamina, D indica Ácido Aspártico, E indica Ácido Glutámico, K indica Lisina, R indica Arginina, H indica Histidina y P indica Prolina.

El mejor mutante de la última generación, 7A9, acumula 8 mutaciones tras 3 ciclos evolutivos y 6000 clones explorados (**Tabla 2, Fig. 6, 7**). Cuatro mutaciones se encuentran en la secuencia señal del factor α , atribuyéndoles la mejora en la secreción de la enzima. La secuencia señal del factor α comprende 83 aminoácidos, de los cuales 19 constituyen el pre-péptido y 64 el pro-péptido. El pre-péptido es el responsable de la inserción de la cadena polipéptidica en maduración en el retículo endoplasmático, tras lo cual es escindido por la acción de una endo-peptidasa entre los aminoácidos 19 y

20. El pro-péptido interviene en el plegamiento de la cadena polipeptídica durante su transición y estancia del retículo endoplasmático al aparato de Golgi. El pro-péptido es escindido en el Golgi antes de que la enzima madura sea secretada al exterior mediante la actuación de tres proteasas específicas (*KEX1*, *KEX2* y *STE13*). De las mutaciones introducidas en la secuencia señal del factor α , A(α 9)D se localiza en la región del pre-péptido y proviene del mutante 1D12 de la primera generación (con mejora de hasta 12,6 veces la actividad total de α -PcL) conservándose durante las siguientes recombinaciones en el proceso evolutivo (**Fig. 6, 7**). La mutación S(α 58)G se localiza en la región del pro-péptido y proviene del mutante 3D3 del primer ciclo. Se conserva en varios de los mutantes seleccionados del 2º ciclo y en los 4 mutantes seleccionados de la 3ª generación. Las mutaciones F(α 48)S y E(α 86)G, localizadas en el pro-péptido y en la zona de procesamiento del pro-péptido, respectivamente, aparecen en el mutante 10A7 de la segunda generación como consecuencia de la PCR mutagénica, y se conservan en todos los mutantes seleccionados de la 3ª generación. Las mutaciones descritas para la secuencia señal del factor α (**Tabla 2**) pueden ser aplicables en la expresión heteróloga de cualquier otro gen eucariótico susceptible o deseable de ser expresado en *S. cerevisiae* (como ejemplos no limitativos se pueden aplicar a genes de lacasas, peroxidasas, glucosas oxidasas, P450 monooxigenasas, galactosas oxidasas, glucosidasas, amilasas, amiloglucosidasas, galactosidasas, celulasas, invertasas, glicosiltransferasas, lipasas, dehalogenasas).

De las 4 mutaciones que aparecen en la proteína madura (**Tabla 2, Fig. 6, 7**), una de ellas es silenciosa (no supone ningún cambio aminoácido, L457L). Las 3 restantes forman parte de la proteína madura apareciendo en zonas conservadas de la enzima, en los alrededores del cobre catalítico del sitio T1 y se les atribuye la mejora en la actividad catalítica de la enzima (**Fig. 8**). La mutación N208S es consecuencia de la PCR mutagénica de la tercera generación. La mutación D341N proviene del mutante 19C8 de la segunda generación, que muestra una mejora de 11,7 veces de actividad

total (respecto al parental) frente a los 8,7 del mutante 2D8 del que sólo se diferencia en la mencionada mutación. La mutación P394H es responsable de una mejora de 4,5 veces de la actividad total en el mutante 5F7 de la primera generación. Esta mutación se conserva durante las siguientes recombinaciones en todo el proceso evolutivo.

La evaluación de la mejora de las lacasas mutantes se estima determinando su actividad total a partir de los sobrenadantes de los fermentados celulares a escala de microcultivo (formato 96 pocillos) o por litro de fermentado. En una realización particular de la presente invención se evalúa la actividad total del mejor mutante de la última generación, 7A9, y se cuantifica una actividad de 40 U/L de fermentado, lo que supone una mejora de aproximadamente 3×10^6 veces la actividad total del parental inicial α -PcL en *S. cerevisiae*. La Unidad de actividad catalítica (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de sustrato por minuto bajo las condiciones de reacción.

En una realización particular de la presente invención se purifica a homogeneidad y se caracteriza bioquímicamente la variante 7A9 y se compara con PcL salvaje (proteína madura expresada en *Pycnoporus cinnabarinus* y purificada) (**Fig. 9**). Se determinan los perfiles de actividad frente al pH, la termoestabilidad, el grado de glicosilación, y se evalúa la eficiencia catalítica en la oxidación de diversos sustratos fenólicos y no fenólicos.

La masa molecular de PcL salvaje se estima entorno a los 65 kDa. La masa molecular de 7A9 expresado en *S. cerevisiae* es aproximadamente 120 kDa. La N-desglicosilación de 7A9 reduce la masa molecular hasta ~ 60 kDa, (**Fig. 9A**). De estos datos se deduce que 7A9 se encuentra hiperglicosilada: aproximadamente el 50 % de la masa molecular total son carbohidratos covalentemente unidos a residuos de asparagina de la cadena polipeptídica debido a las modificaciones postraduccionales en el organismo hospedador

S. cerevisiae. Empleando el servidor Expasy, www.Expasy.org, se calcula la masa molecular teórica en 54249,55 Da, un 9.5 % menos de lo observado experimentalmente para 7A9 N-desglicosilada. Esta diferencia en la masa molecular puede ser debida a las O-glicosilaciones durante el procesamiento de la enzima en el aparato de Golgi.

El perfil de actividad frente al pH se ve desplazado en 7A9, como efecto lateral del proceso de evolución y expresión funcional en *S. cerevisiae* (**Fig. 9B**). Así, el pH óptimo de actividad de PcL salvaje se sitúa en 3 mientras que en 7A9 se detecta en 4. Notoriamente, 7A9 retiene el 74 % de su actividad a pH 5.0 (PcL nativa retiene un 52 % al mismo pH).

La termoestabilidad en medio acuoso de 7A9 varía notablemente con respecto a PcL salvaje como consecuencia de la expresión funcional y del proceso evolutivo en *S. cerevisiae* (ej. 7A9 mantiene el 85 % de su actividad tras 24 h de incubación a 40 °C frente al 57 % retenido por la PcL salvaje, **Fig. 9C**). Se ha sugerido que la hiperglicosilación puede aumentar la estabilidad enzimática (Bulter *et al.*, 2003. *Appl. Environ. Microb.* 69: 987-995).

La eficiencia catalítica es la relación entre la K_{cat} (constante catalítica o número de recambio, que indica la velocidad con la que un sustrato se convierte en producto) y la K_m (constante de Michaelis, que indica la afinidad de la enzima por un sustrato dado) y revela la capacidad de una enzima para catalizar la modificación de un sustrato dado. El mutante 7A9 es activo frente a una amplia gama de sustratos de diferente naturaleza, con eficiencias catalíticas en el intervalo 100-1500 $\text{mM}^{-1} \text{sg}^{-1}$ lo que pone de manifiesto que el método de *screening* que se emplea en la fase 3 facilita la selección de variantes funcionales frente a diferentes compuestos (**Tabla 3**).

	ABTS			DMP		
	Km (μM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	Km (μM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
PcL salvaje	162	38	234	41	22	540
Mutante 7A9	20	27	1325	89	15	168

Tabla 3. Constantes cinéticas para ABTS y DMP de PcL salvaje y el mutante 7A9 expresado en *S. cerevisiae*

El mutante 7A9 alcanza unos niveles de expresión funcional en *S. cerevisiae* detectables en modo cinético tras 24 h de inducción en medio de expresión (0.72 U/L) en microfermentaciones en formato placa de 96 pocillos (200 μL de

volumen final). Estos valores garantizan la posible explotación de 7A9 así como de cualquiera de los mutantes generados durante el proceso evolutivo, o de sus mutaciones individuales, para futuras mejoras por evolución dirigida. El disponer de una lacasa fúngica de alto potencial redox del basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus* expresada funcionalmente y evolucionada en *S. cerevisiae* confiere las siguientes ventajas:

- i) La lacasa evolucionada y sus variantes objeto de la presente patente constituyen las primeras lacasas de alto potencial redox que han sido sometidas a evolución para su expresión funcional en *S. cerevisiae* siendo un vehículo idóneo para futuras aplicaciones en diversos sectores (industria de productos forestales -papel y madera-, biorremediación, industria textil, industria alimentaria, industria farmacéutica, industria química).
- ii) La lacasa evolucionada y sus variantes pueden ser evolucionadas en *S. cerevisiae* para mejorar diferentes propiedades (termoestabilidad, actividad a pHs básicos, oxidación de sustratos no naturales, resistencia a haluros) para después ser sobre-expresadas en otros huéspedes fúngicos heterólogos (*Aspergillus*

niger) u homólogos (*Pycnoporus cinnabarinus*) a escala de mg-g/L tal y como se ha descrito para la lacasa salvaje de *P. cinnabarinus*, lo que supone una garantía en la transferencia del producto en diversas aplicaciones (Alves *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6379-6384; Record E., 2002. *Eur. J. Biochem.* 269:602-609).

- iii) La lacasa salvaje de *P. cinnabarinus* (y también la recombinante expresada en *Aspergillus niger*), ha sido utilizada con éxito en diferentes aplicaciones biotecnológicas (blanqueo y control del pitch de pastas de papel, degradación de contaminantes aromáticos, estabilización de bebidas). La evolución de su actividad catalítica hacia ciertos sustratos o el aumento de la estabilidad de la proteína en condiciones industriales, aumentará su potencial utilidad biotecnológica. (Patente ES2189683; Georis *et al.*, 2003. *Pycnoporus cinnabarinus* laccases: an interesting tool for food or non-food applications. Proc. FAB2003, Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, 2003; Ibarra *et al.*, 2006. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81:1159-1165; Sigoillot *et al.*, 2005. *J. Biotechnol.* 115:333-343; Gutiérrez *et al.*, 2006. *Environ. Sci. Technol.* 40: 3416-3422).

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxiribonucleótidos.

Los términos “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos,

componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 (Fig.1). Construcción de pJRoC30- α -PcL.

Figura 2 (Fig.2). Paisajes del ensayo de *screening* frente a 2,6 dimetoxifenol (DMP) de la librería de índice de mutación medio (LMM) y la librería de índice de mutación bajo (LMB) en la primera generación. Las actividades de los clones de las bibliotecas de mutantes se representan en orden descendente. Las líneas discontinuas indican la actividad del tipo parental α -PcL.

Figura 3 (Fig.3). Esquema general del proceso de evolución artificial. No se incluye en el diagrama las mutaciones silenciosas introducidas. Las mejoras se calculan con respecto al correspondiente parental empleado como referencia durante el *screening* del ciclo evolutivo. El parental referente de la primera generación es α -PcL, el de la segunda generación es 1D12 y el de la tercera generación 10A7.

Figura 4 (Fig.4). Paisaje del ensayo de *screening* frente a 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) de la segunda generación. Las actividades de los clones de la biblioteca de mutantes se representan en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental usado como estándar interno en el *screening* (mutante 1D12).

Figura 5 (Fig.5). Paisajes de los ensayos de *screening* de la tercera generación con DMP y ABTS. Las actividades de los clones de las bibliotecas de mutantes se representan en orden descendente. Las líneas discontinuas indican la actividad del tipo parental usado como estándar interno en el *screening* (mutante 10A7). Los mutantes con mejor actividad frente a ambos sustratos se eligieron para los siguientes re-*screenings* (resaltado en círculo la variante 7A9).

Figura 6 (Fig.6). Recombinación de mutaciones durante el proceso de evolución. Se resaltan en diferentes colores las mutaciones introducidas para apreciar los eventos de entrecruzamiento.

