



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 333 789**

(51) Int. Cl.:
C12N 9/20 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03744218 .3**

(96) Fecha de presentación : **05.03.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1543117**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

(54) Título: **Procedimiento de cribado de mutagénesis de alta productividad.**

(30) Prioridad: **05.03.2002 US 91912**
05.03.2002 US 92227
05.03.2002 US 362372 P
15.08.2002 US 403921 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2010

(73) Titular/es: **GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.**
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

(72) Inventor/es: **Bott, Richard, R.;**
Kellis, James, T., Jr. y
Morrison, Thomas, B.

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de cribado de mutagénesis de alta productividad.

5 **Campo de la invención**

La invención proporciona variantes de cutinasa que proporcionan estabilidad y actividad mejoradas en comparación con la cutinasa de tipo salvaje.

10 **Antecedentes de la invención**

Se usan varios procedimientos de mutagénesis en la modificación de proteínas para obtener proteínas con propiedades y/o capacidades deseadas. En la mayoría de estos procedimientos, se muta la secuencia de nucleótidos de un gen clonado que codifica una proteína y se expresa el gen modificado para producir mutantes, que a continuación se someten normalmente a cribado para actividades de interés. A continuación, las actividades de las proteínas mutantes se comparan habitualmente con las de proteínas de tipo salvaje.

En la técnica se conoce una serie de procedimientos de mutagénesis. Un procedimiento general implica mutagénesis de saturación de sitios, que produce una población de genes mutados que consiste en genes por lo demás idénticos, pero incluye codones introducidos aleatoriamente. El codón introducido aleatoriamente puede codificar para cualquier aminoácido, y se dice que la posición está "saturada" (Airaksinen y Hovi, *Nucleic Acids. Res.* 26:576-581[1998]). Existen varios procedimientos diferentes de saturación de sitios conocidos en la técnica.

Como la mayoría de los procedimientos de mutagénesis proporcionan un gran número de opciones de mutación de aminoácidos, generalmente se requiere el cribado de un gran número de variantes para producir una propiedad de proteína deseada. Generalmente, el cribado se repite múltiples veces con el fin de producir una variante beneficiosa de interés. Así, existe una necesidad continuada en la técnica de procedimientos de mutagénesis y cribado que proporcionen facilidad de uso relativa así como que sean eficaces en términos de protocolos y análisis de datos, con el fin de obtener resultados de ingeniería de proteínas.

El documento EP-0.268.452 describe una cutinasa *P. putida* ATCC53552, actualmente clasificada como *P. mendocina*.

Resumen de la invención

La presente solicitud describe procedimientos de mutagénesis para ingeniería de proteínas. En particular, la presente solicitud describe procedimientos de mutagénesis que incluyen ajuste de realimentación a partir de evaluación sistemática de los resultados. Más específicamente, la solicitud describe procedimientos de mutagénesis de saturación de sitios que criban variantes con una o más propiedades deseables de proteínas y evalúa los resultados del cribado para proporcionar realimentación para repetir el cribado y la construcción de nuevas genotecas. La invención proporciona variantes de cutinasa que proporcionan estabilidad y actividad mejoradas en comparación con la cutinasa de tipo salvaje.

Los procedimientos de cribado de mutagénesis de alta productividad seleccionan sitios para barrido de saturación que usan consideraciones estructurales de las proteínas. En realizaciones preferidas, se crean genotecas de saturación de sitios y se criban usando ensayos seleccionados para identificar clones que tengan propiedades de proteínas de interés. Los sitios de mutación se categorizan basándose en sus propiedades de interés, y se identifican tendencias, si existieran. Se selecciona un variante o múltiples variantes que tengan al menos una propiedad deseada para procedimientos de creación de genotecas adicionales. Estas genotecas adicionales se crean usando realimentación a partir de las categorías determinadas. Un conjunto de genotecas adicionales repite la construcción de las genotecas anteriores usando la realimentación. Un segundo conjunto de genotecas adicionales representa nuevas genotecas creadas en sitios de los que se espera que sean beneficiosos basándose en la realimentación. En algunas realizaciones estas categorías se codifican (es decir, usando color u otros indicios), para permitir una fácil identificación de tendencias.

La presente invención proporciona numerosas variantes de cutinasa. Estas variantes comprenden una sustitución de uno o más aminoácidos en posiciones de residuo correspondientes a sitios 34, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 99, 164, 191-196, 219, 223 y 225 de cutinasa de *Pseudomonas mendocina* ID SEC N°: 2, en la que dicha variante de cutinasa es termoestable y tiene actividad hidrolítica sobre poliéster. En algunas realizaciones preferidas especialmente, las variantes proporcionan actividad mejorada en diversas condiciones y/o estabilidad mejorada en comparación con la cutinasa de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona variantes de cutinasa de cutinasa de *Pseudomonas mendocina* ID SEC N°: 2, en la que las variantes comprenden sustitución de Phe 194 por Pro, sustitución de Ser 219 por Gly, y una o más sustituciones adicionales en al menos una posición de aminoácido seleccionada entre las posiciones de aminoácidos 54, 78, 81, 191, 196, 200, 204 y 263.

En algunas realizaciones, las variantes tienen posición de aminoácido 54 sustituida por Ser, Glu o Thr. En otras realizaciones, la posición de aminoácido 78 está sustituida por Val. En realizaciones adicionales, la posición de aminoácido 81 está sustituida por Ser. En aún más realizaciones adicionales, la posición de aminoácido 191 está sustituida por Asn o His. En otras realizaciones, la posición de aminoácido 196 está sustituida por Leu o Ala. En realizaciones

adicionales, la posición de aminoácido 200 está sustituida por Leu. En otras realizaciones adicionales, la posición de aminoácido 204 está sustituida por Leu. En realizaciones adicionales, la posición de aminoácido 263 está sustituida por Pro.

5 La presente invención proporciona también variantes de cutinasa que comprenden una sustitución de uno o más aminoácidos en posiciones de residuo que corresponden a los sitios 34, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 99, 164, 191-196, 219, 223 y 225 de cutinasa de *Pseudomonas mendocina* ID SEC N°: 2, en las que las variantes de cutinasa tienen actividad de poliesterasa. En algunas realizaciones, las variantes de cutinasa comprenden la sustitución de GLY 73 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Phe, Lys, Leu y Val, y en las que la variante de cutinasa tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En otras realizaciones, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Thr 191 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en His, Leu y Tyr, y en la que la variante de cutinasa tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En realizaciones alternativas, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Thr 78 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ala, Leu y Val, y en la que la variante de cutinasa tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Tyr 164 por Phe, y en la que la variante de cutinasa tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En otras realizaciones más, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Tyr 196 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ala, Leu y Pro, y en la que la variante de cutinasa tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En otras realizaciones adicionales, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Phe 194 y la sustitución de Ser 219, y en la que la variante de cutinasa tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En realizaciones adicionales, Phe en posición 194 se sustituye por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ala, His, Lys, Leu, Asn, Pro y Gly, y en que Ser 219 se sustituye por Gly. En algunas realizaciones preferidas especialmente, la variante de cutinasa tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Ala 80 por Glu, y en la que la variante de cutinasa tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En realizaciones adicionales preferidas, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Phe 194 por Ile, y la variante de cutinasa tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En otras realizaciones adicionales, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Phe 194 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Lys y Leu, y la sustitución de Ser 219 por Gly, y la variante de cutinasa tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En otras realizaciones más, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Phe 194 por Asn, y en la que la variante de cutinasa tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En realizaciones adicionales, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Phe 194 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Asn, Pro y Ser, y la sustitución de Ser 205 por Gly, y en la que la variante de cutinasa tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En otras realizaciones adicionales, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Gly 73 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Phe y Leu, y en la que la variante de cutinasa tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En realizaciones adicionales, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Gly 75 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Asp y Glu, y en la que la variante de cutinasa tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la variante comprende las siguientes sustituciones Ile 192 por Met; Phe 194 por Val; y Ser 219 por Gly. En realizaciones preferidas especialmente, estas variantes de cutinasa tienen actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje.

45 En una realización adicional más, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Ser 219 por Asn, y la sustitución de Phe 221 por Leu, y tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje.

En realizaciones adicionales, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Ser 99 por Lys, y tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En realizaciones adicionales, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Thr 191 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en His, Leu y Tyr, y tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En realizaciones alternativas, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Thr 78 por Leu, y tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En realizaciones adicionales, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Tyr 196 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ala y Pro, y tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Phe 194 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ile, Leu, Asn y Pro, y tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En otras realizaciones, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Arg 204 por Leu, y tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En realizaciones adicionales, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Arg 204 por Leu, y tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En otras realizaciones adicionales, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Leu 263 por Pro, y tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En otras realizaciones, la variante de cutinasa comprende la sustitución de Leu 263 por Pro, y tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje. En algunas realizaciones, las mutaciones descritas anteriormente están presentes en combinación, mientras que en otras realizaciones, están presentes como mutaciones únicas.

La presente invención proporciona además variantes de cutinasa que comprenden una sustitución de uno o más aminoácidos en posiciones de residuo correspondientes a sitios 34, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 99, 164, 191-196, 219, 223 y 225 de cutinasa de *Pseudomonas mendocina* ID SEC N°: 2, en la que la variante de cutinasa es termoestable y tiene actividad hidrolítica sobre poliéster.

La presente solicitud describe también procedimientos para obtener una variante que tenga una o más propiedades deseadas de proteínas que comprende las etapas de: selección de sitios de aminoácidos en una proteína para mutación; realización de mutagénesis en los sitios de mutación seleccionados para crear una genoteca; cribado de la genoteca para variantes que tienen una o más propiedades deseadas de proteínas; calificación de los sitios de mutación de las variantes para la una o más propiedades deseadas de proteínas; selección de una o más variantes que tienen una calidad deseable como plantilla para, con realimentación desde la calificación, creación y cribado de genotecas adicionales, en la que el procedimiento usa mutaciones cooperativas para obtener una variante que tenga al menos dos mutaciones. En algunas realizaciones, la etapa de mutagénesis se realiza mediante mutagénesis de saturación de sitios y en la que la selección de sitios de aminoácidos se realiza usando consideraciones estructurales de proteínas. En realizaciones adicionales, las etapas de creación y cribado de genotecas adicionales se realizan repitiendo mutagénesis de saturación de sitios en sitios de mutación que tienen calidades deseables y realización de mutagénesis de saturación de sitios en nuevos sitios en nuevas genotecas. En realizaciones adicionales, la etapa de realización de saturación de sitios repetidas se realiza seleccionando sitios situados cerca de sitios de mutación que tengan calidades deseables. En otras realizaciones adicionales, las consideraciones estructurales de proteínas comprenden factores como la posición del sitio de unión, la estructura tridimensional, la secuencia de aminoácidos, la naturaleza de la reacción química o la naturaleza de la unión química. En algunas realizaciones preferidas, la propiedad de proteínas comprende una propiedad de enzimas. En algunas realizaciones preferidas especialmente, la propiedad de enzimas comprende al menos una propiedad seleccionada entre el grupo que consiste en catálisis, unión y estabilidad. En realizaciones alternativas, la etapa de cribado para una o más variantes se realiza seleccionando y realizando ensayos para la una o más propiedades de proteínas de interés. En otras realizaciones más, la calificación se realiza por identificación de tendencias. En algunas realizaciones preferidas, la etapa de identificación de tendencias se realiza representando gráficamente una distribución espacial de sitios de calidad en una representación tridimensional de la proteína. En algunas realizaciones adicionales preferidas, la etapa de identificación de tendencias se realiza representando gráficamente identidades de mutación de aminoácidos. En otras realizaciones más, la etapa de identificación de tendencias se realiza representando gráficamente una distribución de sitios de mutación de calidad. En realizaciones adicionales, las etapas de creación y cribado de genotecas adicionales se realizan por cribado de las genotecas adicionales para las propiedades deseadas de proteínas y repetición de mutagénesis de saturación de sitios hasta que se alcance un objetivo de propiedad deseada de proteína.

La presente solicitud describe también procedimientos u obtención de una variante de enzima que tiene una o más propiedades deseadas que comprenden: uso de una representación tridimensional de la enzima para seleccionar sitios de mutación basándose en los aminoácidos; realización de mutagénesis de saturación de sitios en los sitios seleccionados de mutación para crear una genoteca; cribado de la genoteca para variantes que tengan una o más propiedades deseadas; calificación de los sitios de mutación de las variantes para una o más propiedades deseadas; selección de una o más variantes que tengan una calidad deseable como plantilla; uso de la plantilla y la realimentación para repetir la mutagénesis de saturación de sitios en sitios de mutación que tengan calidades deseables y para realizar mutagénesis de saturación de sitios en nuevas genotecas en nuevos sitios. En otras realizaciones adicionales, se seleccionan una o más propiedades deseadas entre el grupo que consiste en actividad de sustrato, termoestabilidad, estabilidad relativa al entorno de reacción, intervalo de estabilidad de fuerza iónica, estabilidad de presión e intervalo de estabilidad de pH. En algunas realizaciones preferidas, se seleccionan una o más propiedades deseadas entre el grupo que consiste en actividad de sustrato y termoestabilidad. En algunas realizaciones preferidas especialmente, la enzima es cutinasa.

La presente solicitud describe también procesos (es decir, procedimientos) para la producción de una variante de cutinasa con actividad hidrolítica sobre poliéster, en la que la cutinasa es una variante de cutinasa de *Pseudomonas*, comprendiendo el proceso: uso de un modelo tridimensional para seleccionar sitios de mutación de aminoácidos con probabilidad de demostrar actividad hidrolítica; realización de mutagénesis de saturación de sitios en los sitios de mutación seleccionados de aminoácidos para crear una genoteca que tenga variantes con sitios mutados; cribado de la genoteca para variantes que tengan sitios mutados, usando ensayos para detectar actividad de poliesterasa y termoestabilidad; calificación los sitios mutados como beneficiosos, neutros o perjudiciales para actividad de poliesterasa y termoestabilidad; selección de una variante que tenga al menos una calidad beneficiosa; creación de genotecas nuevas y de repetición usando la variante seleccionada y realimentación a partir de la calificación.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Proporciona una vista esquemática que ilustra el principio general de la invención.

Figura 2. Proporciona una gráfica que muestra la relación entre actividad de poliesterasa y concentración de proteínas, según se determina por ensayo TCA para varios transformantes diferentes de *Bacillus subtilis*.

Figura 3. Proporciona una gráfica que muestra la actividad de poliesterasa de variantes de cutinasa de la "Genoteca A" en dos genotecas de saturación de sitios relativa a los resultados del ensayo TCA. Asimismo se muestran controles de enzimas de tipo salvaje.

Figura 4. Proporciona una gráfica que muestra la actividad de poliesterasa de variantes de cutinasa de la “Genoteca B” en dos genotecas de saturación de sitios relativa a los resultados del ensayo TCA. Asimismo se muestran controles de enzimas de tipo salvaje.