Figura 7 (Fig.7). Comparación entre los mejores mutantes de los tres ciclos evolutivos y la acumulación de mutaciones.

Figura 8 (Fig.8). Mutaciones introducidas en la lacasa madura durante el proceso evolutivo. A) parental α -PcL; B) mutante 7A9. Las esferas representan los cobres catalíticos. En azul se resaltan los ligandos de los cobres T1 y del *cluster* trinuclear T2/T3. 7A9, acumula además de las tres mutaciones indicadas en esta figura, cuatro mutaciones en el péptido señal y una mutación silenciosa. Se agradece al Prof. Piontek por haber facilitado el acceso al fichero PDB de la estructura cristalografica.

Figura 9 (Fig.1). Caracterización bioquímica del mutante 7A9. A) Electroforesis (SDS-PAGE) de los distintos pasos de purificación de la variante 7A9. Gel de poliacrilamida al 7,5 % teñido con Azul de Coomasie 1) Patrón de peso molecular; 2) Concentrado después de ultrafiltración bajo presión con N₂ (membrana de 10 KDa, Amicon YM3, Millipore); 3) Después de Cromatografía de baja resolución en columna de intercambio aniónico débil (HiTrap-Q de Amersham Bioscience); 4) Después de cromatografía de alta resolución en columna de intercambio aniónico fuerte (Resource Q, Amersham Biosciences); 5) Misma fracción que 4 tras desglucosilación con la N-desglucosilasa PNGasaF; 6) Lacasa salvaje de *P. cinnabarinus* (PcL). B) Termoestabilidad del mutante 7A9 y PcL salvaje. Las actividades se midieron con ABTS 3 mM en acetato sódico 100 mM, pH 5. Las actividades se normalizaron con la actividad inicial a temperatura ambiente antes de la incubación. Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes. C) Perfiles de actividad a diferentes pHs de 7A9 y PcL salvaje. Las actividades se midieron con ABTS 3 mM en tampón Britton y Robinson 100 mM ajustado a los diferentes pHs de la medida. La actividad lacasa se representa normalizada con respecto a su valor óptimo de actividad. Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes.

MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN DE α -PcL

La sustitución de la secuencia señal de la lacasa nativa de *Pycnoporus cinnabarinus* (n-PcL) por la secuencia señal del factor α genera una proteína de fusión, α -PcL, constituida por la secuencia señal fusionada del factor α con el gen que codifica para la proteína madura. Para reemplazar la secuencia señal de n-PcL por la del factor α , se tomó como molde el vector de StratageneTM pGAPZ α , utilizado para expresión de proteínas en *Pichia pastoris*, que contiene el pre-pro péptido señal del factor α . En primer lugar, se linearizó pGAPZ α con las enzimas de restricción EcoRI y NotI. El cADN *lac1* de *P. cinnabarinus* (n-PcL, 1494 pb, Gen Bank accession n°: AF170093), fue amplificado con los oligonucleótidos cebadores NcoRI-directo (SEQ ID NO: 35) y CNotI-reverse (SEQ ID NO: 36) que incluyen dianas de restricción para EcoRI y NotI (**GAATTC** y **GCGGCCGC** respectivamente, subrayadas y en negrita), generando un molde de la lacasa madura (PcL) que excluye la secuencia señal nativa. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes: 400 nM del oligonucleótido NcoRI-directo, 400 nM oligonucleótido CNotI-reverse, 0.25 mM dNTPs, 0.05 U/ μ L Taq polimerasa (Invitrogen), 0,5 ng/ μ L de n-PcL en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 y 4 mM de MgCl₂ en un volumen final de 50 μ L. El programa de PCR empleado fue: 94 °C durante 5 min, 55 °C durante 5 min, 72 °C durante 5 min (1 ciclo), 95 °C durante 0.35 min, 50 °C durante 2 min, 72 °C durante 4 min (25 ciclos), y 72 °C durante 10 min (1 ciclo).

PcL fue digerido con EcoRI y NotI y ligado el vector linearizado pGAPZ α generando la construcción pGAPZ α -PcL. Dicho vector se transformó en

células competentes de *E. coli* DH5 α por choque térmico para sobre-producir y purificar el plásmido.

α -PcL se amplificó a partir de pGAPZ α -PcL mediante PCR con ayuda de los oligonucleótidos NtpJRBgIII-directo (SEQ ID NO: 37) y CtpGAPZlac-reverso (SEQ ID NO: 38) los cuales incluyen dianas de restricción para BgIII - compatible con BamHI- y NotI (**AGATCT** y **GCGGCCGC**, respectivamente, subrayadas y en negrita). La reacción de PCR se llevo a cabo en 50 μ l conteniendo 400 nM del oligonucleótido NtpJRBgIII-directo, 400 nM oligonucleótido CtpGAPZlac-reverso, 0.25 mM dNTPs, 0.05 U/ μ L Taq polimerasa (Invitrogen), 0,4 ng/ μ L de pGAPZ α -PcL en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 y 4 mM de MgCl₂. El programa de PCR empleado fue: 94 °C durante 5 min, 55 °C durante 5 min, 72 °C durante 5 min (1 ciclo), 95 °C durante 0.35 min, 50 °C durante 2 min, 72 °C durante 4 min (25 ciclos), y 72 °C durante 10 min (1 ciclo).

α -PcL fue subclonado en el vector lanzadera pJRoC30 (Novozymes, USA). pJRoC30 es un vector episómico bifuncional de 10477 pb que contiene el promotor GAL1 (inducible por galactosa), el gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli* y el gen URA3 que confiere auxotrofia para uracilo (las células de *S. cerevisiae* crecidas con este vector pueden cultivarse en medio selectivo -sin uracilo-). Se llevo a cabo la digestión de pJRoC30 con las enzimas BamHI y NotI, así como la digestión de α -PcL con BgIII y NotI. Se ligó α -PcL digerido y el plásmido pJRoC30 linearizado dando lugar a la construcción pJRoC30- α -PcL, (**Figura 1**). Debido a la estrategia de clonación utilizada, en el extremo amino terminal de la proteína aparecen dos aminoácidos extras (E-F) tras el procesamiento del péptido señal. Las mutaciones introducidas en la proteína madura durante el proceso evolutivo mantienen la numeración descrita para la lacasa madura de *Pycnoporus cinnabarinus* nativa.

EJEMPLO 2. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE α -PcL

1. ELABORACIÓN DE PROTOCOLOS PARA GENERAR DIVERSIDAD Y CREACIÓN DE LAS LIBRERÍAS DE MUTANTES.

1.1 Ajuste de las condiciones de PCR mutagénica.

La generación de diversidad mediante PCR-mutagénica se llevó a cabo en un termociclador de gradiente (Thermocycler Mycycler, Biorad, EEUU) bajo los siguientes parámetros de reacción: 95 °C durante 2 min (1 ciclo); 94 °C durante 0.45 min, 53 °C durante 0.45 min, 74 °C durante 3 min (28 ciclos); y 74 °C durante 10 min (1 ciclo). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación mutagénica fueron RMLN directo (SEQ ID NO: 39; con sitio de unión a pJRoC30 en la posición pb 5'-160-181-3') y RMLC inverso (SEQ ID NO: 40; con sitio de unión a pJRoC30 en la posición pb 5'-2139-2158-3'). Para promover la ligación *in vivo*, los productos de PCR se diseñaron conteniendo extensiones con una homología de 40 pb y 66 pb para los extremos digeridos con *Bam*HI y *Xho*I del vector linearizado, respectivamente.

En cada una de las generaciones, los correspondientes productos de PCR fueron concentrados (*DNA clean concentrador TM-5 kit*, Zymo Research, EEUU), cargados en un gel semipreparativo de agarosa de bajo punto de fusión y purificados con el kit *Zymoclean gel DNA recovery* (ZymoResearch, USA). Los productos de PCR fueron posteriormente clonados *in vivo* al transformar las células de *S. cerevisiae*, tras el promotor GAL1 del vector pJRoC30 previamente linearizado con *Bam*HI y *Xho*I.

Para estimar el índice de mutación y evaluar los diferentes paisajes de evolución, se construyeron pequeñas genotecas de 174 clones (2 placas de 96 pocillos) empleando polimerasas con diferente espectro mutacional.

A) Genotecas Mutazima-II:

El índice de mutación se moduló variando la cantidad de ADN molde en la reacción de PCR. La concentración de cada uno de los reactivos, en un volumen final de 50 μ L, fue la siguiente: 370 nM de oligonucleótido RMLN,

370 nM de oligonucleótido RMLC, 0,8 mM dNTPs, 3 % (v/v) DMSO, 0,05 U/ μ L de Mutazima ADN polimerasa (Genemorph II Random Mutagenesis kit, Stratagene), 93 ng/ μ L de pJRoC30- α -PcL para las genotecas de bajo índice de mutación y 40 ng/ μ L de pJRoC30- α -PcL para las de medio índice de mutación.

B) Genotecas *Taq* polimerasa/MnCl₂:

En este caso, la tasa de mutación se controló variando la concentración de MnCl₂. Adicionalmente también se analizó el efecto de concentraciones equilibradas/desequilibradas de dNTPs y de la concentración del ADN molde en la reacción de PCR mutagénica (**Tabla 4**).

1.2 Primera generación: PCR mutagénica con Mutazima-II.

Se diseñaron y exploraron dos genotecas independientes, cada una de ~1000 clones, usando como parental α -PcL. Las condiciones elegidas para la construcción de las genotecas de bajo índice de mutación (0-4,5 mutaciones/1000 pb) y medio índice de mutación (4,5-9 mutaciones/1000 pb) se recogen en el apartado 1.1.A. Las mezclas de transformación de cada una de las genotecas contenían una relación vector linealizado:productos de PCR 1:4 (100 ng de vector y 400 ng de productos de PCR). El *screening* de punto final se desarrolló como se describe en el apartado 2 del presente ejemplo, preparando placas independientes para valorar la actividad en presencia de sustratos fenólicos y no fenólicos.

1.3 Segunda generación: barajeo *in vivo* de ADN mutagenizado.

Las mejores variantes de la primera generación (mutantes 1D12, 3D3, 5F7 y 3G10) se tomaron como parentales y fueron sometidos a un nuevo ciclo de evolución mediante PCR mutagénica con *Taq*/MnCl₂, para posteriormente recombinar estos productos mediante un barajeo *in vivo*; se exploraron ~2000 clones. Cada uno de los parentales fue amplificado mediante PCR propensa a error con dNTPs equilibrados y una concentración de MnCl₂ de

0,01 mM tal y como se detalla en la **Tabla 4**. Los productos mutagenizados por PCR se mezclaron en la misma proporción (400 ng totales, 100 ng de cada producto) y se transformaron conjuntamente con el vector linearizado (relación vector:producto PCR 1:4). El *screening* de punto final se desarrolló como se describe en el apartado 2 del presente ejemplo, preparando placas independientes para valorar la actividad en presencia de sustratos fenólicos y no fenólicos.

1.4 Tercera generación: barajeo *in vivo* de ADN mutagenizado.

Las mejores variantes de la segunda generación (mutantes 10A7, 19C8, 20C7, 1F10, 1C9, y 2D8) se tomaron como parentales y fueron sometidos a un nuevo ciclo de evolución mediante PCR mutagénica con *Taq*/MnCl₂, para posteriormente recombinar estos productos mediante un barajeo *in vivo*; se exploraron ~2000 clones. Cada uno de los parentales fue amplificado mediante PCR propensa a error con dNTPs equilibrados y una concentración de MnCl₂ de 0,01 mM tal y como se detalla en la **Tabla 4**. Los productos mutagenizados por PCR se mezclaron en la misma proporción (400 ng totales, 100 ng de cada producto) y se transformaron conjuntamente con el vector linearizado (relación vector:producto PCR 1:4). El *screening* se desarrolló como se describe en el apartado 2 del presente ejemplo, preparando placas independientes para valorar la actividad en presencia de sustratos fenólicos y no fenólicos. En esta generación en particular, el *screening* pudo llevarse a cabo en modo cinético debido a la mejora de actividad tras tres ciclos evolutivos.

Componente	TIPOS DE GENOTECAS <i>Taq</i> /MnCl ₂		
	dNTPs desequilibrados		dNTPs equilibrados
	Concentración de ADN alta	Concentración de ADN baja	
Oligonucleótidos (RMLN y RMLC)	90 nM	90 nM	90 nM
pJRoC30- α-PcL	1,5 ng/μL	0,1 ng/μL	0,1 ng/μL
dNTPs	0,2 mM dATP; 0,2 mM dGTP 0,6 mM dCTP; 0,6 mM dTTP	0,04 mM dATP; 0,04 dGTP 0,1 mM dCTP; 0,1 mM dTTP	0.3 mM (0.075 mM de cada uno)
DMSO	3% (v/v)	3% (v/v)	3% (v/v)
MgCl₂	0,75 mg/mL	1,5 mg/mL	1,5 mg/mL
Taq polimerasa	0,05 U/μL	0,05 U/μL	0,05 U/μL
			0 / 0,002 mM /
	0 mM / 0,05 mM /	0 mM/ 0,05 mM/	0,005mM
MnCl₂¹	0,1 mM /	0,1 mM /	/0,01mM / 0,02
	0,2 mM	0,2 mM	mM / 0,05 mM /
			0,1 mM / 0,2 mM

Tabla 4. Ajuste de las condiciones de las genotecas *Taq*/MnCl₂ con las diferentes variables.

2. PROTOCOLO DE SCREENING DE ALTA CAPACIDAD

2.1 Transformación de células de *S. cerevisiae*.

Los medios YPD, medio mínimo líquido, las placas SC y el medio de expresión se prepararon tal como se indica en Zumarraga, M. et al. 2008(*Proteins* 71: 250-260.) con la salvedad de que en el medio de expresión se incluyó etanol 25 g/L para favorecer la secreción de la lacasa y

CuSO₄ en concentraciones finales de 2 mM para fermentaciones en microplaca y 4 mM para escala de producción. Las genotecas de cada ciclo evolutivo generadas mediante diferentes estrategias se transformaron en células de *S. cerevisiae* (*Yeast transformation Kit*, Sigma) para una expresión funcional de los correspondientes clones. Se incubaron colonias aisladas de células silvestres de *S. cerevisiae* en 20 mL de medio YPD líquido a 30 °C y 210 rpm en un agitador (Edmund Bühler GmbH SM-30, Alemania) durante toda la noche ($DO_{600} > 2$). Una cantidad adecuada del cultivo se inoculó en un volumen total de 120 mL de YPD atemperado para alcanzar una DO_{600} de 0,3. Se incubó de nuevo durante 4-6 h, hasta completar dos ciclos de crecimiento y alcanzar una DO_{600} de 1,2. Las células se transformaron con las correspondientes genotecas en presencia del plásmido linearizado, con el kit de transformación de levadura. Inmediatamente antes del choque térmico (42 °C durante 15 min), se añadió DMSO a la mezcla de transformación con una concentración final de 10% (v/v) para aumentar la eficiencia de transformación (aproximadamente 20000 clones por reacción de transformación).

2.2 Preparación de las librerías para el *screening* de alta capacidad.

Las células de *S. cerevisiae* transformadas con la correspondiente genoteca y el vector pJRc30 linearizado se sembraron en placas SC y se incubaron a 30 °C. Transcurridos 3-4 días se picaron colonias individuales y se inocularon en microplacas de 96 pocillos (Sero-well, Reino Unido) que contenían 50 µL de medio mínimo por pocillo. La columna completa número 6 de cada placa se inoculó con el tipo parental seleccionado del ciclo previo (columna de referencia) y uno de los pocillos (H1) no se inoculó (control). Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 30 °C, 210 rpm y 80% de humedad relativa en un incubador con sistema de humidificación Minitron-INFORS (Biogen, España). Tras 48 h, se añadieron 160 µL de medio de expresión a cada pocillo y se volvieron a incubar a 30 °C y 210 rpm. Después de 24 h, se midió la DO_{600} para determinar la densidad celular

de cada pocillo con un lector de microplacas Versa Max (Molecular Devices, EEUU). Se centrifugaron las placas (placas maestras) durante 5 min a 3200 g y 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5810R (Alemania). 40 µL del sobrenadante de cada pocillo fueron transferidos desde la placa maestra a dos placas réplica (20 µL del sobrenadante en cada una), mediante un robot manipulador de líquidos Quadra 96-320 (Tomtec, EEUU). Con estas dos placas réplica se llevaron a cabo los *screenings* de actividad frente al sustrato fenólico DMP (2,6 Dimetoxifenol) y el sustrato no fenólico ABTS (2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)).

2.3 Ensayos colorimétricos.

El *screening* de actividad frente a ABTS se realizó añadiendo a la primera placa réplica 180 µL de tampón acetato 100 mM, pH 5,0 conteniendo ABTS 3mM, se agitaron las placas brevemente y se midió la absorbancia en el lector de placas a 418 nm. Las placas se incubaron a temperatura ambiente hasta que se desarrolló el color verde del radical catiónico ABTS^{•+} y se midió nuevamente la absorbancia ($\epsilon_{418} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El *screening* de actividad frente a DMP se realizó añadiendo a la segunda placa réplica 180 µL de tampón acetato 100 mM, pH 5,0 conteniendo DMP 3mM, se agitaron las placas brevemente y se midió la absorbancia en el lector de placas a 469 nm. Las placas se incubaron a temperatura ambiente hasta que se desarrolló el color amarillo del DMP oxidado y se midió nuevamente la absorbancia ($\epsilon_{469} = 27500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las actividades con respecto a cada sustrato se calcularon a partir de la diferencia de la absorbancia final e inicial. Las actividades relativas se normalizaron con la actividad del tipo parental de la correspondiente placa.

2.4 Re-screenings

Aquellos mutantes seleccionados que mostraron mayor actividad tanto frente a ABTS como DMP fueron sometidos a dos re-*screenings* consecutivos:

Primer re-screening: alícuotas de 5 μ L de los clones seleccionados se inocularon en placas multipocillo con 50 μ L de medio mínimo. Las columnas y filas de los extremos de la placa (columnas 1 y 12, filas A y H) no se utilizaron. Tras 24 h de incubación a 30 °C y 210 rpm, se transfirieron 5 μ L a los pocillos adyacentes, incubándose durante 24 h más. Finalmente se adicionaron 160 μ L de medio de expresión y se incubaron durante 24 h. De esta manera cada clon fue crecido en 4 pocillos y el parental (estándar interno) se trató del mismo modo (fila D, pocillos 7-11). Las placas se sometieron al mismo protocolo de *screening*, con la salvedad de que cada valor de actividad procedió de la media de 4 microcultivos por clon.

Segundo re-screening: alícuotas de 100 μ L de los clones más activos del primer re-screening se crecieron en 3 mL de medio YPD a 30 °C y 210 rpm durante 24 h. Se extrajeron los plásmidos de estos cultivos (Zymoprep yeast plasmid miniprep kit, Zymo Research). Como el producto de las zymoprep no era puro y la concentración del ADN extraído fue muy baja, se transformaron los plásmidos en células de *E. coli* supercompetentes XL2-blue según el protocolo correspondiente (Stratagene) y se seleccionaron en placas LB/amp. Colonias aisladas se inocularon en 5 mL de medio LB/amp y se crecieron durante toda la noche a 37 °C. Se extrajeron los plásmidos (NucleoSpin® Plasmid kit, Macherey-Nagel). Las células de *S. cerevisiae* se transformaron con los plásmidos de los mejores mutantes así como con el correspondiente tipo parental, y el *screening* se llevó a cabo de la misma manera, con la salvedad de que cada valor de actividad procedió de la media de 5 microcultivos por clon.

EJEMPLO 3: PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS MUTANTES

3.1 Producción de las lacasas en *S. cerevisiae*

Los clones de *S. cerevisiae* que contenían los genes de lacasas tanto del tipo nativo como de mutantes fueron cultivados en 3 mL de medio mínimo

durante 48 h, a 30 °C y 250 rpm (Micromagmix shaker, Ovan). Una alícuota de este precultivo se inoculó para alcanzar una densidad óptica (DO_{600}) de 0.25 en un volumen total de 50 mL de medio mínimo en un matraz de 500 mL con tapón poroso. Cuando se completaron dos ciclos de crecimiento ($DO_{600} = 1$; 6-8 h de incubación), se añadieron 450 mL de medio de expresión conteniendo $CuSO_4$ 4 mM, etanol 25 g/L y se incubó a 20 °C y 250 rpm en un matraz de 2 L de base ancha (20 cm Ø en la base). El cultivo se paró tras 5 días cuando tanto el crecimiento celular como la actividad lacasa se estacionaron (DO_{600} 28-32; actividad lacasa 20-40 U/L).

3.2 Purificación de los mutantes

1. Se centrifugó el cultivo del apartado 3.1. a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se concentró por ultrafiltración tangencial. La muestra se hizo pasar a través de una membrana de 5 KDa de tamaño de poro (Minisette, Filtron) mediante un flujo proporcionado por una bomba peristáltica (Masterflex easy-load, Cole-Palmer). Se realizó un segundo paso de concentración mediante ultrafiltración bajo presión (ejercida con gas N_2) con membrana de 10 KDa de tamaño de poro (Amicon YM3, Millipore).
2. Cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución. Se utilizó un cartucho HiTrap-Q (Amersham Biosciences) acoplado a un equipo EconoSystem (Bio-Rad). Tras equilibrar el cartucho con solución A (acetato 25 mM pH 5), se aplicó la muestra y se lavó la columna con la misma solución para eliminar toda la fracción no retenida, hasta que la absorbancia a 280 nm fuese constante. La fracción retenida se eluyó con un gradiente en dos fases de solución B (NaCl 1 M en tampón acetato sódico 25 mM, pH 5), de 0 a 20% en 45 min y de 20 a 100% en 10 min, a un flujo de 1 mL/min.
3. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución. Se utilizó una columna Resource Q (Amersham Biosciences) acoplada a un equipo AKTApurifier (Amersham Biosciences). Se

equilibró la columna con solución A (acetato sódico 25 mM pH 5). La fracción retenida se eluyó con un gradiente en dos fases con solución B (NaCl 1 M en acetato sódico 25 mM pH 5), de 0 a 20 % en 20 min y de 20 a 100 % en 10 min, a un flujo de 2 mL/min.

3.3 Caracterización bioquímica de los mutantes

A) Desglicosilación

Las proteínas purificadas se desglicosilaron con la péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F) (Sigma), que hidroliza los oligosacáridos unidos a los residuos asparagina. Concretamente, 8 µg de lacasa pura se desnaturalizaron con SDS 0.2% (p/v) y β-mercaptoetanol 100 mM a 100 °C durante 10 min. Posteriormente se añadieron 2.5 Unidades de PNGasa F y la mezcla de reacción se incubó toda la noche a 37 °C. La reacción se paró a 100 °C durante 10 min. Los productos se analizaron en un gel de electroforesis (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomasie.