5 Figura 5. Proporciona una gráfica que muestra la estabilidad térmica en detergente de lavado de variantes de cutinasa de la “Genoteca A” en dos genotecas de saturación de sitios relativa a los resultados de actividad pNB. Se muestran también controles de enzimas de tipo salvaje.

10 Figura 6. Proporciona una gráfica que muestra la estabilidad térmica en detergente de lavado de variantes de cutinasa de la “Genoteca B” en dos genotecas de saturación de sitios relativa a los resultados de actividad pNB. Se muestran también controles de enzimas de tipo salvaje.

15 Figura 7. Proporciona un diagrama que muestra la estructura tridimensional de una proteína que muestra la cara del sitio activo de la triada catalítica (color oscuro) de cutinasa de *Pseudomonas mendocina*.

Figura 8. Proporciona una representación alternativa representación de la Figura 7. En esta Figura, los aminoácidos objeto iniciales para el procedimiento de mutagénesis de saturación de sitios de la presente invención se muestran en un color más oscuro.

20 Figura 9. Proporciona una representación alternativa de la Figura 7. En esta Figura, los sitios que muestran al menos el 2% de variantes con actividad de enzimas mejorada se muestran en un color más oscuro.

25 Figura 10. Proporciona otra representación alternativa de la Figura 7. En esta Figura, los sitios en que la mayoría de las mutaciones no tuvieron efecto en la actividad de enzimas se muestran en color oscuro.

Figura 11. Proporciona otra representación de la Figura 7. En esta Figura, los sitios en los que la mayoría de las mutaciones tuvieron un efecto perjudicial en la actividad de enzimas se muestran en color oscuro.

30 Figura 12. Proporciona otra representación de la Figura 7. En esta Figura, los sitios que muestran al menos el 2% de variantes con estabilidad de proteínas mejorada se muestran en color oscuro.

Figura 13. Muestra otra representación más de la Figura 7. En esta Figura, los sitios en los que la mayoría de las mutaciones no tuvieron efecto en la estabilidad de proteínas se muestran en color oscuro.

35 Figura 14. Proporciona otra representación de la Figura 7. En esta Figura, los sitios en los que la mayoría de las mutaciones tuvieron un efecto perjudicial en la estabilidad de proteínas se muestran en color oscuro.

40 Figura 15. Proporciona una gráfica que muestra la actividad de una segunda variante de generación en comparación con la enzima de tipo salvaje.

Figura 16. Proporciona una gráfica que muestra la termoestabilidad incrementada de una segunda variante de generación frente al tipo salvaje.

45 Figura 17. Proporciona la secuencia de nucleótidos (ID SEC N°: 1) de la cutinasa de *P. mendocina* progenitora expresada en *Bacillus subtilis* #3934.

Figura 18. Proporciona el aminoácido (ID SEC N°: 2) y la secuencia de ADN (ID SEC N°: 1) para la cutinasa de *P. mendocina* progenitora.

50 Descripción de la invención

La presente solicitud describe procedimientos de mutagénesis para ingeniería de proteínas. En particular, la presente solicitud describe procedimientos de mutagénesis que incluyen ajuste de realimentación a partir de evaluación sistemática de los resultados. Más específicamente, la solicitud describe procedimientos de mutagénesis de saturación de sitios que criban variantes con una o más propiedades deseables de proteínas y evalúan los resultados del cribado para proporcionar realimentación para cribado repetido y construcción de nuevas genotecas. La invención proporciona variantes de cutinasa que proporcionan estabilidad y actividad mejoradas en comparación con la cutinasa de tipo salvaje.

60 La presente solicitud describe procedimientos de mutagénesis de barrido y saturación de sitios para producir variantes mejoradas de proteínas usando tan sólo dos sustituciones de aminoácidos en secuencia. En realizaciones preferidas, los procedimientos incluyen ajuste de realimentación a partir de la evaluación sistemática de resultados de cribado para múltiples propiedades de proteínas después de sustitución de aminoácidos. El procedimiento identifica y califica las sustituciones de aminoácido y los sitios de mutación de las sustituciones basándose en los resultados de ensayos seleccionados para detectar al menos una propiedad deseada y mejorada de proteínas. El procedimiento correlaciona además los sitios de mutación y las mutaciones específicas con los resultados de los ensayos, facilitando la identificación de tendencias y permitiendo la construcción de nuevas genotecas moleculares e identificación calificada de sitios de mutación para una mayor mejora. El procedimiento implica también mutagénesis repetida de las

genotecas iniciales, produciendo mutaciones cooperativas que mejoran las propiedades de proteínas con tan sólo dos mutaciones. También se crean nuevas genotecas en nuevos sitios seleccionados con realimentación de calificación.

Los procedimientos generales se exponen de forma general en la Figura 1. En realizaciones preferidas, los sitios se seleccionan para saturación basándose en información estructural de proteínas y/o cualquier hipótesis relacionada con relaciones estructurales-funcionales en la etapa 2 (véase Figura 1), y las genotecas de saturación de sitios se crean en la etapa 4 (véase Figura 1). Las genotecas creadas se someten a continuación a cribado en la etapa 6 (véase Figura 1) en cuanto a su(s) propiedad(es) de interés, y se usan los resultados del cribado para categorizar los sitios en la etapa 8 (véase Figura 1). Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, los sitios se ordenan como “beneficiosos”, “neutros” o “perjudiciales”, mientras que en otras realizaciones, se designan otras categorías según se desee. En la etapa 10 (véase Figura 1), se selecciona una variante mejorada basándose en los resultados obtenidos en la etapa 8 (véase Figura 1), y la variante se usa como una plantilla para construcción de genotecas adicionales. La construcción de genotecas en la etapa 12 (véase Figura 1) usa la variante de plantilla de la etapa 10 (véase Figura 1) y crea nuevos sitios que se espera que sean beneficiosos basándose en la realimentación a partir de los resultados categorizados en la etapa 8 (véase Figura 1). Además de nuevas genotecas, la variante mejorada de la etapa 10 (véase Figura 1) se usa para repetir las genotecas anteriores en sitios beneficiosos en la etapa 14 usando realimentación a partir de los resultados categorizados de la etapa 8 (véase Figura 1).

Los procedimientos de mutagénesis de barrido de saturación de sitios se realizan de una forma iterativa, con ajuste de realimentación, y en algunas realizaciones, se descomponen en las cuatro secciones siguientes: mutagénesis de saturación de sitios; cribado de actividad; evaluación sistemática de resultados; construcción de nuevas genotecas/mutagénesis repetida de saturación de sitios de genotecas anteriores.

Definiciones

A no ser que se defina lo contrario en la presente memoria descriptiva, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la materia a los que se dirige esta invención. Por ejemplo, Singleton y Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2ª ed., John Wiley and Sons, NY (1994); y Hale y Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a los expertos en la materia unos diccionarios generales de muchos de los términos usados en la invención. Aunque cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria descriptiva encuentran uso en la práctica de la presente invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen en la presente memoria descriptiva. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación se describen más completamente como referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Además, según se usa en la presente memoria descriptiva, el singular “un”, “una” y “el/la” incluye la referencia en plural a no ser que el contexto indique claramente lo contrario.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “*Pseudomonas*” se refiere a todos los miembros del género bacteriano *Pseudomonas*, lo que incluye pero no se limita a *P. fluorescens*, *P. synxantha*, *P. mendocina*, *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, y cualquier otra especie dentro del género *Pseudomonas*. Se pretende que el término comprenda cepas de tipo salvaje, así como cepas mutantes y recombinantes. Se pretende también que el género incluya especies que hayan sido reclasificadas en otro género.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “el género *Bacillus*” incluye todos los miembros conocidos para los expertos en la materia, lo que incluye pero no se limita a *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus* y *B. thuringiensis*. Se reconoce que el género *Bacillus* continúa sometido a reorganización taxonómica. Así, se pretende que el género incluya especies que han sido reclasificadas, lo que incluye pero no se limita a organismos como *B. stearothermophilus*, que ahora se denomina “*Geobacillus stearothermophilus*”. La producción de endosporas resistentes en presencia de oxígeno se considera el rasgo que define al género *Bacillus*, aunque esta característica también se aplica a los recientemente denominados *Alicyclobacillus*, *Amphibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Filobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus* y *Virgibacillus*. Se pretende que el término comprenda cepas de tipo salvaje, así como cepas mutantes y recombinantes.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, las proteínas “de tipo salvaje” y “nativas” son aquellas encontradas en la naturaleza. Los términos “secuencia de tipo salvaje”, y “gen de tipo salvaje” se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva, para referirse a una secuencia que es nativa o que aparece naturalmente en una célula hospedadora. En algunas realizaciones, la secuencia de tipo salvaje se refiere a una secuencia de interés que es el punto de partida de un proyecto de ingeniería de proteínas. Los genes que codifican la proteína de ocurrencia natural (es decir, precursora) pueden obtenerse de acuerdo con los procedimientos generales conocidos por los expertos en la materia. Los procedimientos comprenden generalmente síntesis de sondas marcadas que tienen posibles secuencias que codifican regiones de la proteína de interés, preparando genotecas genómicas a partir de organismos que expresan la proteína, y cribado de las genotecas para el gen de interés por hibridación de las sondas. A continuación se cartografían y secuencian los clones de hibridación positivamente.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “proteína recombinante”, se refiere a una proteína en la que la secuencia de ADN que codifica la proteína se ha modificado para producir una secuencia de ADN variante (o

mutante) que codifica la sustitución, delección o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de ocurrencia natural. Los procedimientos adecuados para producir dicha modificación, y que pueden combinarse con los desvelados en la presente memoria descriptiva, incluyen, pero no se limitan a los desvelados en la patente de EE.UU. 4.760.025 (US-RE-34.606), la patente de EE.UU. 5.204.015 y la patente de EE.UU. 5.185.258.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “proteína” se refiere a cualquier composición formada por aminoácidos y reconocida como una proteína por los expertos en la materia. Los términos “proteína”, “péptido” y polipéptido se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva. Los aminoácidos pueden referirse por sus nombres completos (por ejemplo, alanina) o por abreviaturas aceptadas de una letra (por ejemplo, A) o tres letras (por ejemplo, ala). Cuando un péptido es una parte de una proteína, los expertos en la materia comprenden el uso del término en su contexto. El término “proteína” comprende formas maduras de proteínas, así como las formas pro y prepro de proteínas relacionadas. Las formas prepro de proteínas comprenden la forma madura de la proteína que tiene una prosekuensi ligada operativamente al término amino de la proteína, y una secuencia “pre-” o de “señal” ligada operativamente al término amino de la prosekuensi.

En algunas realizaciones preferidas, el término proteína se refiere a enzimas naturales, sintéticas y de ingeniería como oxidoreductasas, transferasas, isomerasas, ligasas, hidrolasas; anticuerpos; polipéptidos; péptidos; hormonas; citocinas; factores de crecimiento; otros moduladores biológicos; reactivos de diagnóstico basados en proteínas; y biosensores. Los ejemplos de enzimas que pueden potenciarse mediante el procedimiento de la invención incluyen, pero no se limitan a, proteasas, carbohidrasas, lipasas, peroxidasas, celulasas y dioxigenasas.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, el término “derivado” se refiere a una proteína (por ejemplo, una cutinasa) que se obtiene de una proteína precursora (por ejemplo, la cutinasa nativa) por adición de uno o más aminoácidos a uno o ambos de los extremos terminales C y N, sustitución de uno o más aminoácidos en uno o varios de diferentes sitios en la secuencia de aminoácidos, y/o delección de uno o más aminoácidos en uno o ambos extremos de la proteína o en uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos, y/o inserción de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos. La preparación de un derivado de cutinasa se consigue preferentemente por modificación de una secuencia de ADN que codifica para la proteína nativa, transformación de esa secuencia de ADN en un hospedador adecuado y expresión de la secuencia de ADN modificada para formar la cutinasa derivada.

Las proteínas relacionadas (y derivadas) incluyen “variantes de proteínas”. En realizaciones preferidas, las variantes de proteínas difieren de una proteína progenitora y entre sí por un pequeño número de residuos de aminoácidos. El número de residuos de aminoácidos diferentes puede ser uno o más, preferentemente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más residuos de aminoácidos. En una realización preferida, el número de diferentes aminoácidos entre variantes está entre 1 y 10. En realizaciones preferidas especialmente, las proteínas relacionadas y especialmente las variantes de proteínas comprenden al menos el 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencias de aminoácidos.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “propiedades de proteínas” se refiere a integridad estructural y/o función de proteínas, incluyendo unión y/o catálisis relativas a una o más condiciones o sustratos, con la actividad de proteínas que incluye pero no se limita a unión y catálisis; estabilidad de proteínas relativa a exposición a condiciones seleccionadas, estabilidad de proteínas que incluye pero no se limita a estabilidad térmica, estabilidad del intervalo de pH, estabilidad del intervalo de fuerza iónica, estabilidad de presión; y/o estabilidad del entorno de sustancias de reacción, como estabilidad en disolventes orgánicos.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “consideraciones estructurales de proteínas” se refiere a información disponible sobre la estructura física de la proteína de interés, lo que incluye pero no se limita a posición de sitios de unión a sustratos, estructura tridimensional, secuencias de aminoácidos; y, la naturaleza química del evento de reacción o unión al que se dirigirá la mutagénesis de la proteína.

El uso de consideraciones estructurales de proteínas se ilustra mediante los siguientes dos ejemplos que no pretenden ser limitativos. Cuando se conocen tanto el sitio de unión al sustrato como la estructura tridimensional, la mutagénesis de saturación de sitios puede limitarse a un sitio de unión a sustrato si la propiedad objeto es actividad catalítica. Cuando sólo se conoce la secuencia de aminoácidos de la proteína objeto, los sitios de mutagénesis pueden seleccionarse por comparación de la secuencia conocida con secuencias homólogas para permitir la selección de sitios sospechosos funcionalmente importantes para mutagénesis. Ambos ejemplos incluyen además la consideración de la naturaleza del problema que se debe resolver (es decir, alteración de actividad catalítica, unión, estabilidad, etc.).

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “mutagénesis de saturación de sitios” se refiere a un procedimiento de mutagénesis en la que se aleatorizan cebadores de oligonucleótidos en el sitio de interés usando la secuencia de triplete NNG/C, en la que N es una mezcla de las 4 bases. Para cada sitio seleccionado, el aminoácido se sustituye aleatoriamente por las 19 posibles alternativas. La mutagénesis de saturación de sitios no se limita a mutaciones producidas por una única sustitución de codones. En algunas realizaciones preferidas, se generan secuencias de ADN mutantes con mutagénesis de saturación de sitios en al menos un codón. En otras realizaciones preferidas, la mutagénesis de saturación de sitios se realiza para dos o más codones. En una realización adicional, las secuencias de ADN mutantes tienen más del 40%, más del 45%, más del 50%, más del 55%, más del 60%, más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95% o más del 98% de homología con la secuencia de tipo salvaje. Alternativamente, el ADN mutante puede generarse *in vivo* usando cualquier procedimiento mutagénico

conocido (por ejemplo, radiación, nitrosoguanidina, etc.). Las secuencias de constructos de ADN pueden ser de tipo salvaje, mutante o modificado. Además, las secuencias pueden ser homólogas o heterólogas.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, el término “aleatorización dirigida” se refiere a un procedimiento que produce una pluralidad de secuencias en el que se han aleatorizado una o varias posiciones. En algunas realizaciones, la aleatorización es completa (es decir, los cuatro nucleótidos, A, T, G, y C, pueden darse en una posición aleatorizada). En realizaciones alternativas, la aleatorización de un nucleótido se limita a un subconjunto de los cuatro nucleótidos. La aleatorización dirigida puede aplicarse a uno o varios codones de una secuencia, codificando para una o varias proteínas de interés. Cuando se expresan, las genotecas resultantes producen poblaciones de proteínas en las que una o más posiciones de aminoácidos pueden contener una mezcla de los 20 aminoácidos o un subconjunto de aminoácidos, según se determina por el esquema de aleatorización del codón aleatorizado. En algunas realizaciones, los miembros individuales de una población resultantes de aleatorización dirigida difieren en el número de aminoácidos, debido a la inserción o delección dirigida o aleatoria de codones. En realizaciones adicionales, se incluyen aminoácidos sintéticos en las poblaciones de proteínas producidas.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “correspondiente a”, se refiere a un residuo en la posición enumerada en una proteína o péptido, o un residuo que es análogo, homólogo o equivalente a un residuo enumerado en otra proteína o péptido.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “región correspondiente” se refiere generalmente a una posición análoga dentro de proteínas relacionadas o una proteína progenitora.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, el término “secuencia análoga” se refiere a una secuencia dentro de una proteína que proporciona función, estructura terciaria y/o residuos conservados similares a la proteína de interés. En realizaciones preferidas especialmente, la secuencia análoga implica secuencia(s) en o cerca de un epítipo. Por ejemplo, en regiones de epítopos que contienen una hélice alfa o una estructura de lámina beta, los aminoácidos de sustitución en la secuencia análoga mantienen preferentemente la misma estructura específica. El término también se refiere a secuencias de nucleótidos, así como secuencias de aminoácidos.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “proteína homóloga” se refiere a una proteína (por ejemplo, cutinasa) que tiene acción catalítica, estructura, respuesta antigénica y/o inmunogénica similares a la proteína (es decir, cutinasa) de interés. No se pretende que un homólogo y una proteína (por ejemplo, cutinasa) de interés estén relacionados necesariamente de forma evolutiva. Así, se pretende que el término comprenda la misma proteína funcional obtenida de diferentes especies. En algunas realizaciones preferidas, es deseable identificar un homólogo que tenga una estructura terciaria y/o primaria similar a la proteína de interés, ya que la sustitución para el epítipo en la proteína de interés por un segmento análogo a partir del homólogo reducirá la desorganización del cambio. Así, en la mayoría de los casos, las proteínas estrechamente homólogas proporcionan las fuentes más deseables de sustituciones de epítopos. Alternativamente, es ventajoso buscar análogos humanos para una proteína dada.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “genes homólogos” se refiere a al menos un par de genes de especies diferentes, pero habitualmente especies relacionadas, que se corresponden entre sí y que son idénticas o muy similares entre sí. El término comprende genes que se separan por especiación (es decir, el desarrollo de nuevas especies) (por ejemplo, genes ortólogos), así como genes que se han separado por duplicación genética (por ejemplo, genes parálogos).

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “ortólogo” y “genes ortólogos” se refiere a genes en diferentes especies que han evolucionado a partir de un gen ancestro común (es decir, un gen homólogo) por especiación. Normalmente, los ortólogos conservan la misma función durante el curso de evolución. La identificación de ortólogos encuentra uso en la predicción fiable de función génica en genomas de nueva secuenciación.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “parálogo” y “genes parálogos” se refiere a genes que están relacionados por duplicación dentro de un genoma. Mientras los ortólogos conservan la misma función a través del curso de la evolución, los parálogos evolucionan en nuevas funciones, aun cuando algunas funciones estén relacionadas a menudo con la original. Los ejemplos de genes parálogos incluyen, pero no se limitan a genes que codifican tripsina, quimotripsina, elastasa y trombina, que son todas serinproteinasas y que aparecen juntas dentro de la misma especie.

El grado de homología entre secuencias puede determinarse usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica (véase por ejemplo, Smith y Aguaman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 1981]; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 1970]; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 1988]; programas como GAP, BEST-FIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI); y Devereux y col., *Nucl. Acid Res.*, 12:387-395 1984]). Por ejemplo, PILEUP es un programa útil para determinar los niveles de homología de secuencias. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas por pares. También puede representar un árbol que muestra las relaciones de agrupación usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del procedimiento de alineación progresiva de Feng y Doolittle, (Feng y Doolittle, *J. Mol. Evol.*, 35:351-360 1987]). El procedimiento es similar al descrito por Higgins y Sharp (Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-153 1989]). Los parámetros de PILEUP útiles que incluyen un peso de espacio vacío por omisión de 3,00, un peso de longitud de espacio vacío por omisión de 0,10, y espacios vacíos de extremo ponderados. Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito

por Altschul y col., (Altschul y col., J. Mol. Biol., 215:403-410, 1990]; y Karlin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 1993]). Un programa BLAST especialmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase Altschul y col., Meth. Enzymol., 266:460-480 1996]). Los parámetros “W”, “T” y “X” determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como valores por omisión una longitud de palabra (W) de 11, alineaciones (B) de matriz de valoración BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 1989]) de 50, expectativa (E) de 10, M’5, N’-4, y una comparación de las dos cadenas.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “identidad de secuencias de ácidos nucleicos porcentual (%)” se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de nucleótidos de la secuencia.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, el término “hibridación” se refiere al procedimiento por el que una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través de apareamiento de bases, según se conoce en la técnica.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “restricción máxima” se refiere al nivel de hibridación que tiene lugar normalmente a aproximadamente $T_m - 5^\circ\text{C}$ (5°C por debajo de la T_m de la sonda); “restricción alta” a aproximadamente de 5°C a 10°C por debajo de T_m ; “restricción intermedia” a aproximadamente de 10°C a 20°C por debajo de T_m ; y “restricción baja” a aproximadamente de 20°C a 25°C por debajo de T_m . Como comprenderán los expertos en la materia, puede usarse una hibridación de restricción máxima para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos idénticas mientras que puede usarse una hibridación de restricción intermedia o baja para identificar o detectar homólogos de secuencias de polinucleótidos.

Las frases “sustancialmente similar” y “sustancialmente idéntico” en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos significa normalmente que un polinucleótido o polipéptido comprende una secuencia que tiene al menos una identidad de secuencias del 75%, preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 90%, más preferentemente todavía el 95%, con la máxima preferencia el 97%, a veces hasta el 98% y el 99% de identidad de secuencias, en comparación con la secuencia de referencia (es decir, tipo salvaje). La identidad de secuencias puede determinarse usando programas conocidos como BLAST, ALIGN y CLUSTAL usando parámetros estándar. (Véase por ejemplo, Altschul, y col., J. Mol. Biol. 215:403-410 1990]; Henikoff y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 1989]; Karin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873 1993]; y Higgins y col., Gene 73:237-244 1988]). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. Además, pueden realizarse búsquedas en bases de datos usando FASTA (Pearson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448 1988)).

En algunas realizaciones, los “residuos equivalentes” se definen determinando la homología en el nivel de estructura terciaria para una proteína precursora (es decir, proteína de interés) cuya estructura terciaria se ha determinado mediante cristalografía de rayos X. Los residuos equivalentes se definen como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de cadenas principales de un residuo de aminoácido en particular de la proteína precursora y otra proteína están dentro de 0,13 nm y preferentemente 0,1 nm después de alineación. La alineación se consigue después de que se ha orientado y colocado el mejor modelo para dar la máxima superposición de coordenadas atómicas de átomos de proteínas no de hidrógeno de la proteína. En la mayoría de las realizaciones, el mejor modelo es el modelo cristalográfico que da el menor factor R para datos de difracción experimental en la máxima resolución disponible.

En algunas realizaciones, la modificación se realiza preferentemente en la “secuencia de ADN precursora” que codifica la secuencia de aminoácidos de la enzima precursora, pero puede ser por la manipulación de la proteína precursora. En el caso de residuos que no se conservan, la sustitución de uno o más aminoácidos se limita a sustituciones que producen una variante que tiene una secuencia de aminoácidos que no se corresponde con la encontrada en la naturaleza. En el caso de residuos conservados, dichas sustituciones no deben producir una secuencia de ocurrencia natural. Los derivados proporcionados por la presente invención incluyen además modificación(es) química(s) que cambian las características de la cutinasa.

En algunas realizaciones preferidas, el gen de proteína está ligado en un plásmido de expresión apropiada. A continuación se usa el gen de proteína clonado para transformar o transfectar una célula hospedadora con el fin de expresar el gen de proteína. Este plásmido puede replicarse en hospedadores en el sentido de que contiene los elementos bien conocidos necesarios para replicación de plásmidos o el plásmido puede diseñarse para integrarse en el cromosoma hospedador. Se proporcionan los elementos necesarios para expresión génica eficaz (por ejemplo, un promotor ligado operativamente al gen de interés). En algunas realizaciones, estos elementos necesarios se suministran como el propio promotor homólogo del gen si es reconocido (es decir, transcrito, por el hospedador), un terminador de transcripción (una región de poliadenilación para células hospedadoras eucariotas) que es exógeno o es suministrado por la región de terminador endógeno del gen de proteína. En algunas realizaciones, se incluye también un gen de selección como un gen de resistencia a antibióticos que permite el mantenimiento continuo en cultivo de células hospedadoras infectadas por plásmidos mediante crecimiento en medios de contenido antimicrobiano.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “célula hospedadora” se refiere a una célula que tiene la capacidad de actuar como un vehículo hospedador o de expresión para una secuencia de entrada. En una realización, la célula hospedadora es un microorganismo.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “constructo de ADN” y “ADN transformante” se usan indistintamente para referirse a ADN usado para introducir secuencias en una célula hospedadora u organismo. El ADN puede generarse *in vitro* por PCR o cualquier otra(s) técnica(s) adecuada(s) conocida(s) para los expertos en la materia. En realizaciones preferidas especialmente, el constructo de ADN comprende una secuencia de interés (por ejemplo, como una secuencia de entrada). En algunas realizaciones, la secuencia se vincula operativamente a elementos adicionales como elementos de control (por ejemplo, promotores, etc.). El constructo de ADN puede comprender además un marcador seleccionable. Puede comprender además una secuencia de entrada flanqueada por cajas de homología. En una realización adicional, el ADN transformante comprende otras secuencias no homólogas, añadidas a los extremos (por ejemplo, secuencias de relleno o flancos). En algunas realizaciones, los extremos de la secuencia de entrada están cerrados de manera que el ADN transformante forma un círculo cerrado. Las secuencias transformantes pueden ser de tipo salvaje, mutantes o modificadas. En algunas realizaciones, el constructo de ADN comprende secuencias homólogas al cromosoma de la célula hospedadora. En otras realizaciones, el constructo de ADN comprende secuencias no homólogas. Una vez que el constructo de ADN se ensambla *in vitro* puede usarse para: 1) insertar secuencias heterólogas en una secuencia objeto de una célula hospedadora, y/o 2) mutagenizar una región del cromosoma de la célula hospedadora (es decir, sustituir una secuencia endógena por una secuencia heteróloga), 3) borrar genes objeto; y/o introducir un plásmido replicante en el hospedador.

En una realización, la presente invención implica ensamblaje de un constructo de ADN *in vitro*, seguido por clonación de dicho constructo en una célula hospedadora. Por ejemplo, puede emplearse fusión y/o ligación de PCR para ensamblar un constructo de ADN *in vitro*. En algunas realizaciones, el constructo de ADN comprende un ADN en el que se ha introducido una mutación.

Una “secuencia de entrada” según se usa en la presente memoria descriptiva significa una secuencia de ADN que se acaba de introducir en la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la secuencia de entrada se integra en el cromosoma o el genoma del hospedador. La secuencia puede codificar una o más proteínas de interés. Así, según se usa en la presente memoria descriptiva, el término “secuencia de interés” se refiere a una secuencia de entrada o una secuencia que será generada por la célula hospedadora. Los términos “gen de interés” y “secuencia de interés” se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva. La secuencia de entrada puede comprender un promotor ligado operativamente a una secuencia de interés. Una secuencia de entrada comprende una secuencia que puede o no estar ya presente en el genoma de la célula que se transformará (es decir, las secuencias homólogas y heterólogas encuentran uso con la presente invención).

Según se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “cutinasas híbridas” y “cutinasas de fusión” se refieren a proteínas que se diseñan por ingeniería a partir de al menos dos proteínas diferentes o “progenitoras”. En realizaciones preferidas, estas proteínas progenitoras son homólogas entre sí. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una proteína preferida de cutinasas híbridas o cutinasas de fusión contiene el término N de una proteína y el término C de un homólogo de la proteína. En alguna realización preferida, los dos extremos terminales se combinan para corresponderse con la proteína activa de longitud completa.