B) Medida de la estabilidad térmica

El estudio de termoestabilidad se realizó con ayuda del termociclador Mycycler equipado con un formador de gradientes (Bio-Rad, EEUU), el cual permite crear gradientes de temperatura a diferentes intervalos. Se prepararon diluciones de las proteínas en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5 de tal manera que alícuotas de 10 µL dieran una respuesta adecuada para medir la actividad en el lector de microplacas en modo cinético. Se incubaron 60 µL de lacasa por cada punto del gradiente. El gradiente de temperatura estudiado comprendió el intervalo 30-80 °C con temperaturas intermedias de 30.0 °C, 31.7 °C, 34.8 °C, 39.3 °C, 45.3 °C, 49.9 °C, 53 °C, 55 °C, 56.8 °C, 59.9 °C, 64.3 °C, 70.3 °C, 75.0 °C, 78.1 °C y 80.0 °C. A diferentes tiempos de incubación (2 h, 4 h y 24 h) se extrajeron alícuotas de 10 µL de lacasa y se mezclaron con 190 µL de de ABTS 3 mM en tampón

acetato sódico 100 mM pH 5. La actividad se valoró en continuo (oxidación del ABTS a 418 nm). El tiempo 0 se determinó a partir de las correspondientes muestras incubadas a temperatura ambiente. Cada valor procedió de al menos tres medidas independientes.

C) Ensayos de actividad a diferentes pHs.

Los perfiles de pH de la actividad de las diferentes lacasas purificadas se realizaron en tampón ByR 100 mM a diferentes pHs (pH 2,0-9,0, ajustados con NaOH). Se prepararon diluciones de las enzimas en tampón acetato sódico 100mM pH 5 para que alícuotas de 10 μ L dieran una respuesta adecuada en la medida de actividad en el lector de microplacas en modo cinético. Las lacasas (10 μ L) se añadieron por filas y el tampón a diferentes pHs (180 μ L) por columnas. Finalmente, se añadieron 10 μ L de ABTS 60 mM y se midieron las actividades de cada una de las condiciones por triplicado.

D) Determinación de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos (K_m , V_{max} , k_{cat} y k_{cat}/K_m) de las enzimas nativa y de las mutantes se determinaron en un lector de microplacas VersaMax (Molecular Devices, USA). Se valoraron tanto sustratos no fenólicos (ABTS, $\epsilon_{418} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como fenólicos (2,6-dimetoxifenol, $\epsilon_{469} = 27500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5 a 25 °C. Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante un ajuste no lineal por mínimos cuadrados del modelo de Michaelis-Menten utilizando el programa informático Sigma Plot 7.101. Cada dato experimental se obtuvo a partir de la media de tres experimentos independientes.

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27 o la SEQ ID NO: 29.
2. Polinucleótido según la reivindicación 1 que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19.
3. Polinucleótido según la reivindicación 1 que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27 o la SEQ ID NO: 29.
4. Construcción genética de ADN o ARN que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:
 - a. un polinucleótido según la reivindicación 2, para su transcripción in vitro o in vivo,
 - b. una moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de (a), ó
 - c. secuencia de nucleótidos de a), ó b), correspondiente a un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación en tiempo y lugar.
5. Construcción genética según la reivindicación 4 que además comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:
 - a. un polinucleótido según la reivindicación 3,

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27 o la SEQ ID NO: 29.
2. Polinucleótido según la reivindicación 1 que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19.
3. Polinucleótido según la reivindicación 1 que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27 o la SEQ ID NO: 29.
4. Construcción genética de ADN o ARN que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:
 - a. un polinucleótido según la reivindicación 2, para su transcripción in vitro o in vivo,
 - b. una moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de (a), ó
 - c. secuencia de nucleótidos de a), ó b), correspondiente a un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación en tiempo y lugar.
5. Construcción genética según la reivindicación 4 que además comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:
 - a. un polinucleótido según la reivindicación 3,

- b. una moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de (a), ó
 - c. la secuencia polinucleotídica de (a) ó (b) operativamente enlazada con un polinucleótido aislado según la reivindicación 1, para su transcripción in vitro o in vivo.
- 6. Construcción genética según la reivindicación 5, en la que el polinucleótido que codifica el polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 15 se encuentra operativamente enlazado con el polinucleótido que codifica el polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 29.
- 7. Uso de los polinucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o de las construcciones genéticas según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, para producir lacasas fúngicas de alto potencial redox.
- 8. Método para generar lacasas de alto potencial redox, extracelulares, funcionales y solubles con actividad mejorada hacia uno o más sustratos, que comprende:
 - a. diseñar una construcción genética que comprenda la SEQ ID NO: 31 operativamente enlazada a la SEQ ID NO:33,
 - b. generar diversidad sobre la construcción genética de (a), y crear las librerías de mutantes,
 - c. seleccionar los mejores mutantes de expresión y actividad.
- 9. Método según la reivindicación anterior que además comprende la identificación y el mapeo de las mutaciones introducidas en las variantes seleccionadas.
- 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, donde la construcción genética del paso a) es la construcción genética según la reivindicación 5.

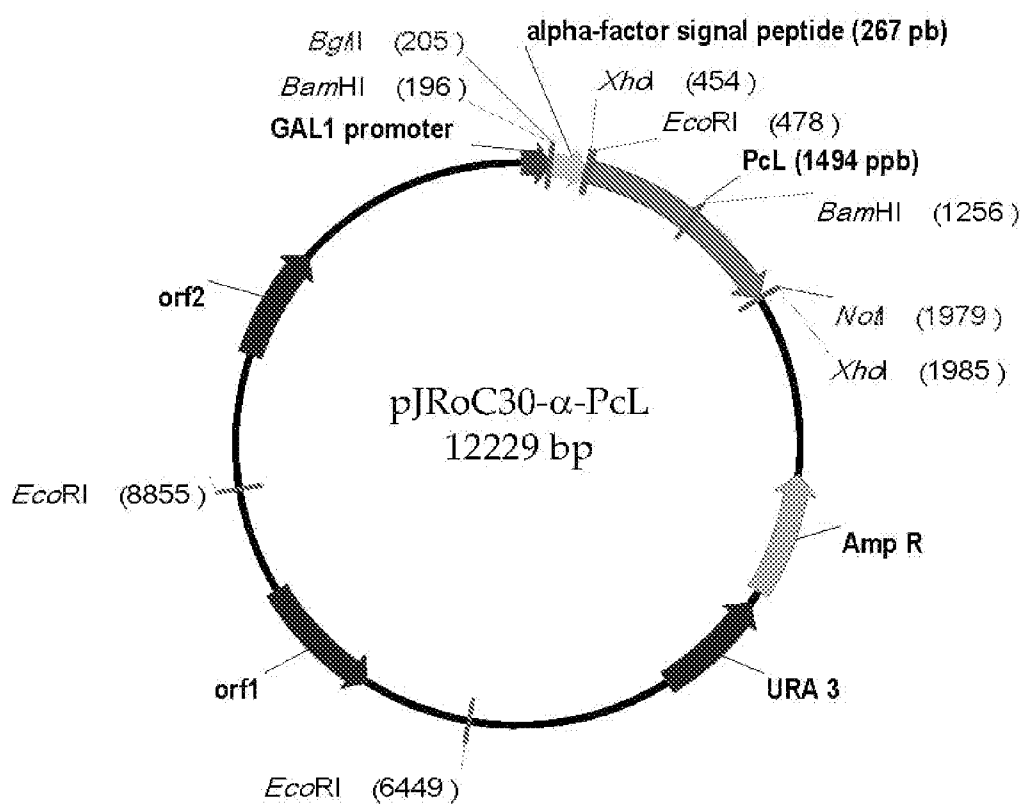
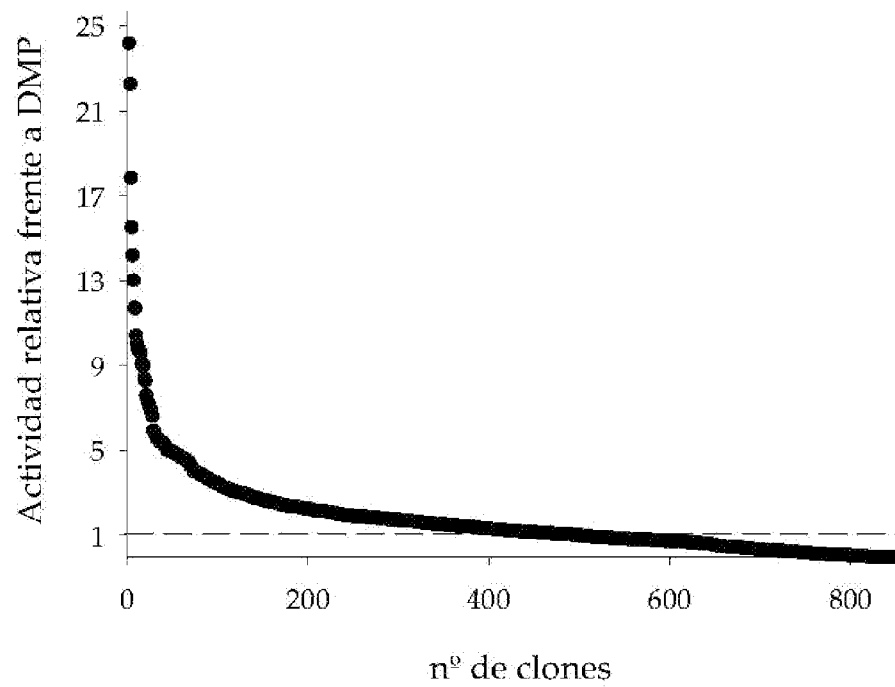
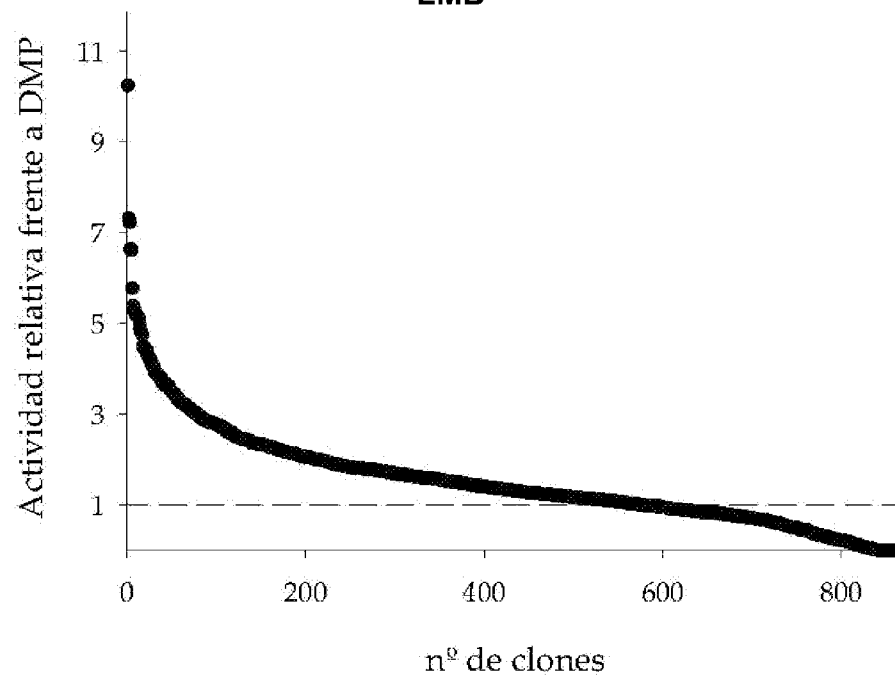