El término “muestra” según se usa en la presente memoria descriptiva se usa en su sentido más amplio. Sin embargo, en realizaciones preferidas, el término se usa en referencia a una muestra (por ejemplo, una parte alícuota) que comprende una variante (por ejemplo, una variante de una proteína de interés) que está siendo analizada, identificada, modificada y/o en comparación con otras variantes y/o la proteína de tipo salvaje.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “mutaciones” se refiere a inserciones, delecciones, duplicaciones o alteraciones a secuencias de péptidos o secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, secuencias de tipo salvaje), que incluyen, pero no se limitan a, mutaciones puntuales.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “mutaciones cooperativas” se refiere a dos o más mutaciones de aminoácidos. En algunas realizaciones preferidas, estas mutaciones funcionan conjuntamente en un medio complementario.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “cutinasa” se refiere a una enzima lipolítica capaz de hidrolizar sustancias de cutina. Se pretende que dentro de esta definición se comprendan cutinasas de cualquier fuente. Por ejemplo, se sabe que las cutinasas son producidas por diversos hongos y especies bacterianas. Se han descrito muchas cutinasas (véase, por ejemplo, Kolattukudy, en Borgstrom y Brockman (ed.), *Lipases*, Elsevier, en páginas 471-504 1984; Longhi y col., *J. Mol. Biol.*, 268:779-799 1997; patente de EE.UU. n° 5.827.719; documentos WO-94/14.963; WO-94/14.964; WO-00/05.389; *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2794-2799 1998; *Proteins: Structure, Function and Genetics* 26:442-458 1996; *J. Comput. Chem.*, 17:1783-1803 1996; *Protein Engineer.*, 6:157-165 1993). En algunas realizaciones, la cutinasa “progenitora” (es decir, las cutinasas a partir de las cuales se diseñan y proporcionan variantes de cutinasas) tiene una secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos que es al menos homóloga al 50% a secuencias de ácidos nucleicos y/o aminoácidos de las cutinasas de cutinasa de *Pseudomonas mendocina* ID SEC N°: 1 e ID SEC N°: 2. En algunas realizaciones, las cutinasas progenitoras son el 60%, 70%, 80%, 90% o más del 90% homólogas con las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de cutinasa de *Pseudomonas mendocina* expuestas en ID SEC N°: 1 e ID SEC N°: 2). En algunas realizaciones, la cutinasa es de ocurrencia natural, mientras que en otras realizaciones, son cutinasas modificadas genéticamente. En algunas realizaciones, las cutinasas modificadas genéticamente se obtienen por irradiación UV, tratamiento con N-metil-N'-nitrosoguanidina (NTG), tratamiento con metanosulfonato de etilo (EMS), tratamiento con ácido nitroso, tratamiento con acridina o similar. En realizaciones adicionales, la cutinasa

modificada es una cutinasa recombinante producida por procedimientos de ingeniería genética como fusión celular, recombinación génica y/u otros procedimientos conocidos en la técnica.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “calificación” se refiere al ordenamiento, valoración y categorización de propiedades de proteínas, lo que incluye pero no se limita a identificación de las propiedades como beneficiosas, neutras y perjudiciales, e incluyendo agrupación de dichas propiedades ordenadas y marcado de los grupos por codificación por colores de los datos y representaciones tridimensionales, e incluyendo identificación de análisis de tendencias estructurales-funcionales.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “genoteca molecular” se refiere a un ensamblaje basado en vectores de al menos una molécula de ácido nucleico que está basada en vectores, no basada en vectores, o basada y no basada en vectores en combinación.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “poliéster” se refiere moléculas poliméricas lineales alifáticas y aromáticas que contienen grupos de ésteres en cadena y que se derivan de la condensación de un diácido con un diol o a partir de la polimerización de ácidos hidroxílicos. Los poliésteres principales en uso industrial incluyen tereftalato de polietileno (PET), tereftalato de tetrametileno (PTMT), tereftalato de polibutileno (PBT), tereftalato de politrimetileno (PTT), ácido poliláctico (PLA) y naftalato de polietileno (PEN), tereftalato de policiclohexanodimetileno (CHDMT), poli(etilen-4-oxibenzoato)A-Tell, poliglicólido, PHBA y 2GN.

Según se usa en la presente memoria descriptiva, “poliesterasa” se refiere a una enzima que tiene una capacidad importante para catalizar la hidrólisis y/o la modificación superficial de poliéster. Las poliesterasas adecuadas se aíslan de fuentes animales, vegetales, fúngicas y bacterianas. En algunas realizaciones, la enzima se obtiene a partir de cualquier cepa mutante (por ejemplo, obtenida por irradiación UV, tratamiento de N-metil-N'-nitrosoguanidina (NTG), tratamiento de metanosulfonato de etilo (EMS), tratamiento de ácido nitroso, tratamiento de acridina o similar), así como cepas recombinantes inducidas por procedimientos de ingeniería genética como fusión celular y recombinación génica, etc.

Descripción detallada de la invención

La presente solicitud describe procedimientos de mutagénesis para ingeniería de proteínas. En particular, la presente solicitud describe procedimientos de mutagénesis que incluyen ajuste de realimentación a partir de la evaluación sistemática de resultados. Más específicamente, la solicitud describe procedimientos de mutagénesis de saturación de sitios que criban variantes con una o más propiedades de proteínas deseables y evalúa los resultados del cribado para proporcionar realimentación para cribado repetido y construcción de nuevas genotecas. La invención proporciona variantes de cutinasa que proporcionan estabilidad y actividad mejoradas en comparación con la cutinasa de tipo salvaje.

La solicitud describe procedimientos de cribado de mutagénesis de alta productividad para seleccionar sitios para barrido de saturación usando consideraciones estructurales de proteínas. Las genotecas de saturación de sitios se crean y se criban usando ensayos para sitios que tienen propiedades de proteínas de interés. Los sitios se categorizan para las propiedades de interés y se identifican tendencias, si existen. A continuación, se selecciona al menos una variante que tiene una propiedad deseada para procedimientos adicionales de creación de genotecas. Las genotecas adicionales se crean usando realimentación a partir de las categorías determinadas. Un conjunto de genotecas adicionales repite la construcción de las genotecas anteriores usando la realimentación. Un segundo conjunto de genotecas adicionales son nuevas genotecas creadas en sitios que según se espera serán beneficiosos basándose en la realimentación. En algunas realizaciones, las categorías se codifican, usando color u otros indicios, para permitir la fácil identificación de tendencias.

A continuación se describen los procedimientos usados en la presente solicitud. Esta descripción se divide en cuatro secciones para mayor claridad de presentación y que no se deben entender como limitativas.

Mutagénesis de saturación de sitios

Según se ilustra en la Figura 1, en algunas realizaciones preferidas, el procedimiento de mutagénesis de saturación de sitios se limita a un subconjunto seleccionado de posiciones de aminoácidos en la proteína definido después de un minucioso análisis de la estructura y función de la proteína.

Después de la selección del subconjunto de posiciones de aminoácidos en la proteína para mutagénesis (es decir, etapa 2 en la Figura 1), las genotecas de saturación de sitios se hacen en los sitios seleccionados por sustituciones aleatorias de los 19 aminoácidos usando mutagénesis convencional dirigida a oligonucleótidos (es decir, etapa 4 en la Figura 1). Durante el desarrollo de la presente invención, se usó el kit Stratagene Quik-Change™. Sin embargo, no se pretende que el procedimiento se limite a ningún procedimiento en particular ya que la producción convencional de genotecas es bien conocida para los expertos en la materia (por ejemplo, véase también, Airaksinen y Hovi, Nucl. Acids Res., 26:576-581 1998]; y Sculptor Mutagenesis Kit (Amersham, RU)).

El oligonucleótido mutagénico empleado es complementario a las áreas contiguas a los sitios seleccionados. El codón para los sitios seleccionados se sustituye por la secuencia N,N, (mezcla G/C). Como el procedimiento de mutagénesis no se limita a mutaciones producidas por sustitución de un solo codón, el procedimiento determina la

importancia del sitio con respecto a las propiedades deseadas de proteínas, e identifica las sustituciones de aminoácidos que producen los resultados más eficaces. El procedimiento es aplicable a una variedad de procedimientos de mutagénesis.

5 Cribado de actividad

Después de la mutagénesis de saturación de sitios, los miembros de la genoteca experimentan un cribado para las propiedades de proteínas de interés usando ensayos apropiados para la proteína de interés (es decir, etapa 6 en la Figura 1). El cribado se realiza preferentemente para más de una propiedad para proporcionar información adicional relativa a la calidad y los efectos mutacionales de los datos de cribado. La probabilidad, "P", de que una colección de variantes contenga al menos un clon con un aminoácido dado se determina a partir de la fórmula de distribución binomial.

$$P = 1 - (1 - p)^n$$

15 p = probabilidad de encontrar el aminoácido en particular en la mezcla de clones

n = número de clones cribados.

Por ejemplo, si se criban 90 clones, existe una probabilidad del 94% de identificar un aminoácido codificado por uno de los 32 codones posibles.

Evaluación sistemática de resultados

A continuación, se evalúan los resultados de cribado de actividad para cada variante y se categorizan con respecto a la posición de la mutación en la proteína para identificar cualquier tendencia basada en la estructura (es decir, etapa 8 en la Figura 1). Las evaluaciones de tendencias incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes ejemplos usando los resultados del ensayo: (1) representación gráfica de la distribución espacial de sitios de variantes dentro de una representación tridimensional de la estructura de la proteína; (2) representación gráfica de la identidad de la mutación de aminoácidos; (3) representación gráfica de la distribución de sitios de mutación beneficiosos comparados con secuencias de aminoácidos de proteínas similares; y/o (4) calificación y categorización de resultados, por ejemplo, como beneficiosos, perjudiciales y neutros. Los resultados evaluados, especialmente categorías, pueden codificarse según colores. La codificación por colores puede añadirse a los datos representados y superponerse en representaciones estructurales tridimensionales conocidas de la proteína. Dicho análisis produce datos que revelan claramente distribución de sitios no uniforme para las diversas categorías, y señala rápidamente a tendencias para sustituciones de aminoácidos beneficiosas, perjudiciales y neutras. El análisis y la realimentación de la evaluación de resultados permite la selección informada de más sitios de mutagénesis y construcción de nuevas genotecas.

Construcción de nuevas genotecas/mutagénesis repetida

Los datos de la evaluación sistemática de los resultados se usan como realimentación para construir nuevas genotecas y para seleccionar sitios de mutación prometedores para las genotecas probadas anteriormente (es decir, etapas 12, 14 en la Figura 1). Estas nuevas genotecas se construyen usando las variantes óptimas identificadas como poseedoras de mutaciones beneficiosas después de mutagénesis primaria. Las variantes óptimas se usan como plantillas para un procedimiento adicional de mutagénesis (es decir, etapa 10 en la Figura 1). En este procedimiento de construcción, las genotecas se preparan en cada uno de los sitios que produjeron variantes mejoradas o beneficiosas en las etapas anteriores de mutagénesis y cribado. Después de un segundo procedimiento de mutagénesis de saturación de sitios que usa como ADN progenitor un clon con una mutación de aminoácidos identificada como beneficiosa, las variantes óptimas tienen cada una dos mutaciones beneficiosas. El procedimiento se repite hasta que se alcanza algún objetivo de mejora de las proteínas, o hasta que el número de sitios beneficiosos se agota. Esta construcción de nuevas genotecas repite esencialmente genotecas anteriores usando una proteína de inicio mejorada elegida entre una de las genotecas anteriores y usando mutaciones beneficiosas identificadas.

Un segundo procedimiento de construcción de una nueva genoteca usa el análisis de tendencias descrito anteriormente para mutar sitios adicionales situados cerca de cualquier sitio de mutación beneficioso observado y categorizado (es decir, etapa 12 en la Figura 1). Esta etapa se extiende también para producir mutaciones basándose en tendencias distintas de la proximidad espacial observada en sitios beneficiosos. Esta construcción de genotecas se extiende a sitios de aminoácidos potencialmente beneficiosos, y permite la exclusión de sitios perjudiciales categorizados. En realizaciones preferidas, esta construcción conduce también a mejoras adicionales.

60 Variantes de cutinasa

Con el fin de ilustrar la utilidad de la presente invención, se produjeron numerosas variantes de cutinasas usando los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva.

La presente invención, proporciona variantes de cutinasa con actividad y/o estabilidad mejoradas en comparación con las cutinasas de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la variante de cutinasa comprende una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones de residuo correspondientes a sitios 34, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 99, 164, 191-196, 219, 223 y 225 de cutinasa de *Pseudomonas mendocina* ID SEC N°: 2.

ES 2 333 789 T3

Una variante preferida de cutinasa es una variante de cutinasa de *Pseudomonas mendocina* ID SEC N°: 2, en la que la variante comprende las sustituciones de Phe 194 por Pro, Ser 219 por Gly y una o más sustituciones adicionales en posiciones de aminoácidos, lo que incluye pero no se limita a 54, 78, 81, 191, 196, 200, 204, 263. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, la posición de aminoácido 54 está sustituida por Ser, Glu o Thr; la posición de aminoácido 78 está sustituida por Val; la posición de aminoácido 81 está sustituida por Ser; la posición de aminoácido 191 está sustituida por Asn o His; la posición de aminoácido 196 está sustituida por Leu o Ala; la posición de aminoácido 200 está sustituida por Leu; la posición de aminoácido 204 está sustituida por Leu; la posición de aminoácido 263 está sustituida por Pro. Así, en algunas realizaciones, está sustituido más de un aminoácido en las variantes de cutinasa en comparación con la cutinasa de tipo salvaje. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, existen mutaciones en dos, tres, cuatro, cinco, seis o más residuos de aminoácidos. En algunas realizaciones, las variantes se obtuvieron de una variante progenitora (por ejemplo, F180P-S205G, referida en las tablas más adelante). Así, en algunas realizaciones, se sustituyen múltiples aminoácidos de manera que proporcionan beneficios adicionales a las variantes de cutinasas.

Experimental

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones y aspectos preferidos de la presente invención y no deben entenderse como limitativos del ámbito de la misma. Estos Ejemplos describen la aplicación de los procedimientos para producir una enzima que tiene estabilidad incrementada y actividad hidrolítica incrementada. Sin embargo, no debe entenderse que la presente invención se limita a estas enzimas específicas.

En la descripción experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: °C (grados centígrados); rpm (revoluciones por minuto); H₂O (agua); dH₂O (agua desionizada); (HCl (ácido clorhídrico); aa (aminoácido); bp (par de bases); kb (par de kilobases); kD (kilodaltons); gm (gramos); µg (microgramos); mg (miligramos); ng (nanogramos); µl (microlitros); ml (mililitros); mm (milímetros); nm (nanómetros); µm (micrómetro); M (molar); mM (milimolar); µM (micromolar); U (unidades); V (voltios); PM (peso molecular); seg (segundos); min(s) (minuto/minutos); hr(s) (hora/horas); MgCl₂ (cloruro de magnesio); NaCl (cloruro de sodio); DO₂₈₀ (densidad óptica a 280 nm); DO₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm); PAGE (electroforesis de gel de poliacrilamida); PBS (suero salino con tampón de fosfato 150 mM NaCl, 10 mM tampón de fosfato de sodio, pH 7,2); MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico); TCA (ácido tricloroacético); PEG (polietilenglicol); PCR (reacción de cadena de la polimerasa); RT-PCR (PCR de transcripción inversa); SDS (dodecilsulfato de sodio); Tris (tris(hidroximetil)aminometano); p/v (peso por volumen); v/v (volumen por volumen); medio LA (por litro: Triptona Peptona Difco 20 g, Extracto de Levadura Difco 10 g, NaCl de EM Science NaCl 1 g, Agar de EM Science 17,5 g, dH₂O a 1 L); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); Clontech (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA); Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI); GIBCO BRL o Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, CA); NEB (New England Biolabs, Beverly, MA); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Takara (Takara Bio Inc. Otsu, Japón); Roche (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza); Testfabrics (Testfabrics, Inc., West Pittston, PA); Scientific Polymer (Scientific Polymer Products, Ontario, NY); V&P Scientific (V&P Scientific, San Diego, CA); Marsh (Marsh BioProducts, Rochester, NY); EM Science (EM Science, Gibbstown, NJ); Qiagen (Qiagen; Inc., Valencia, CA); y Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA).

Ejemplo 1

Mutagénesis de saturación de sitios de cutinasa de *Pseudomonas mendocina*

La cutinasa de *P. mendocina* (véanse Figuras 17 y 18, ID SEC N°: 1 y ID SEC N°: 2) se sometió a procedimientos para identificar mutantes que mejoran la actividad hidrolítica sobre poliéster en fibras de poli(tereftalato de etileno) y resina y/o la estabilidad de las enzimas.

En los medios de cultivo usados se usó MOPS como tampón y también contenían 5 µg/mL de cloranfenicol, para seleccionar transformantes que alojaban el gen de cutinasa. Todos los productos químicos usados en estos Ejemplos se obtuvieron a partir de vendedores comerciales. El medio de cultivo se preparó del modo siguiente:

Medio de inicio MOPS 1A - para preparar 1.000 mL (esterilización de filtro)

100 mL 10x MOPS (véase más adelante)

12,6 g Glucosa

0,23 g K₂HPO₄

0,53 g NH₄Cl

Ajustar pH a 7,3 con KOH

ES 2 333 789 T3

Medio de urea-MOPS - para preparar 1.000 mL (esterilización de filtro)

	100 mL	10x MOPS (véase más adelante)
5	0,52 g	K ₂ HPO ₄
	3,6 g	Urea
	21 g	Glucosa
10	35 g	Maltrin-150
	Ajustar pH a 7,4 con KOH	

15 *10x MOPS - para preparar 1.000 mL (esterilización de filtro)*

	83,7 g	MOPS
20	7,2 g	Tricina
	12,0 g	KOH
	0,48 g	K ₂ SO ₄
25	1,07 g	MgCl ₂ ·6H ₂ O
	29,2 g	NaCl
30	100 mL	100x Micronutrientes (véase más adelante)

100x Micronutrientes - para preparar 1.000 mL (esterilización de filtro)

35	400 mg	FeSO ₄ ·7H ₂ O
	100 mg	MnSO ₄ ·H ₂ O
	100 mg	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
40	50 mg	CuCl ₂ ·2H ₂ O
	100 mg	CoCl ₂ ·6H ₂ O
45	100 mg	NaMoO ₄ ·2H ₂ O
	100 mg	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O
	1,1 g	CaCl ₂ (o 10 mL de reserva 1,0 M)
50	1,47 g	Citrato de sodio

I. Mutagénesis de saturación de sitios de cribado primario

55 Las variantes de genotecas de saturación de sitios se crearon en posiciones de aminoácidos correspondientes a posiciones de residuo 71-80, 82, 99, 100, 102, 139, 141, 144, 162-166, 168, 169, 190-197 y 218-225 de ID SEC N°: 2 en cutinasa de *P. mendocina*, expresadas en cepa de *Bacillus subtilis* 3934. La secuencia de ácidos nucleicos de la cutinasa progenitora se une a las mismas como en la Figura 17 (ID SEC N°: 1). Las genotecas se crearon usando
60 el kit Stratagene Quik-Change™ usando cebadores de oligonucleótidos aleatorizados con NN(G/C) en la posición objeto. Cada aminoácido seleccionado se sustituyó aleatoriamente por todas las 19 alternativas posibles. Las colonias obtenidas de las variantes de genotecas se seleccionaron y se colocaron en placas de crecimiento de 96 pocillos que contenían 100 µL/pocillo de medio de inicio MOPS 1A. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche con agitación humidificada continua a 260 rpm. Se replicó una muestra de cada pocillo en una placa de filtro de 96 pocillos
65 Millipore que contenía 200 µL/pocillo de medio de Urea-MOPS. A continuación, se añadieron 50 µL de glicerol al 45% a cada pocillo de las placas de crecimiento iniciales, que a continuación se almacenaron a -70°C.

ES 2 333 789 T3

Las placas de filtro se incubaron durante 4 días a 37°C con agitación humidificada continua a 260 rpm, para permitir el crecimiento y la producción de enzimas. A continuación, se filtraron las placas y se sometieron a ensayo de actividad de hidrólisis usando un ensayo de hidrólisis de poliéster. Además, se determinó la concentración extracelular de cutinasa usando un ensayo de turbidez TCA, y se evaluó también la estabilidad térmica en detergente de lavado.

II. Ensayos

Los ensayos usados para caracterizar las variantes enzimáticas incluyeron los siguientes sistemas de ensayo.

A. Ensayo de actividad de hidrólisis de poliéster

Este ensayo de hidrólisis de poliéster vigila la liberación de fragmentos que contienen tereftalato procedentes de la hidrólisis enzimática de poliéster insoluble (tereftalato de polietileno o PET). Los fragmentos tienen una absorbancia significativa a aproximadamente 240-250 nm.

Se usaron sustratos de poliéster PET insoluble en forma de muestras de tejido (Dacron 54 de Testfabrics) o polvo de resina PET (catálogo # 138 de Scientific Polymer Products, pulverizado criogénicamente a un tamaño de partícula < 400 μm). Las muestras de PET en polvo se colocaron en un dispositivo dispensador (V&P Scientific), para distribuir aproximadamente 18 mg de muestras uniformes en los pocillos de placas convencionales de ensayo de 96 pocillos. Cuando se usaron muestras de tela PET, se cortaron piezas circulares de 15,9 mm de la tela y se colocaron en las placas de ensayo de 12 pocillos.

Para el ensayo de hidrólisis de polvo de PET, se prepararon dos placas, una que contenía polvo de PET y una sin sustrato. Cada uno de los 96 pocillos de las dos placas de ensayo recibió 200 μL de un tampón de reacción que contenía Tris 50 mM de pH 8,6 y Brij-35 al 0,01% (Sigma #430AG-6). La placa sin sustrato de PET se usó como un blanco de ensayo.

Se añadieron 20 μL de cada muestra de variante enzimática a pocillos apropiados en cada una de las dos placas de ensayo. Ambas placas de ensayo se sellaron con selladores de placa (Marsh). La placa de ensayo que contenía la muestra de PET se colocó en una incubadora cubierta a 40°C, y se incubó la placa durante 18 horas con agitación a 250 rpm. La placa de ensayo cubierta en blanco se mantuvo a temperatura ambiente.

Después de incubación, se transfirieron muestras de 180 μL de cada pocillo de la placa del sustrato de PET a una placa de filtro con un dispositivo pipeteador de 12 canales. Los extremos de las pipetas se retiraron cortando para evitar la obstrucción con polvo de PET. Cada muestra de la placa de filtro de PET se filtró en un pocillo de una nueva placa de ensayo de 96 pocillos.

A continuación se transfirieron 100 μL de cada pocillo de la placa de sustrato y la placa en blanco a una placa transparente a UV, y se determinó la absorbancia de cada muestra en un lector de placas a 250 nm. La absorbancia de los pocillos de la placa en blanco sin sustrato se restó de los pocillos correspondientes en la placa de ensayo con sustrato de PET.

B. Ensayo de TCA para determinar la concentración de cutinasa

Se añadieron 20 μL del sobrenadante de cultivo filtrado a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de base plana que contenía 100 μL /pocillo de agua purificada. Se determinó la dispersión de la luz/absorbancia a 410 nm usando modo de mezclado de 5 segundos en un lector de placas para determinar los valores de blanco de línea de base. A continuación, se añadieron 100 μL de TCA al 15% p/v a cada pocillo antes de incubar la placa durante entre 5 y 30 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la dispersión de la luz/absorbancia causada por precipitación de proteínas a 410 nm usando un lector de placas ajustado para modo de mezclado de 5 segundos.

Los resultados se calcularon restando la lectura en blanco, que no contenía TCA, de las lecturas de muestras con TCA. Se determinó que los resultados de la dispersión de la luz/absorbancia eran lineales con respecto a las concentraciones de enzimas presentes en las muestras, permitiendo así la representación directa de la concentración frente al rendimiento enzimático según se muestra en la Figura 2. La Figura 2 muestra los resultados obtenidos a partir de cepa de hospedador no transformada (PE-1), tres transformantes de cutinasa de tipo salvaje (PE-2 a PE-4) y un control negativo, transformado con un gen de celulasa (BCE). Se observa una buena correlación entre actividad de hidrólisis de poliéster y la señal de TCA. Estas gráficas ayudan a facilitar la identificación y selección de variantes con actividad hidrolítica elevada.

Las Figuras 3 y 4 proporcionan datos de dos genotecas de saturación de sitios que implican posiciones de aminoácidos Leu 168 (Genoteca A) y Phe 194 (Genoteca B). Según se indica, los controles de tipo salvaje caen a lo largo de la misma línea de actividad-concentración; la línea mostrada corresponde al mejor ajuste de estos puntos de datos calculados usando regresión lineal. Las gráficas muestran también que las variantes se sitúan por encima, por debajo y a lo largo de esta línea, lo que significa mejor, peor o similar actividad específica con respecto a los controles de tipo salvaje. Además, según se indica en las gráficas, la genoteca de la posición 194 exhibe más diversidad y más variantes mejoradas que la genoteca de la posición 168.

C. Ensayos de estabilidad enzimática

Se realizaron ensayos de estabilidad para determinar la termoestabilidad de las variantes en un medio detergente. La estabilidad de las variantes obtenidas del procedimiento de mutagénesis de saturación de sitios se determinó añadiendo 10 μL de muestras de la placa de filtro en cada pocillo de dos placas de 96 pocillos que contenían 200 μL /pocillo de detergente líquido (1,6 g/L, dureza 6,3 gpg). Las 2 placas se mezclaron, y una placa se mantuvo en hielo o en un baño de agua y hielo (placa sin tensión) mientras que la segunda placa se incubó en un baño de agua a 40°C durante 10 minutos (placa con tensión térmica). La placa con tensión se transfirió a un baño de agua y hielo, y se realizaron ensayos de actividad de esterasa en las dos placas según se describe más adelante. Las muestras de cutinasa de tipo salvaje también se trataron como anteriormente para comparación con las variantes.

El ensayo de actividad de enzimas usado en estos experimentos se basa en la escisión de butirato de p-nitrofenilo (pNB) incoloro con esterasa en presencia de agua para producir butirato y p-nitrofenolato de color amarillo. El ensayo se realizó usando un tampón de ensayo que contenía Tris 100 mM de pH 8,0 y Triton X-100 al 0,1% (v/v). La reserva de sustrato fue butirato de p-nitrofenilo 100 mM en DMSO, preparada añadiendo 174,3 μL de pNB a 10 mL de DMSO. La reserva de sustrato se dividió en partes alícuotas de 1 mL y se almacenó a -20°C hasta su uso.

El procedimiento de ensayo de pNB fue el siguiente: se diluyó reserva de sustrato (400 μL) en 40 mL de tampón de ensayo para cada par de placas de ensayo. A continuación, se añadieron 200 μL de esta solución de sustrato diluida a cada pocillo de placas convencionales de 96 pocillos. Las placas se equilibraron a 25°C, y se inició la reacción añadiendo 10 μL de la solución de enzimas/detergente a partir de una placa con tensión o sin tensión. Se mezcló la placa y se introdujo en el lector de placas y se inició la adquisición de datos. Se determinó la velocidad de la actividad ($\Delta\text{mAU}_{410}/\text{minuto}$). La velocidad de reacción de pNB es proporcional a la concentración de la enzima activa. Para cada pocillo, se calculó la fracción de enzima activa después de tensión usando la fórmula siguiente:

$$\text{Fracción activa} = (\text{actividad pNB con tensión-blanco})/(\text{actividad de pNB sin tensión-blanco})$$

Se representó gráficamente la fracción de enzima activa después de tensión frente a la actividad de pNB de la enzima sin tensión para cada variante, según se muestra en las Figuras 5 y 6, que ilustran los resultados para genotecas de saturación de sitios en posiciones de aminoácidos Leu 168 (Genoteca A) y Phe 194 Genoteca B). Los resultados mostrados en las Figuras 5 y 6 muestran variantes termoestables que tienen actividad de pNB sin tensión, y también identifican algunas variantes que tienen termoestabilidad aparentemente elevada sólo porque la actividad de pNB es demasiado baja para producir una proporción precisa. Las Figuras 5 y 6 demuestran adicionalmente que mutaciones en sitios diferentes producen diferentes propiedades enzimáticas. Por ejemplo, la genoteca mostrada en la Figura 5 produjo sólo algunas variantes prometedoras con actividad mayor que el tipo salvaje, mientras que la genoteca mostrada en la Figura 6 produjo un número de variantes con actividad considerablemente mayor que la enzima de tipo salvaje.

D. Evaluaciones sistemáticas de los resultados

Los resultados del ensayo de TCA, el ensayo de hidrólisis de PET y el ensayo de estabilidad se analizaron usando fórmulas convencionales conocidas según se exponen anteriormente, usando software Excel™. Las variantes se calificaron y ordenaron según la estabilidad y la actividad de hidrólisis. La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos del procedimiento de mutagénesis de saturación de sitios descrito en este Ejemplo. Los resultados se calificaron y codificaron por colores del modo siguiente: verde = más del 2% de las variantes en los sitios enumerados tenían una actividad significativamente mayor que el control (mutación beneficiosa); azul = la mayoría de las variantes tenían actividad sin cambios (mutación neutra); rojo = la mayoría de las variantes tenían actividad significativamente reducida con respecto al control (mutación perjudicial); y marrón = aproximadamente la mitad de las variantes tenían actividad sin cambios y la mitad tenían una actividad reducida (mutación neutra). Se repitió la codificación por colores usando los mismos colores y los mismos criterios porcentuales para resultados de estabilidad. Según se indica en la Tabla 1, la codificación por colores identifica fácilmente aquellas variantes que tienen las dos propiedades enzimáticas deseadas.

ES 2 333 789 T3

TABLA 1

Muestra los resultados obtenidos a partir de un sistema de enzimas típico. Los resultados están codificados por colores del modo siguiente

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Sitio	Res. peso	# Clones	Actividad PETasa específica			Estabilidad		
			% Ascend.	% Neutro	% Descend.	% Ascend.	% Neutro	% Descend.
71	Gly	135	0,0	8,1	91,9	0,0	28,9	71,11
72	Thr	168	1,2	67,3	31,5	0,0	53,6	46,4
73	Gly	131	0,8	61,8	37,4	9,9	74,0	16,0
74	Ala	179	1,7	77,1	21,2	0,0	76,0	24,0
75	Gly	132	0,0	75,0	25,0	0,0	81,1	18,9
76	Pro	100	0,0	48,0	52,0	0,0	68,0	32,0
77	Ser	159	11,9	77,4	10,7	1,3	97,5	1,3
78	Thr	178	2,2	77,5	20,2	5,1	75,3	19,7
79	Tyr	179	4,5	43,0	52,5	0,0	67,0	33,0
80	Ala	138	0,7	82,6	16,7	0,7	92,8	6,5
82	Leu	134	0,0	27,6	72,4	0,0	50,7	49,3
99	Ser	133	1,5	78,2	20,3	0,0	87,2	12,8
100	Asn	174	1,1	47,7	51,1	0,6	97,7	1,7
102	Gly	145	0,0	4,8	95,2	0,0	33,8	66,2
139	His	110	0,9	10,9	88,2	0,0	45,5	54,5
140	Ser	158	0,0	9,5	90,5	0,0	13,3	86,7
141	Gln	179	0,6	38,0	61,5	0,0	39,7	60,3
144	Gly	166	1,2	25,9	72,9	0,0	48,2	51,8
162	Gln	180	1,1	38,3	60,6	0,0	27,8	72,2
163	Pro	179	0,0	2,8	97,2	0,0	34,1	65,9
164	Tyr	179	1,7	30,2	68,2	4,5	37,4	58,1
165	Thr	167	1,8	28,7	69,5	0,0	69,5	30,5
166	Leu	180	1,1	67,2	31,7	0,0	78,3	21,7
168	Leu	180	0,6	67,8	31,7	0,6	70,6	28,9
169	Gly	148	0,7	57,4	41,9	0,0	70,9	29,1
190	Asp	180	0,0	12,8	87,2	0,0	45,6	54,4
191	Thr	180	0,6	47,2	52,2	6,7	73,3	20,0
192	Ile	179	3,9	60,9	35,2	0,0	54,7	45,3
193	Ala	173	2,3	16,2	81,5	0,0	39,3	60,7
194	Phe	173	8,1	61,8	30,1	2,3	81,5	16,2
195	Pro	178	2,8	34,3	62,9	0,0	54,5	45,5
196	Tyr	166	9,6	83,7	6,6	15,7	83,1	1,2
197	Leu	179	1,7	41,3	57,0	0,0	45,3	54,7
218	Val	147	0,0	21,1	78,9	0,0	28,6	71,4
219	Ser	179	2,8	69,8	27,4	2,2	74,9	22,9
220	His	160	0,6	3,8	95,6	0,0	26,9	73,1
221	Phe	177	1,1	61,6	37,9	0,0	48,0	52,0
222	Glu	179	0,0	1,1	98,9	0,0	5,0	96,0
223	Pro	136	4,4	41,9	53,7	0,0	47,1	52,9
224	Val	180	1,7	56,7	41,7	0,6	75,6	23,9
225	Gly	165	2,4	33,3	64,2	3,6	53,3	43,0

60

65

Verde (■) = más del 2% de los clones tenían una actividad significativamente mayor que el control). Azul (■) = la mayoría no tuvieron cambios. Rojo (■) = la mayoría tenían actividad significativamente reducida con respecto al control. Marrón (■) = aproximadamente la mitad no tenían cambios y en la mitad estaba reducida.