FIG. 1

2/12

LMM**FIG. 2A****LMB****FIG. 2B**

3/12

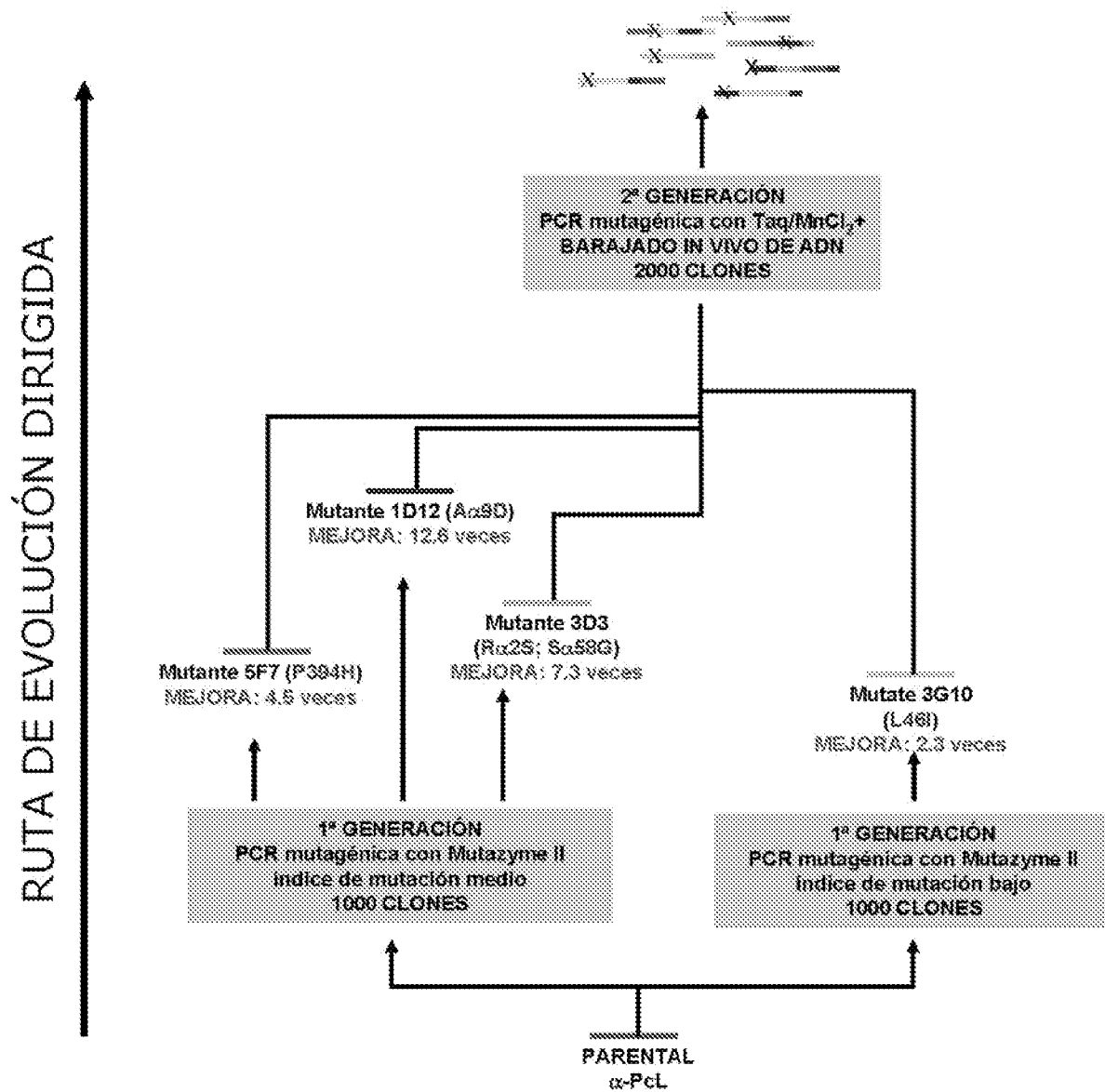


FIG. 3A

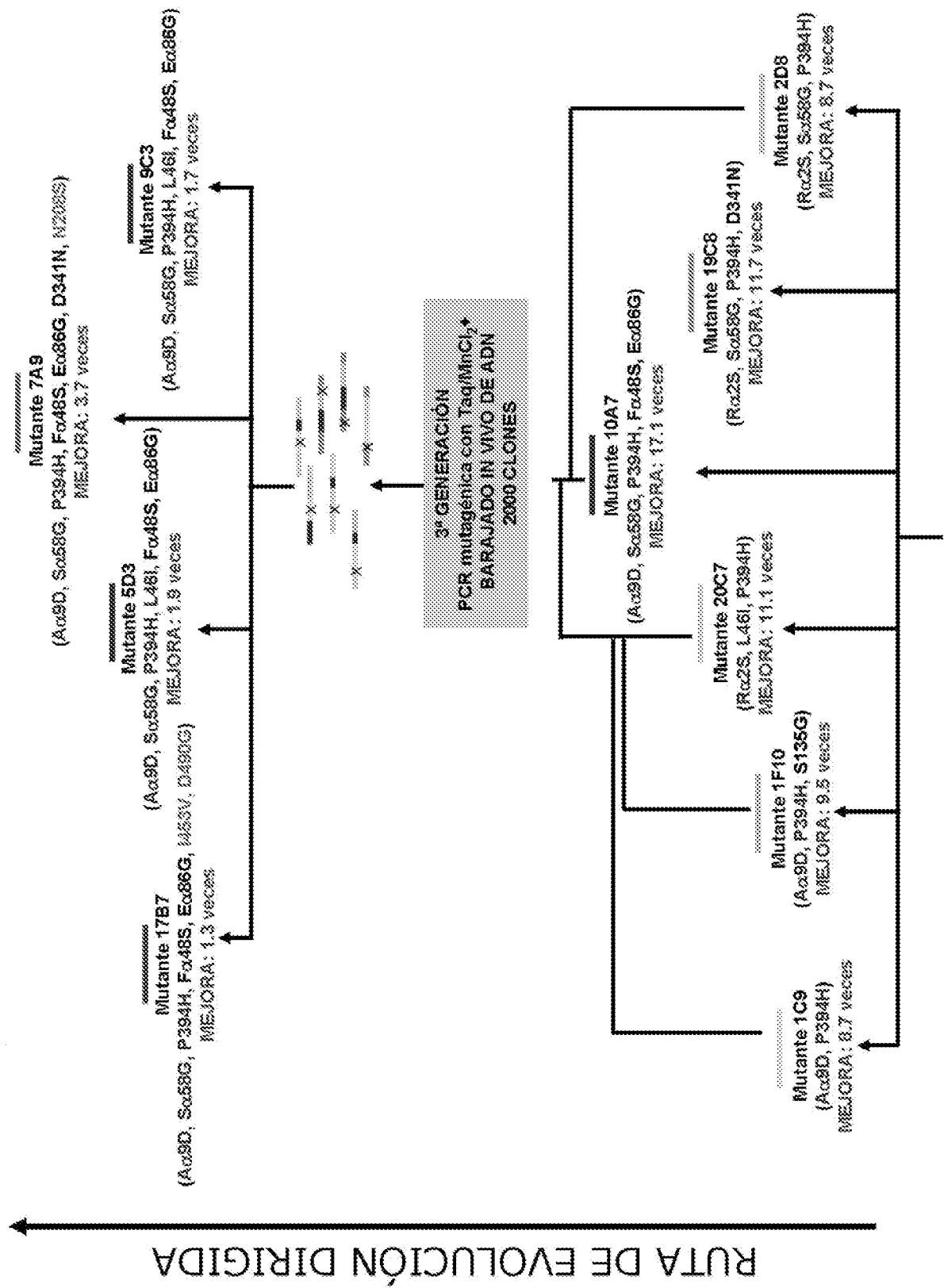


FIG. 3B

5/12

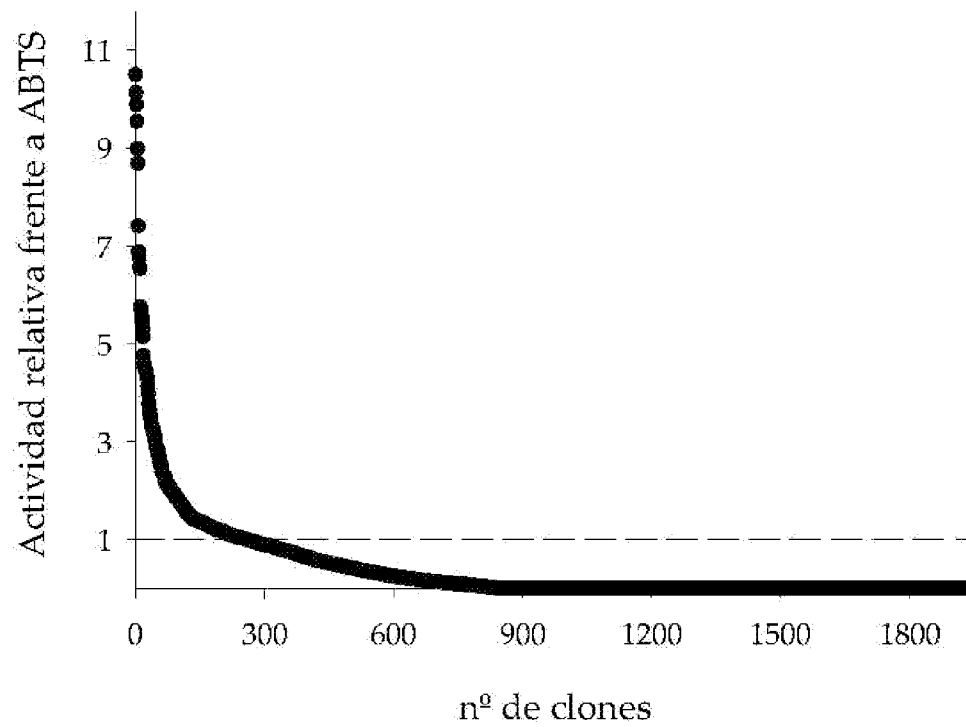


FIG. 4

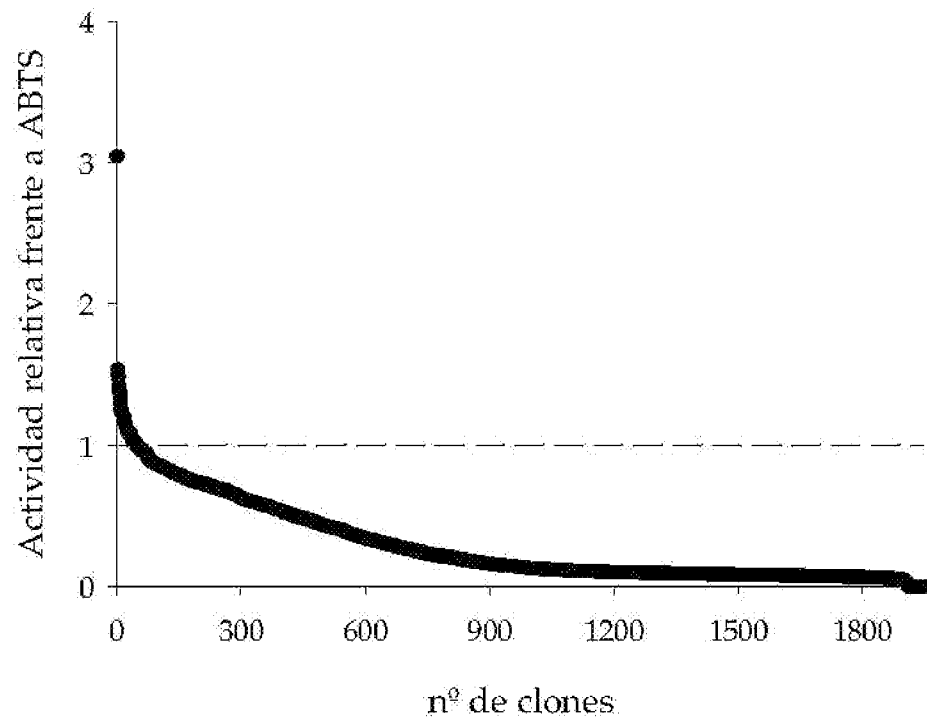


FIG. 5A

6/12

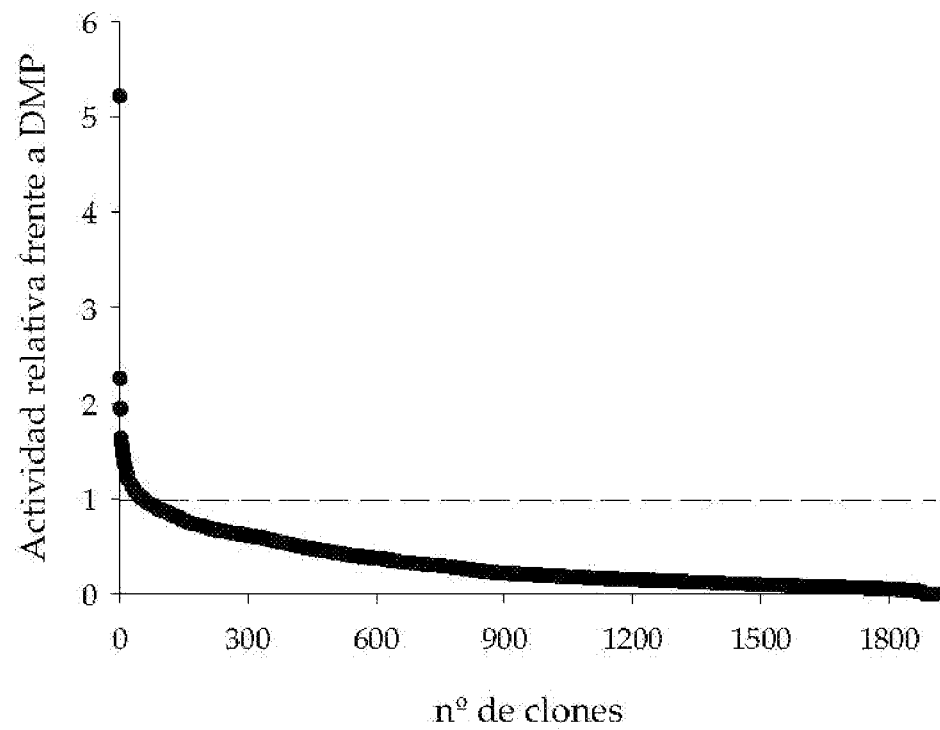


FIG. 5B

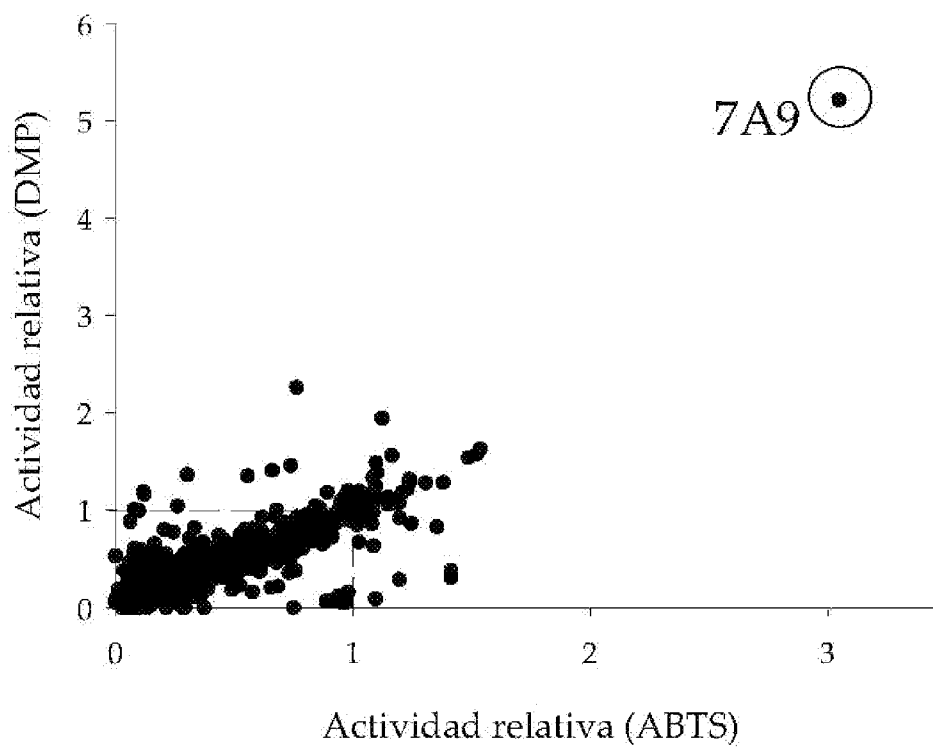


FIG. 5C

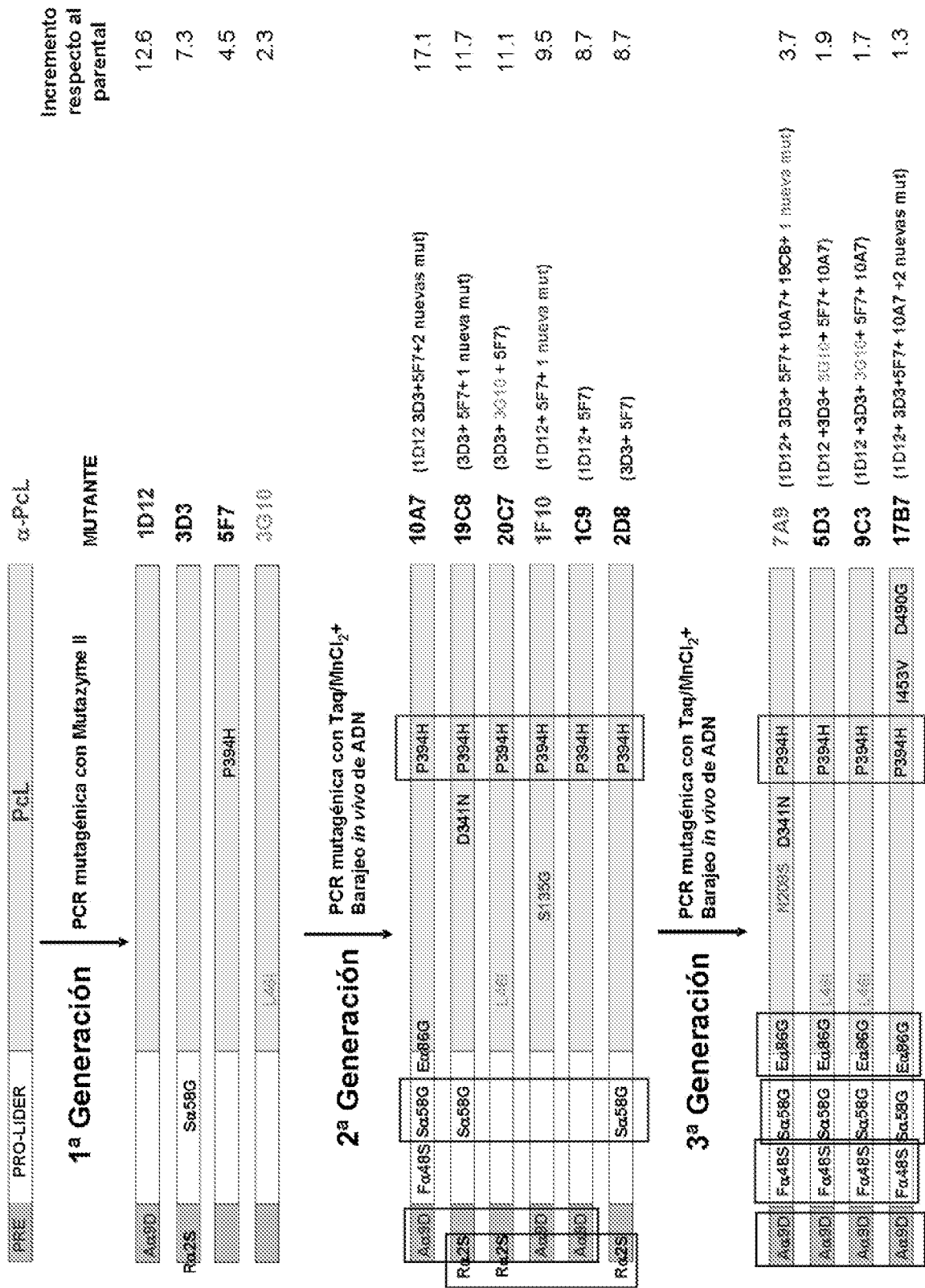


FIG. 6

Mejores mutantes de cada generación

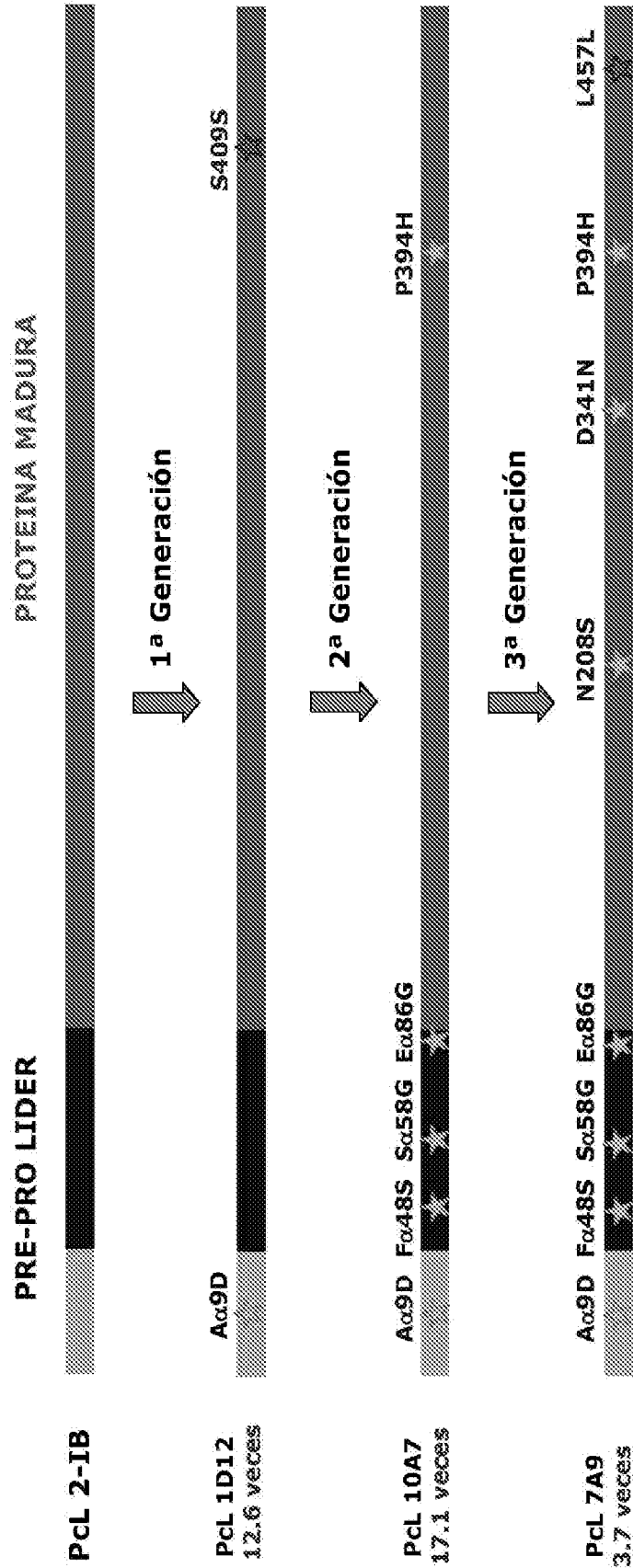


FIG. 7

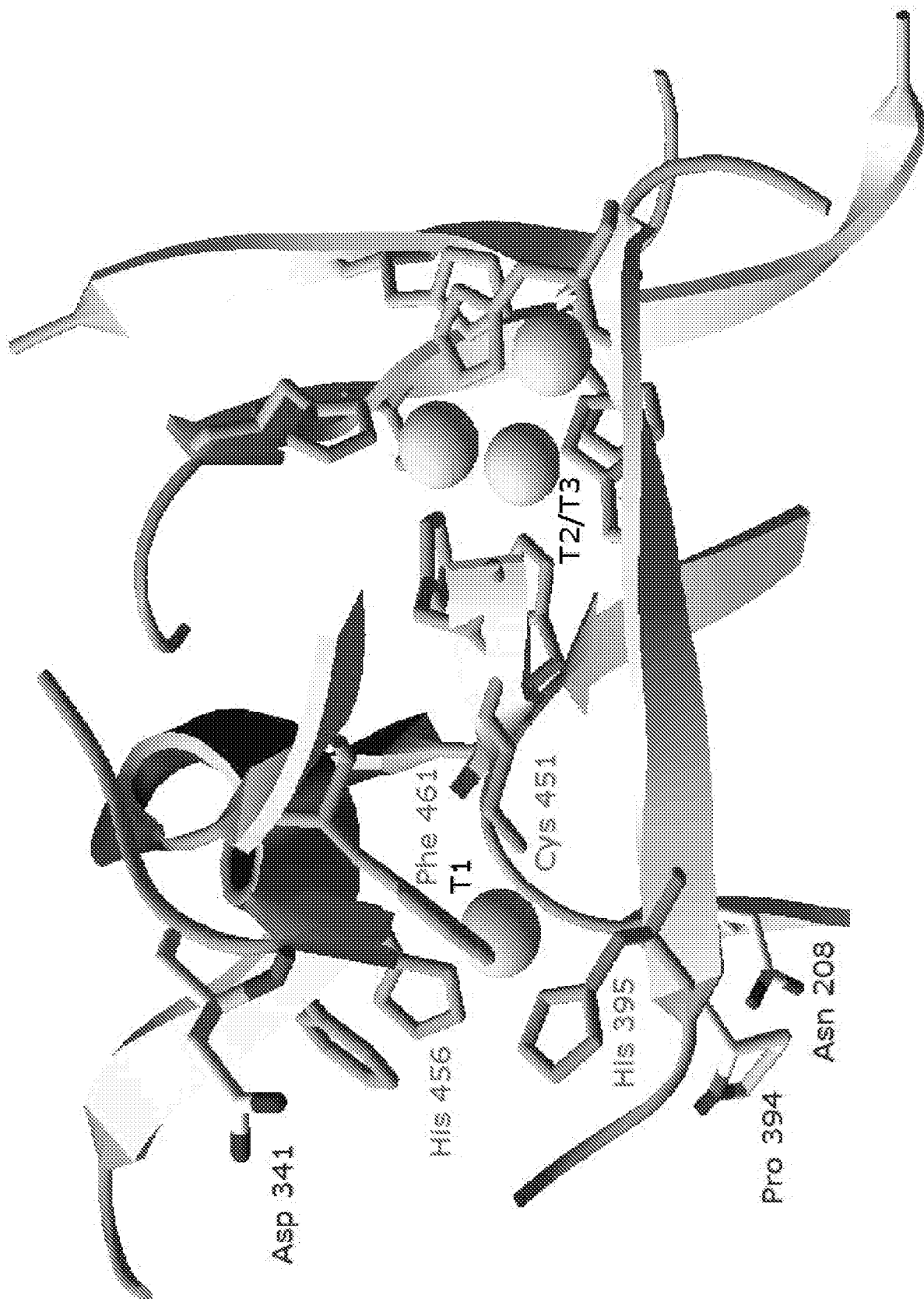


FIG. 8A

10/12

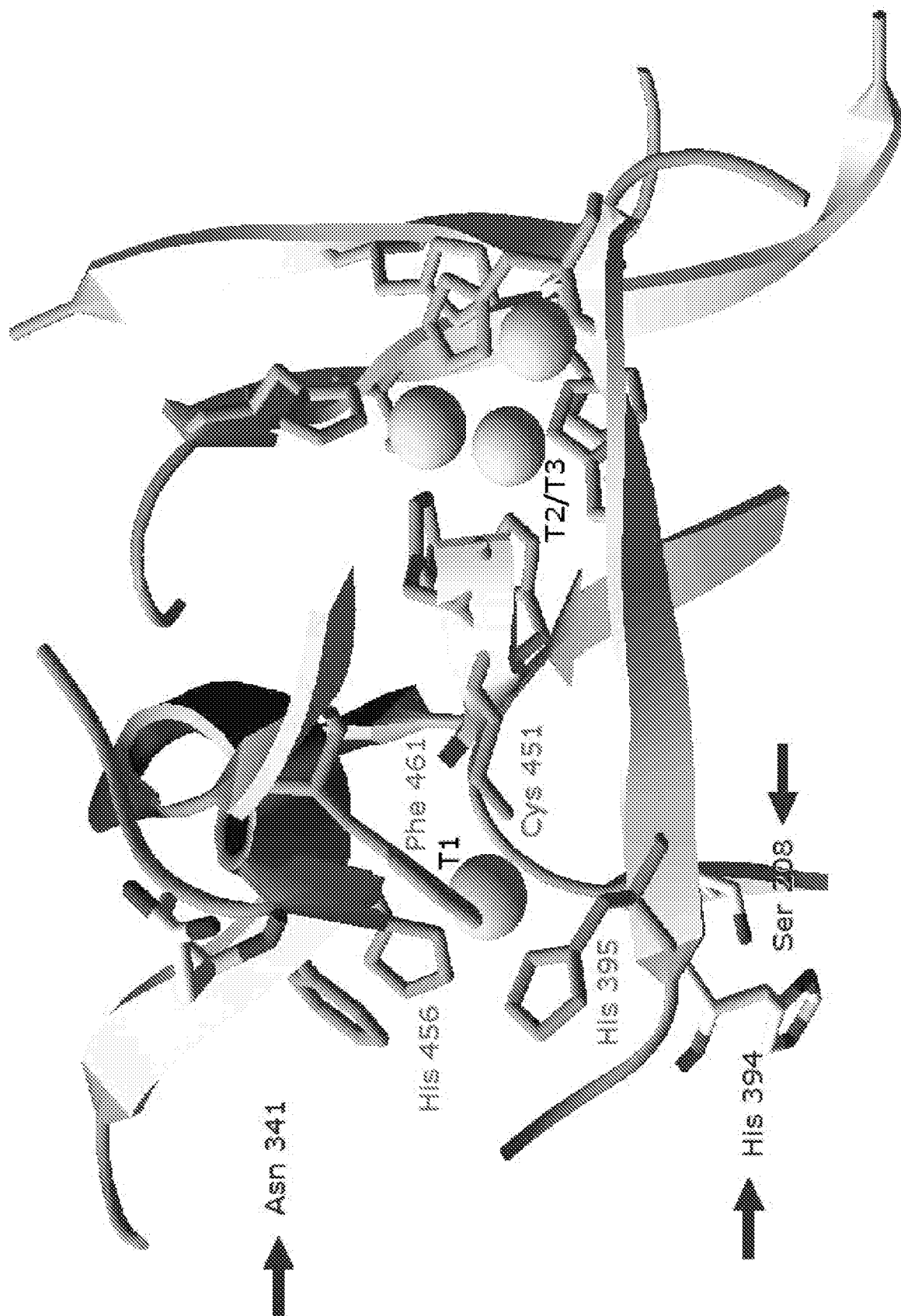


FIG. 8B

11/12

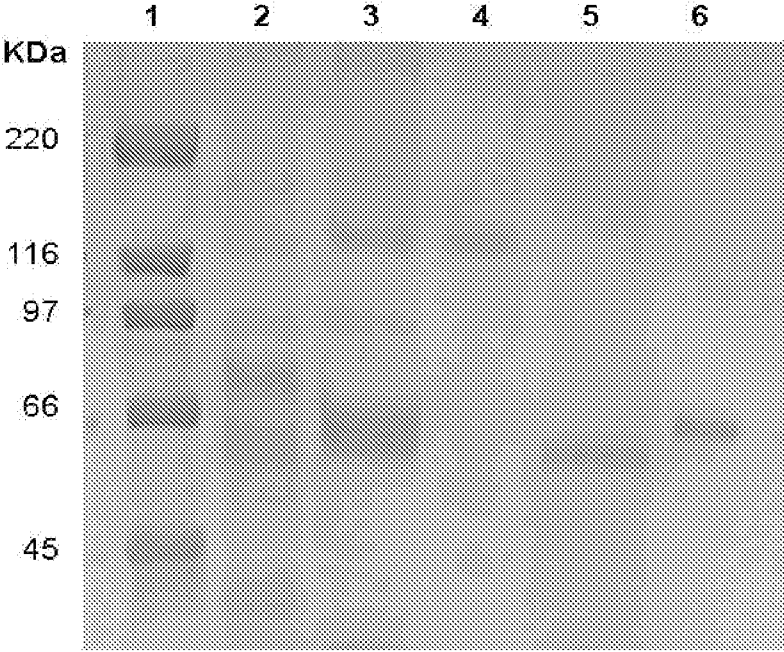


FIG. 9A

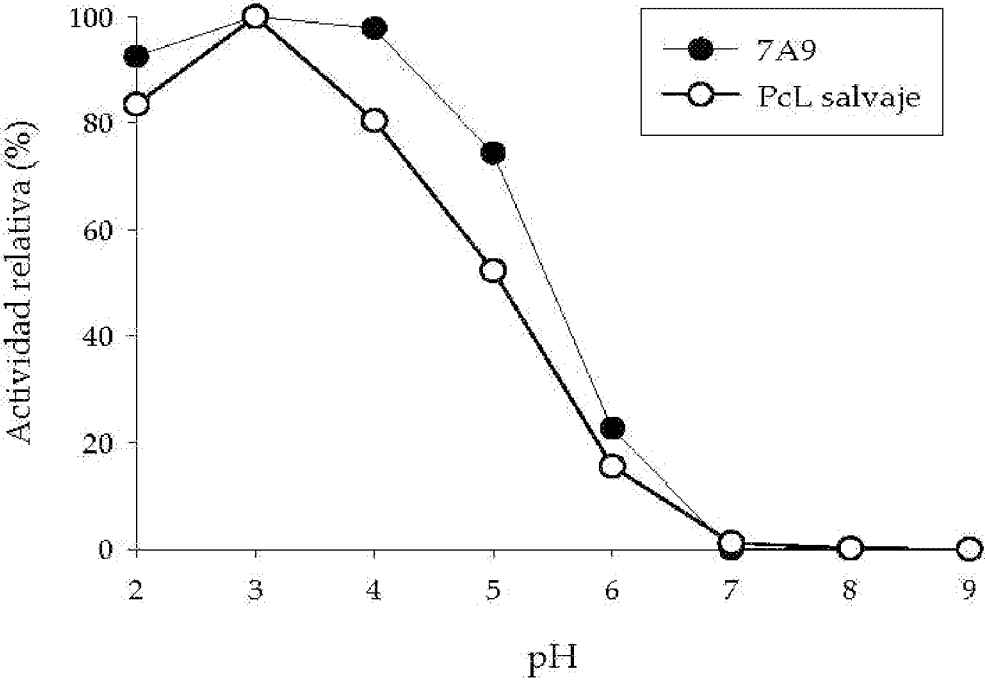


FIG. 9B

12/12

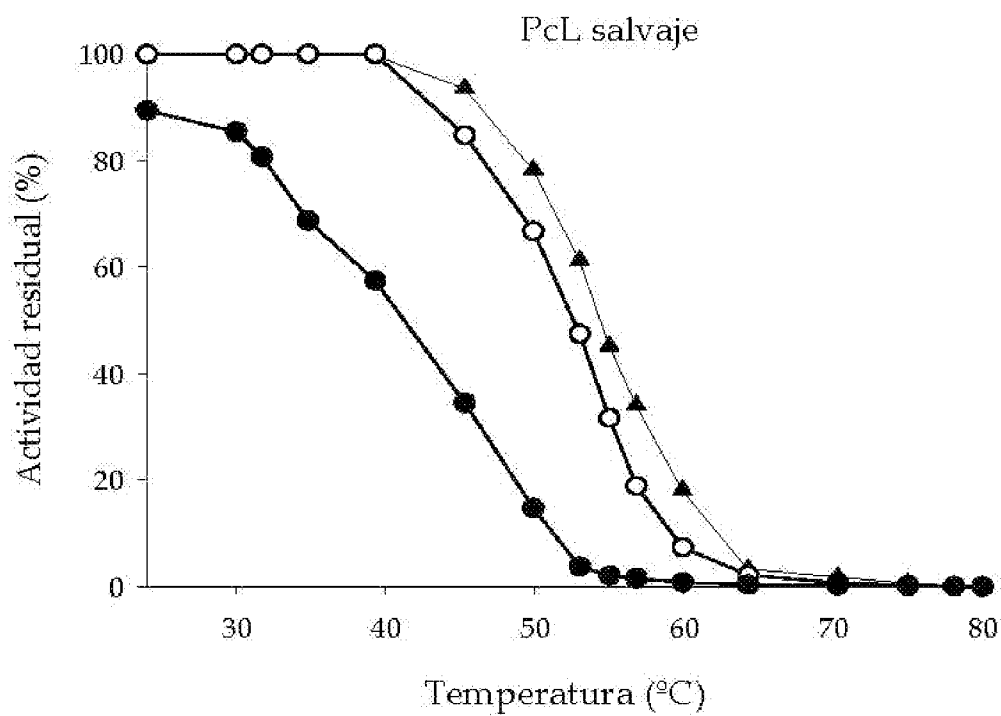
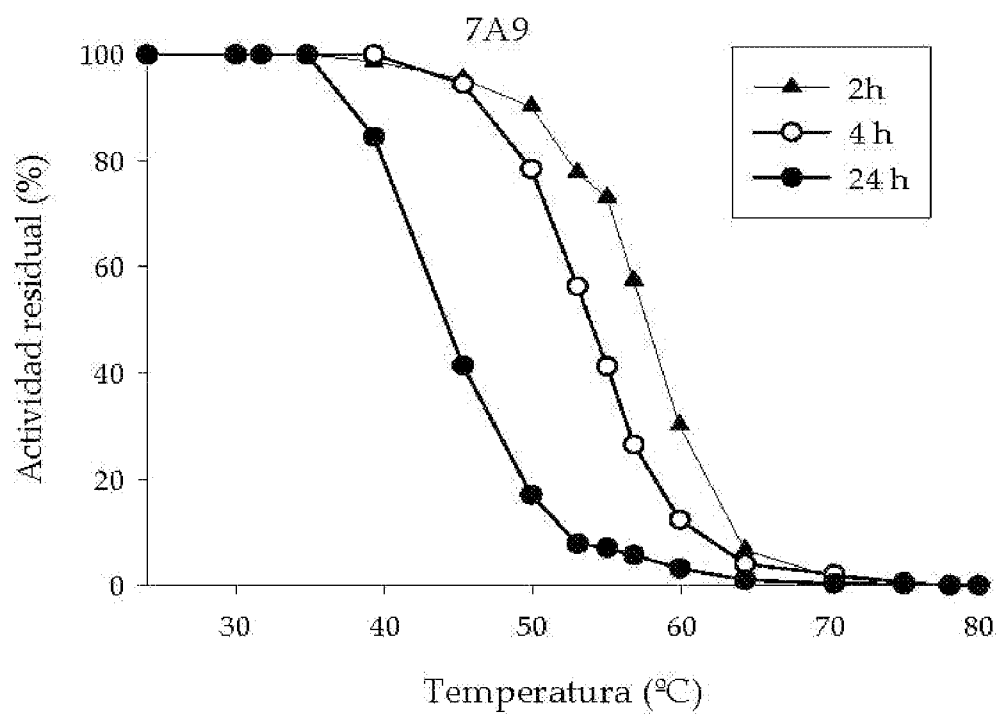


FIG. 9C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

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

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

INVENES,EPODOC,WPI, EBI-SITE,EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Festa Giovanna et al. "Development of new laccases by directed evolution: functional and computational analyses.". Proteins. Jul 2008. Vol 72, N°. 1, pages 25-34. ISSN 1097-0134 (Electronic).	1,2.
X	Roodveldt Cintia et al. "Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability". Current opinion in structural biology. Feb. 2005. Vol. 15, N° 1, Pages 50-56. ISSN 0959-440X	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2010 (15.03.2010)

Date of mailing of the international search report

(04/05/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

J. Manso Tomico

Telephone No. +34 91 349 55 83

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070516

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bulter T. et al. "Functional expression of a fungal laccase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by directed evolution". <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . 01.02.2003. Vol. 69, N° 2, Pages 987-995. ISSN 0099-2240 (print)	1,2
Y	Korona B. et al. "Efficient expression and secretion of two co-produced xylanases from <i>Aspergillus niger</i> in <i>Pichia pastoris</i> directed by their native signal peptides and the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> alpha-mating factor". <i>Enzyme and microbial Technology</i> . 02.08.2006. Vol. 39, N° 4, Pages 683-689. ISSN 0141-0229.	4,8-10
Y		4,8-10