El cribado secundario para repetir las genotecas anteriores y crear genotecas nuevas se realizó usando las variantes que tenían propiedades beneficiosas, según se muestra en la Tabla 1. Se estrieron las muestras de reserva de glicerol congeladas para cada variante mejorada en medios apropiados y se incubó para obtener colonias únicas. Las colonias de cada variante se inocularon en tubos que contenían 3 mL de medio LB y se agitó a 37°C durante 6 a 18 horas.

ES 2 333 789 T3

A continuación, se combinaron 800 μL de caldo de cada tubo incubado con 400 μL de glicerol al 45% y se almacenó a -70°C . Se centrifugó 1 mL de caldo, se eliminó el sobrenadante, y se almacenó el sedimento a -20°C para secuenciación de ADN.

5 A continuación, se pipetearon 100 μL de cada caldo en múltiples replicados en una placa de 96 pocillos. Se replicó una muestra de cada pocillo en una placa de filtro que contenía 200 μL /pocillo de medio de MOPS-Urea. Se dejó que las muestras presentes en las placas de filtro crecieran durante 4 días a 37°C con agitación humidificada a 260 rpm. Se filtraron las placas y se realizaron los ensayos de TCA, hidrólisis de PET y estabilidad descritos anteriormente. Los resultados se calcularon según se describe anteriormente, y se agruparon las muestras de las variantes de más alto
10 rendimiento. La concentración de enzimas en la muestra agrupada se determinó por SDS-PAGE usando densitometría o LC/MS usando una cutinasa marcada en 15N de tipo salvaje estándar. Las variantes se sometieron a ensayo de actividad sobre tela de poliéster en tampón y en detergente. Los resultados se muestran en la Tabla 2, que enumera el sitio y la sustitución realizados para variantes con estabilidad elevada. La Tabla 3 indica las variantes con hidrólisis de poliéster (PET) mejorada. Las últimas siete variantes F180-S205 mostradas en la Tabla 2 representan una segunda
15 genoteca según se creó en la etapa 14 de la Figura 1 (usando la variante S205G como plantilla), que muestra dos mutaciones beneficiosas que mejoran enormemente la estabilidad relativa de estas siete variantes. En la Tabla 3 se indica también una serie de variantes con dos mutaciones.

20

(Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 333 789 T3

TABLA 2

Variantes de poliesterasa con estabilidad incrementada (cribado secundario)

	Mutaciones en variantes	Estabilidad relativa de variantes en comparación con tipo salvaje
5	F194I	1,65
10	F194L	1,89
	F194N	1,66
15	F194P	1,63
	G73F	2,02
	G73K	2,62
20	G73L	2,78
	G73V	3,19
	S219G	2,47
25	S34R	1,38
	S77R	2,23
	S99H	2,33
30	S99K	2,56
	T191H	2,56
35	T191 L	2,68
	T191Y	2,68
	T78A	2,26
40	T78L	2,63
	Y164F	1,87
	Y196A	228
45	Y196L	2,28
	Y196P	3,21
	F194A-S219G	8,35
50	F194H-S219G	13,17
	F194K-S219G	10,14
	F194L-S219G	8,84
55	F194N-S219G	11,58
	F194P-S219G	10,56
60	F194S-S219G	7,27

65

ES 2 333 789 T3

TABLA 3

Variantes de poliesterasa y resumen de rendimiento (cribado terciario)

	Mutaciones en variantes	Actividad de variantes con respecto a tampón comparada con tipo salvaje	Actividad de variantes con respecto a detergente comparada con tipo salvaje
5			
10			
15	A80E	1,41	1,22
	F194A-S219G	1,31	2,31
20	F194H-S219G	1,18	1,75
	F194I	2,21	2,24
	F194K-S219G	101	2,87
25	F194L-S219G	1,18	1,95
	F194N	1,77	1,83
	F194N-S219G	1,24	2,02
30	F194P-S219G	1,64	3,43
	F194S-S219G	1,54	2,62
35	G73F	1,13	1,09
	G73L	1,18	1,30
	G75D	1,85	2,07
40	G75E	1,73	2,16
	1192M-F194V-S219G	2,07	2,99
	R54Q-Y126Y	1,33	1,10
45	S219N-F221L	0,82	1,15
	S77R	0,77	1,12
	S99K	1,18	1,58
50	T191H	1,62	2,55
	T191L	1,50	2,24
	T191Y	1,58	2,73
55	T78L	1,30	1,27
	Y196A	1,28	1,57
60	Y196P	1,21	1,38

Los datos de la Tabla 3 se obtuvieron comparando muestras de las variantes que tenían las mutaciones indicadas con cutinasa de tipo salvaje. Estas comparaciones se realizaron usando concentraciones de enzimas iguales en el “cribado terciario” (es decir, hidrólisis durante toda la noche de pedazos de tela de poliéster Dacron 54 de 15,9 mm en placas de 12 pocillos mantenidas a 40°C). En estos experimentos se usó detergente líquido de lavado a una concentración estándar en la industria.

En las Figuras 15 y 16 se muestran gráficamente las mejoras en las propiedades de las variantes de segunda generación cuando se someten a ensayo en un entorno de detergente. La Figura 15 indica que la variante de segunda generación tiene un aumento de tres veces en la actividad en comparación con el tipo salvaje cuando se representa frente a la concentración de enzimas. La Figura 16 muestra que la termoestabilidad de la variante de segunda generación está aumentada enormemente en comparación con el tipo salvaje.

Un resumen de los resultados del procedimiento de la presente invención incluye los resultados del procedimiento de cribado inicial mostrados en la Tabla 1. La Tabla 1 proporciona una lista de sitios en los que las mutaciones produjeron variantes que tenían al menos alguna actividad de poliesterasa y alguna estabilidad. Adicionalmente, la Tabla 1 muestra que las mutaciones en los siguientes sitios produjeron variantes que tenían más del 2% de los clones con mayor actividad que los controles: sitios 77-79, 192-196, 219, 223 y 225. Las mutaciones en los siguientes sitios que dieron como resultado variantes que tenían más del 2% de los clones con estabilidad mayor que los controles incluyen sitios 73, 78, 164, 191, 194 y 196. Los siguientes sitios que representan variantes con actividad y estabilidad mejoradas incluyen sitios 78, 194, 196 y 225. Los clones se seleccionaron basándose en los sitios prometedores mostrados en la Tabla 1, y el cribado secundario se realizó repitiendo las genotecas anteriores y creando genotecas nuevas en sitios nuevos que se esperaba que fueran beneficiosos.

Las Tablas 2 y 3 representan, respectivamente, etapas de cribado de estabilidad secundario y etapas de cribado de actividad terciario que usaban los clones seleccionados identificados durante el cribado primario como plantillas. Las Tablas 2 y 3 identifican las mutaciones realizadas en los sitios seleccionados e incluyen combinaciones de mutaciones. Las sustituciones de serina en las posiciones 34 y 99 representan la creación de nuevas genotecas en nuevos sitios de los que se espera que sean beneficiosos.

La Tabla 2 muestra que la sustitución de fenilalanina en el sitio 194 por isoleucina, leucina, asparaginas o prolina produjo variantes que tenían estabilidad mejorada en comparación con el tipo salvaje; la sustitución de glicina en el sitio 73 por fenilalanina, lisina, leucina o valina produjo variantes con estabilidad mejorada en comparación con el tipo salvaje. Las sustituciones de fenilalanina en el sitio 194 en combinación con sustituciones de serina en el sitio 219 produjeron variantes con estabilidad relativa significativamente mejorada.

Según se indica en la Tabla 3, las sustituciones específicas en de uno a tres sitios produjeron variantes con actividad mejorada de poliesterasa.

D. Evaluación del contexto estructural

Se examinaron los resultados de cribado calificados (cambios de aminoácidos que produjeron mejora, perjuicio o resultado neutro) en el contexto de la posición dentro de la proteína para elucidar cualquier tendencia de base estructuralmente subyacente. Los resultados se muestran en negrita superpuestos en los mapas de la estructura de la proteína, según se muestra en las Figuras 7 a 14. Los resultados también se codificaron por colores (no mostrado) usando los mismos colores usados en la Tabla 1. La Figura 7 muestra la cara del sitio activo de triada catalítica (en negrita) de la cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (Ser 140, Asp 190, His 220). La Figura 8 muestra la adición de los aminoácidos objetivos iniciales (en negrita) que se usaron para el procedimiento de mutagénesis de barrido de saturación de sitios. La Figura 9 muestra los sitios (en negrita) que dieron lugar a al menos el 2% de las variantes que tenían actividad de hidrólisis de poliéster significativamente mejorada. La Figura 10 muestra los sitios de variantes (en negrita) en que la mayoría de mutaciones no tuvieron efecto sobre la actividad. La Figura 11 muestra los sitios de variantes (en negrita) en que la mayoría de las mutaciones tuvieron generalmente un efecto perjudicial en la actividad. La Figura 12 muestra los sitios de variantes (en negrita) que dieron lugar a al menos el 2% de las variantes que tenían estabilidad significativamente mejorada. La Figura 13 muestra los sitios de variantes (en negrita) en que la mayoría de las mutaciones generalmente no tuvieron efecto en la estabilidad. La Figura 14 muestra los sitios de variantes (en negrita) en que la mayoría de las mutaciones generalmente no tuvieron efectos perjudiciales en la estabilidad.

Las Figuras 7 a 14 relacionan las variantes con la estructura, sugiriendo con ello sitios de modificación adicionales. Por ejemplo, en los ejemplos mostrados, los sitios perjudiciales suelen estar ocultos en los mapas de actividad y estabilidad y confinados generalmente a los mismos lugares. Los sitios de mejora para actividad y estabilidad suelen ocupar lugares similares dentro de la estructura de la proteína. Los sitios sin efecto también ocupan posiciones similares dentro de la estructura de proteína para resultados de actividad y estabilidad.

Ejemplo 2

Variantes adicionales de cutinasa

El número de clon PE051-2-A2, que tiene mutaciones F194P-S219G, se sometió a mutagénesis adicional de saturación de sitios para crear mutaciones adicionales según se describe en el Ejemplo 1. La Tabla 4 enumera el sitio y la sustitución realizada para variantes con estabilidad elevada en comparación con la variante progenitora. La Tabla 5 enumera el sitio y la sustitución realizada para variantes con actividad elevada en comparación con la variante progenitora.

ES 2 333 789 T3

TABLA 4

Variantes de poliesterasa con estabilidad incrementada (cribado secundario)

5	Variante	Mutaciones	Estabilidad
10	progenitora	adicionales	relativa de
15			mutaciones
			adicionales
			comparada con
			variante
			progenitora
	F194P-S219G	T191N	1,59
20	F194P-S219G	T191H	1,73
	F194P-S219G	Y196L-Q200L	1,50
	F194P-S219G	Y196L	1,32
25	F194P-S219G	Y196A	1,35
	F194P-S219G	T78V	1,28
	F194P-S219G	R54T-T191N	1,23
30	F194P-S219G	R54S-T191H	1,34
	F194P-S219G	R54T-T191N	1,87
35	F194P-S219G	R54T-T78V-T191N-	3,15
		L263P	
	F194P-S219G	R54T-T78V-T191-N-	3,45
40		Y196L-P204L-L262P	
45			
50			
55			
60			
65			

ES 2 333 789 T3

TABLA 5

Variantes de poliesterasa con actividad incrementada (cribado terciario)

	Variante progenitora	Mutaciones	Actividad relativa en tampón variantes de mutaciones comparada con variante progenitora	Actividad relativa en detergente de variantes de mutaciones comparada con variante progenitora
5				
10				
15				
20	F194P-S219G	T191N	1,20	0,71
	F194P-S219G	Y196L-Q200L	1,37	0,64
	F194P-S219G	Y196L	1,27	0,81
25	F194P-S219G	Y196A	1,25	0,92
	F194P-S219G	R54S	2,06	1,06
	F194P-S219G	R54T	2,00	1,13
30	F194P-S219G	T78V	1,69	0,92
	F194P-S219G	R54E	1,41	1,31
35	F194P-S219G	R54T-T191N	1,26	1,05
	F194P-S219G	R54E-Y196L	1,81	1,48
	F194P-S219G	R54E-T191N	1,52	1,27
40	F194P-S219G	R54S-Y196A-	1,42	1,46
		G81S		
	F194P-S219G	R54T	1,45	1,11
45	F194P-S219G	R54T-T191N	1,50	1,09
	F194P-S219G	R54T-T78V-	1,83	1,29
		T191N-L263P		
50	F194P-S219G	R54T-T78V-	2,39	1,61
		T191N-Y196L-		
55		R204L-L263P		

Los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva encuentran uso en la ingeniería de proteínas con propiedades potenciadas para su uso en campos distintos de las modificaciones textiles según se describe anteriormente. Dichos campos incluyen, pero no se limitan a, atención sanitaria, alimentos y alimentación, fabricación de cerveza, cosmética, agricultura, textiles, detergentes, conversión de residuos ambientales, procesamiento de biopulpa, conversión de biomasa a combustible y otros procedimientos químicos. De hecho, los procedimientos encuentran uso en la mejora de proteínas para cualquier aplicación.

No se pretende que los ejemplos anteriores sean limitativos, y se pretende que el procedimiento se aplique a la mutagénesis de cualquier proteína. Para aquellas proteínas en las que no existen mapas tridimensionales disponibles y sólo se conoce la secuencia de aminoácidos, el procedimiento puede efectuarse comparando la secuencia conocida con otras secuencias que son homólogas. Usando este procedimiento, los sitios disímiles o sitios con importancia

funcional sospechada se mutan porque los sitios no conservados generalmente están disponibles más fácilmente para alojar sustituciones de aminoácidos.

5 Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 0268452 A [0002]
- US 4760025 A [0021]
- US RE34606 E [0021]
- US 5204015 A [0021]
- US 5185258 A [0021]
- US 5827719 A [0054]
- WO 9414963 A [0054]
- WO 9414964 A [0054]
- WO 0005389 A [0054]
- EP 03744218 A [0103]
- US 0306908 W [0103]
- US 10091912 B [0103]
- US 10092227 B [0103]
- US 60362372 B [0103]
- US 60403921 B [0103]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- **Airaksinen; Hovi.** *Nucleic Acids. Res.*, 1998, vol. 26, 576-581 [0002]
- **Singleton; Sainsbury.** Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. *John Wiley and Sons*, 1994 [0017]
- **Marham.** The Harper Collins Dictionary of Biology. *Harper Perennial*, 1991 [0017]
- **Smith; Waterman.** *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482 [0038]
- **Needleman; Wunsch.** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0038]
- **Pearson; Lipman.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444 [0038]
- **Devereux et al.** *Nucl. Acid Res.*, 1984, vol. 12, 387-395 [0038]
- **Feng; Doolittle.** *J. Mol. Evol.*, 1987, vol. 35, 351-360 [0038]
- **Higgins; Sharp.** *CABIOS*, 1989, vol. 5, 151-153 [0038]
- **Altschul et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0042]
- **Karlin et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 5873-5787 [0038]
- **Altschul et al.** *Meth. Enzymol.*, 1996, vol. 266, 460-480 [0038]

ES 2 333 789 T3

- **Henikoff; Henikoff.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 89, 10915 [0038]
- **Henikoff et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 89, 10915 [0042]
- 5 • **Karin et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 5873 [0042]
- **Higgins et al.** *Gene*, 1988, vol. 73, 237-244 [0042]
- 10 • **Pearson et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444-2448 [0042]
- Lipases. *Elsevier*, 1984, 471-504 [0054]
- **Longhi et al.** *J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 268, 779-799 [0054]
- 15 • *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, vol. 64, 2794-2799 [0054]
- *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 1996, vol. 26, 442-458 [0054]
- 20 • *J. Comput. Chem.*, 1996, vol. 17, 1783-1803 [0054]
- *Protein Engineer.*, 1993, vol. 6, 157-165 [0054]
- **Airaksinen; Hovi.** *Nucl. Acids Res.*, 1998, vol. 26, 576-581 [0063].

REIVINDICACIONES

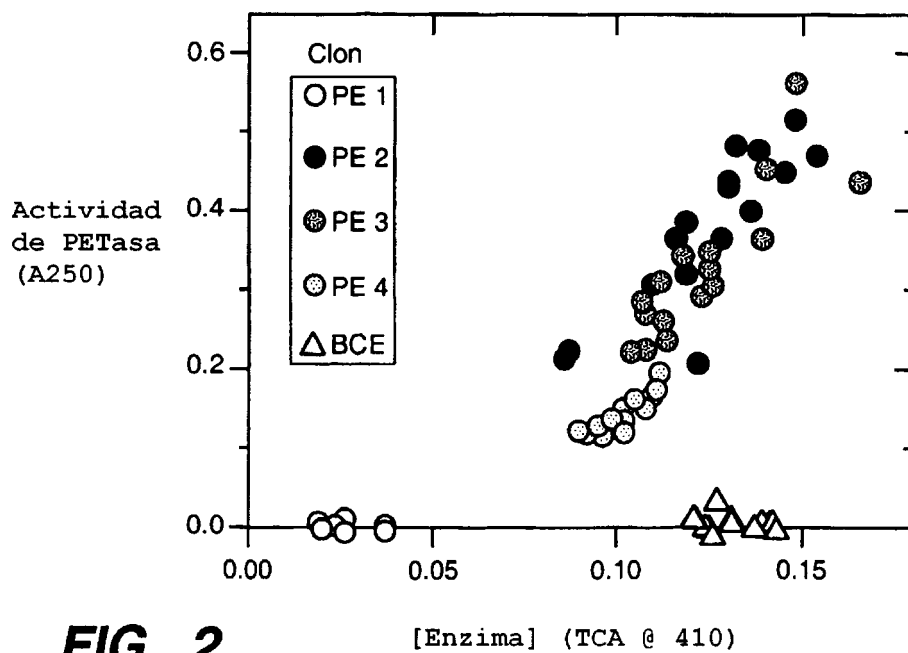
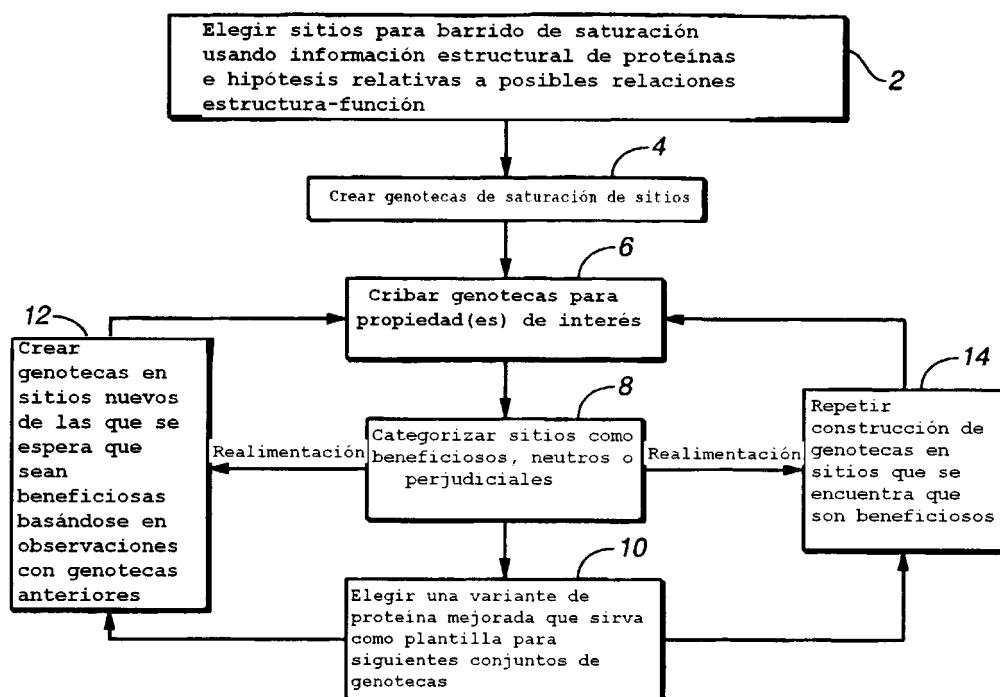
1. Variante de cutinasa que comprende una sustitución de uno o más aminoácidos en posiciones de residuo que corresponden a los sitios 34, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 99, 164, 191-196, 219, 223 y 225 de cutinasa de *Pseudomonas mendocina* ID SEC N°: 2, en la que dicha variante de cutinasa es termoestable y tiene actividad hidrolítica sobre poliéster.
2. Variante de cutinasa según la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende las sustituciones de Phe 194 por Pro, Ser 219 por Gly y una o más sustituciones adicionales seleccionadas entre las posiciones de aminoácidos 54, 78, 81, 191, 196, 200, 204, y 263.
3. Variante de cutinasa según la reivindicación 2 en la que:
 - a) la posición de aminoácido 54 está sustituida por Ser, Glu o Thr; o
 - b) la posición de aminoácido 78 está sustituida por Val; o
 - c) la posición de aminoácido 81 está sustituida por Ser; o
 - d) la posición de aminoácido 191 está sustituida por Asn o His; o
 - e) la posición de aminoácido 196 está sustituida por Leu o Ala; o
 - f) la posición de aminoácido 200 está sustituida por Leu; o
 - g) la posición de aminoácido 204 está sustituida por Leu; o
 - h) la posición de aminoácido 263 está sustituida por Pro.
4. Variante de cutinasa según la reivindicación 1, en la que dicha variante de cutinasa tiene actividad de poliesterasa.
5. Variante de cutinasa según la reivindicación 4, en la que dicha variante de cutinasa tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje y comprende
 - a) la sustitución de Gly 73 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Phe, Lys, Leu y Val; o
 - b) la sustitución de Thr 191 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en His, Leu y Tyr; o
 - c) la sustitución de Thr 78 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ala, Leu y Val; o
 - d) la sustitución de Tyr 164 por Phe; o
 - e) la sustitución de Tyr 196 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ala, Leu y Pro; o
 - f) la sustitución de Phe 194 y la sustitución de Ser 219; o
 - g) la sustitución de Ala 80 por Glu.
6. Variante de cutinasa según la reivindicación 5(f), en la que dicho Phe 194 está sustituido por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ala, His, Lys, Leu, Asn, Pro y Gly; y en la que dicho Ser 219 está sustituido por Gly.
7. Variante de cutinasa según la reivindicación 6, en la que dicha variante de cutinasa tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje.
8. Variante de cutinasa según la reivindicación 4, en la que dicha variante de cutinasa tiene actividad incrementada de poliesterasa en comparación con cutinasa de tipo salvaje y comprende
 - a) la sustitución de Phe 194 por Ile; o
 - b) la sustitución de Phe 194 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Lys y Leu, y la sustitución de Ser 219 por Gly; o
 - c) la sustitución de Phe 194 por Asn; o

ES 2 333 789 T3

- d) la sustitución de Phe 194 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Asn, Pro y Ser, y la sustitución de Ser 219 por Gly; o
- e) la sustitución de Gly 73 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Phe y Leu; o
- f) la sustitución de Gly 75 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Asp y Glu; o
- g) las siguientes sustituciones Ile 192 por Met; Phe 194 por Val; y Ser 219 por Gly; o
- h) la sustitución de Ser 219 por Asn, y sustitución de Phe 221 por Leu; o
- i) la sustitución de Ser 99 por Lys; o
- j) la sustitución de Thr 191 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en His, Leu y Tyr; o
- k) la sustitución de Thr 78 por Leu; o
- l) la sustitución de Tyr 196 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ala y Pro; o
- m) la sustitución de Arg 204 por Leu; o
- n) la sustitución de Leu 263 por Pro.

9. Variante de cutinasa según la reivindicación 4, en la que dicha variante de cutinasa tiene estabilidad incrementada en comparación con cutinasa de tipo salvaje y comprende

- a) la sustitución de Phe 194 por un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ile, Leu, Asn y Pro; o
- b) la sustitución de Arg 204 por Leu; o
- c) la sustitución de Leu 263 por Pro.