A	Rakestraw J A. et al. "Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ". <i>Biotechnology and Bioengineering</i> . 15.08.2009. Vol 103, N° 6, pages 1192-1201. ISSN 0006-3592 (print)	6,7
P,X		1,3,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070516

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

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

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

2. ☒ Claims Nos.: **4, 5 (both in part)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

None of the claimed subject matter is supported by the description. The search was carried out based on the fact that the genic structure is linked to fusion proteins between the alpha and laccase factor.

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

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

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

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation Box III

A patent application may contain no more than one invention or one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The nucleic and polypeptidic sequences in the present application would involve a single general inventive concept if all the alternatives were to share a common property or activity and were to share a meaningful structural element that is essential as being responsible for the common activity or property. In addition, this structural element should be responsible for the technical effect that is intended to make a contribution over the prior art.

Invention 1: claims 1 (in part), 2, 4 (in part)

Polynucleotide that codes for the polypeptide, the amino acid sequence of which is chosen from the following list: SEQ. ID. N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19. Genetic structure comprising SEQ. ID. N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and sequence that hybridises with the previous sequence and functionally connected expression system or vector with at least one promoter that controls the transcription.

Invention 2: claims 1 (in part), 3, 5 (in part)

Polynucleotide that codes for the polypeptide, the amino acid sequence of which is chosen from the following list: SEQ. ID. N°s: 21, 23, 25, 27, 29. Genetic structure comprising SEQ. ID. N°s: 21, 23, 25, 27, 29 and sequence that hybridises with the previous sequence and functionally connected expression system or vector with at least one promoter that controls the transcription.

Invention 3: claims 6, 7, 8, 9, 10

Genetic structure: SEQ.ID.N° 15 ----SEQ.ID.N° 29, use thereof for producing fungal laccases with a high redox potential for generating laccases with a high redox potential through directed evolution from the genetic structure SEQ.ID.N° 31-----SEQ.ID.N° 33.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070516

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070516

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N

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

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

INVENES,EPODOC,WPI, EBI-SITE,EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	Festa Giovanna et al. "Development of new laccases by directed evolution: functional and computational analyses.". Proteins. Jul 2008. Vol 72, N°. 1, páginas 25-34. ISSN 1097-0134 (Electronic).	1,2.
X	Roodveldt Cintia et al. "Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability". Current opinion in structural biology. Feb. 2005. Vol. 15, N° 1, paginas 50-56. ISSN 0959-440X	1,2

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

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

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

15 Marzo 2010 (15.03.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

04-MAYO-2010 (04/05/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

J. Manso Tomico

Nº de teléfono +34 91 349 55 83

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070516

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	Bulter T. et al. "Functional expression of a fungal laccase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by directed evolution". <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . 01.02.2003. Vol. 69, N° 2, paginas 987-995. ISSN 0099-2240 (print)	1,2
Y	Korona B. et al. "Efficient expression and secretion of two co-produced xylanases from <i>Aspergillus niger</i> in <i>Pichia pastoris</i> directed by their native signal peptides and the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> alpha-mating factor". <i>Enzyme and microbial Technology</i> . 02.08.2006. Vol. 39, N° 4, paginas 683-689. ISSN 0141-0229.	4,8-10
Y		4,8-10
A	Rakestraw J A. et al. "Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ". <i>Biotechnology and Bioengineering</i> . 15.08.2009. Vol 103, N° 6, páginas 1192-1201. ISSN 0006-3592 (print)	6,7
P,X		1,3,5

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070516

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones N°s: 4, 5 (ambas parcialmente)
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
La totalidad de la materia reivindicada no esta basada en descripción. La búsqueda se ha realizado en la medida que la construcción génica esta relacionada con proteínas de fusión entre factor alpha y lacasas.
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Ver Hoja Adicional.

1. ☒ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- ☒ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

Continuacion Recuadro III.

Una solicitud de patente no podrá comprender más que una sola invención o un grupo de invenciones relacionadas entre sí de tal manera que integren un único concepto inventivo general.

Las secuencia nucleicas y polipeptídicas objeto de la presente solicitud integrarían un único concepto inventivo general si todas las alternativas tuvieran una propiedad o actividad común y compartiesen un elemento estructural significativo, que fuera esencial como responsable de la actividad o propiedad común. Además, ese elemento estructural común debe ser el responsable del efecto técnico que suponga una contribución sobre el estado de la técnica anterior.

Invención 1: reivindicación 1 (en parte), 2, 4 (parcialmente)

Polinucleótido que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista SEQ.ID.N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19. Construcción genética que comprende SEQ.ID.N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 + secuencia que hibrida con la secuencia anterior + sistema o vector de expresión, operativamente enlazado, con al menos un promotor que dirija la transcripción.

Invención 2: reivindicación 1 (en parte), 3, 5 (parcialmente)

Polinucleótido que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista SEQ.ID.N°s: 21, 23, 25, 27, 29. Construcción genética que comprende SEQ.ID. N° s: 21, 23, 25, 27, 29 + secuencia que hibrida con la secuencia anterior + sistema o vector de expresión, operativamente enlazado, con al menos un promotor que dirija la transcripción.

Invención 3: reivindicaciones 6, 7, 8, 9, 10.

Construcción genética: SEQ.ID.N° 15 ----SEQ.ID.N° 29, uso de la misma para producir lacasas fúngicas de alto potencial redox, método para generar lacasas de alto potencial redox por evolución dirigida, a partir de la construcción genética SEQ.ID.N° 31-----SEQ.ID.N° 33.

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)