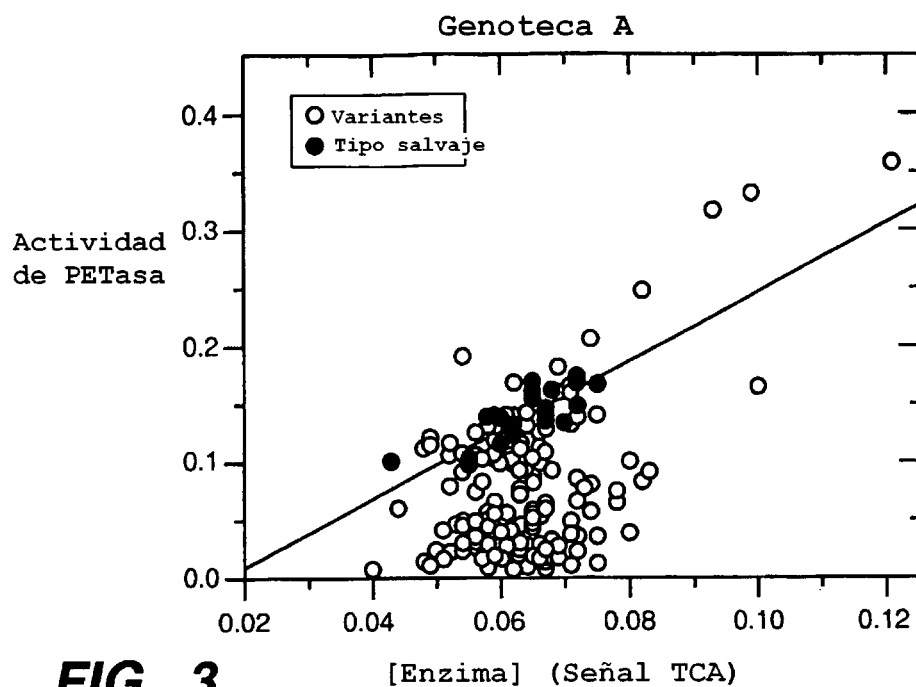


FIG._3

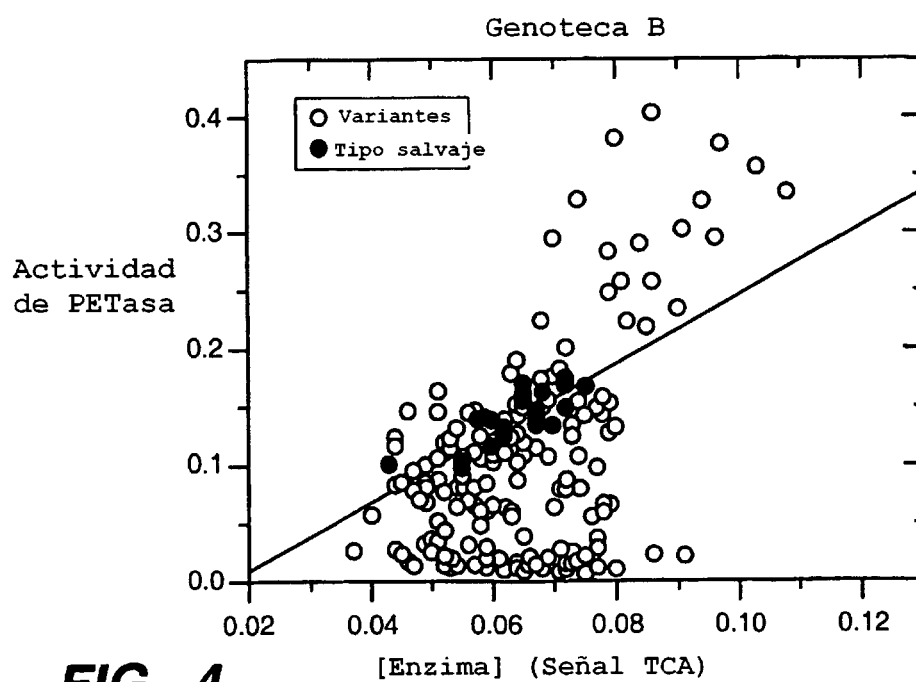


FIG._4

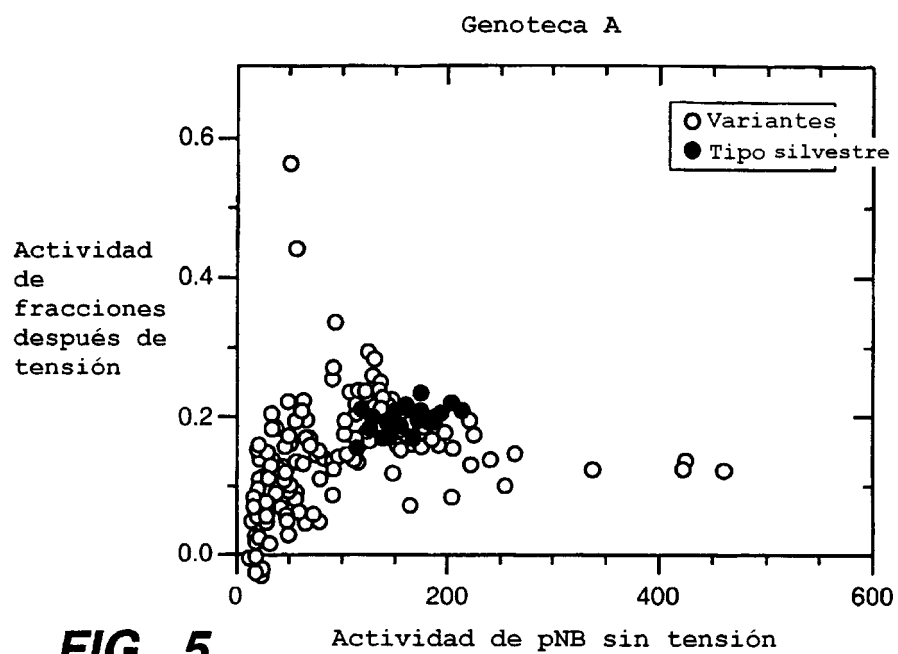


FIG._5

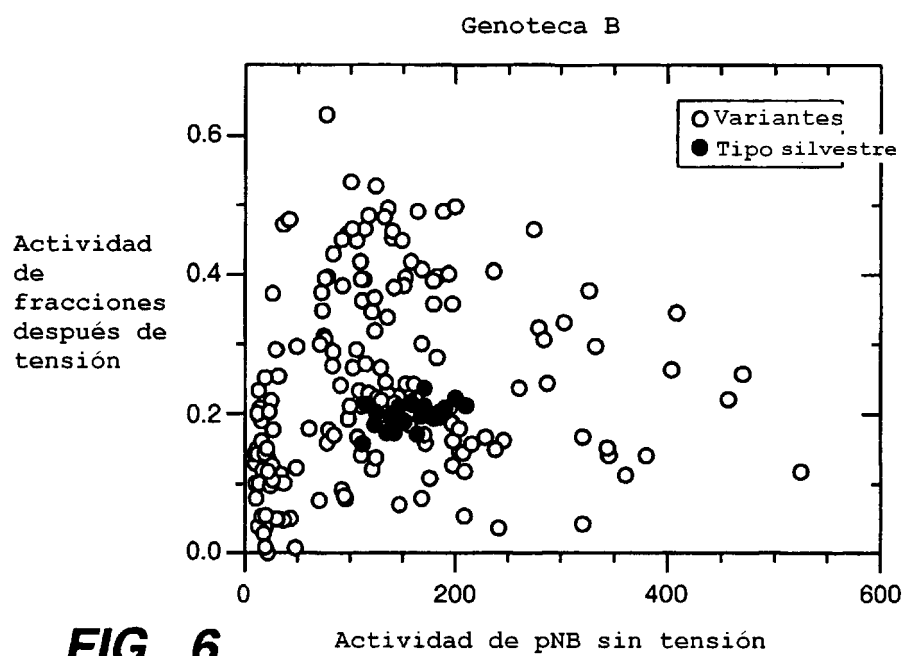


FIG._6



FIG._7



FIG._8



FIG._9

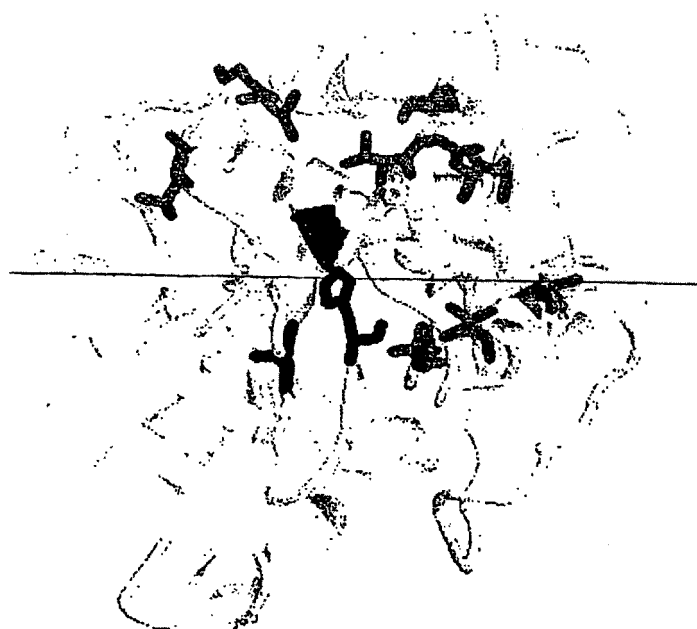


FIG._10



FIG. 11



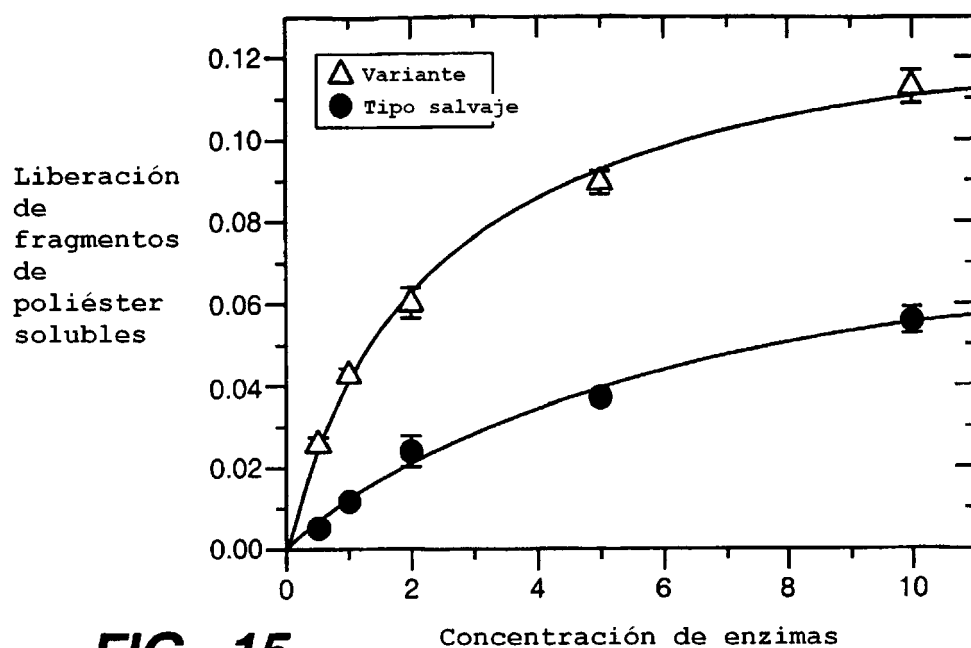
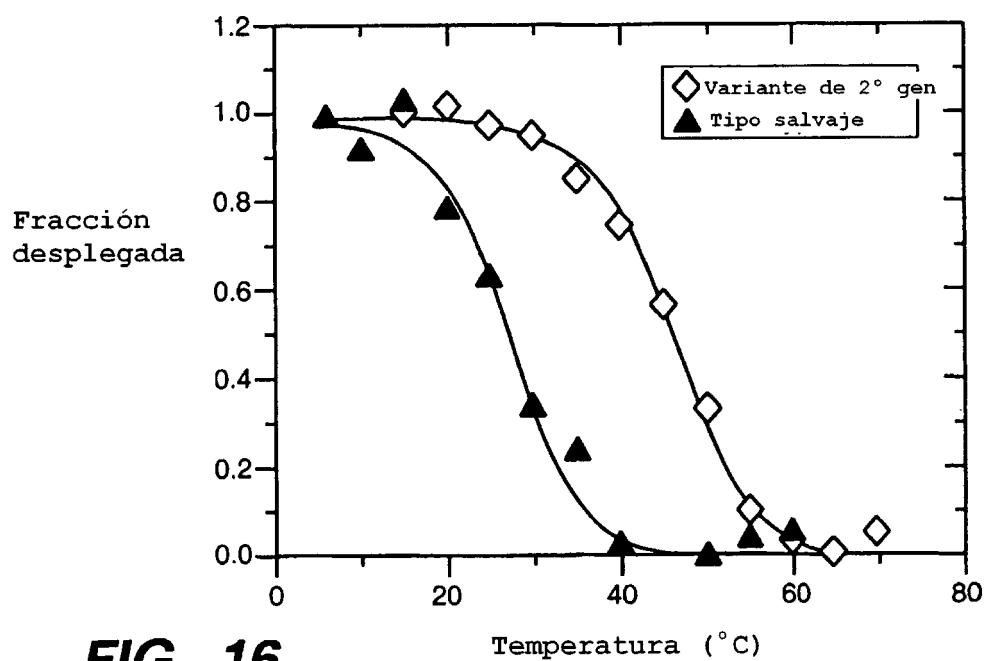
FIG. 12



FIG._13



FIG._14

**FIG._15****FIG._16**

```

TGGCGGCCTCTTGCCGTGTCGGTCTGTGCCACTGTCGCGGC 40
GGCTCCCCTGCCGGATACACCGGGAGCGCCATTTCCGGCT 80
GTCGCCAATTTTCGACCGCAGTGGCCCCCTACACCACCAGCA 120
GCCAGAGCGAGGGGGCCGAGCTGTCGCATCTATCGGCCCCG 160
CGACCTGGGTCAGGGGGGCGTGCGTCATCCGGTGATTCTC 200
TGGGGCAATGGCACC GG TGCCGGGCGTCCACCTATGCCG 240
GCTTGCTATCGCACTGGGCAAGCCACGGTTTCGTGGTGGC 280
GGCGGCGGAAACCTCCAATGCCGGTACC GGGCGGGAAATG 320
CTCGCCTGCCTGGACTATCTGGTACGTGAGAACGACACCC 360
CCTACGGCACCTATTCCGGCAAGCTCAATACCGGGCGAGT 400
CGGCACTTCTGGGCATTCCCAGGGTGGTGGCGGCTCGATC 440
ATGGCCGGGCAGGATACGAGGGTGCGTACCACGGCGCCGA 480
TCCAGCCCTACACCCTCGGCCTGGGGCACGACAGCGCCTC 520
GCAGCGGCGGCAGCAGGGGCCGATGTTCCCTGATGTCCGGT 560
GGCGGTGACACCATCGCCTTTCCCTACCTCAACGCTCAGC 600
CGGTCTACCGGCGTGCCAATGTGCCGGTGTTCTGGGGCGA 640
ACGGCGTTACGTCAGCCACTTCGAGCCGGTCGGTAGCGGT 680
GGGGCCTATCGCGGCCCCGAGCACGGCATGGTTCCGCTTCC 720
AGCTGATGGATGACCAAGACGCCCCGCGCTACCTTCTACGG 760
CGCGCAGTGCAGTCTGTGCACCAGCCTGCTGTGGTCGGTC 800
GAGCGCCGCGGGCTTTAA 818

```

FIG._17

FIG. 18

ES 2 333 789 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110>	Genencor International, Inc.						
5	<120>	Procedimiento de cribado de mutagénesis de alta productividad						
	<130>	SJK/FP6240899						
	<140>	EP 03744218.3						
	<141>	2003-03-05						
10	<150>	PCT/US03/06908						
	<151>	2003-03-05						
	<150>	US 10/091.912						
	<151>	2002-03-05						
15	<150>	US 10/092.227						
	<151>	2002-03-05						
	<150>	US 60/362.372						
20	<151>	2002-03-05						
	<150>	US 60/403.921						
	<151>	2002-08-15						
	<160>	2						
25	<170>	FastSEQ para Windows Versión 4,0						
	<210>	1						
	<211>	818						
30	<212>	ADN						
	<213>	<i>Pseudomonas mendocina</i>						
	<400>	1						
35		tggcggcctc	ttgcctgtcc	gtctgtgcc	ctgtcgccgc	ggctcccctg	ccggatacac	60
		cgggagcgcc	atttccggct	gtcgccaatt	tcgaccgcag	tggcccctac	accaccagca	120
		gccagagcga	ggggccgagc	tgctcgcatct	atcggccccg	cgacctgggt	caggggggag	180
		tgctgcatcc	ggtgattctc	tggggcaatg	gcaccggtgc	cgggcccgtc	acctatgccg	240
		gcttgctatc	gcactgggca	agccacgggt	tcgtggtggc	ggcggcggaa	acctccaatg	300
40		ccggtaccgg	gcgggaaatg	ctgcctgcc	tggactatct	ggtacgtgag	aacgacaccc	360
		cctacggcac	ctattccggc	aagctcaata	ccgggcgagt	cggcacttct	gggcattccc	420
		aggggtggtg	cggtctgatc	atggccgggc	aggatacgag	ggtgcgtacc	acggcgccga	480
		tccagcccta	cacctcggc	ctggggcacg	acagcgccct	gcagcggcgg	cagcaggggc	540
		cgatgttcc	gatgtccggt	ggcggtgaca	ccatcgccct	tccctacctc	aacgctcagc	600
		cggctaccg	gcgtgccaat	gtgccgggtg	tctggggcga	acggcgttac	gtcagccact	660
45		tcgagccggt	cggtagcggt	ggggcctatc	gcggcccgag	cacggcatgg	ttccgcttcc	720
		agctgatgga	tgaccaagac	gcccgcgcta	ccttctacgg	cgcgcagtgc	agtctgtgca	780
		ccagcctgct	gtggtcggtc	gagcgccgcg	ggctttaa			818
	<210>	2						
50	<211>	273						
	<212>	PRT						
	<213>	<i>Pseudomonas mendocina</i>						
55								
60								
65								

ES 2 333 789 T3

<400> 2

	Met	Ala	Ala	Ser	Cys	Leu	Ser	Val	Cys	Ala	Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Pro
	1				5					10					15	
5	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Gly	Ala	Pro	Phe	Pro	Ala	Val	Ala	Asn	Phe	Asp
				20					25					30		
	Arg	Ser	Gly	Pro	Tyr	Thr	Thr	Ser	Ser	Gln	Ser	Glu	Gly	Pro	Ser	Cys
			35					40					45			
10	Arg	Ile	Tyr	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Gly	Gln	Gly	Gly	Val	Arg	His	Pro
	50					55						60				
	Val	Ile	Leu	Trp	Gly	Asn	Gly	Thr	Gly	Ala	Gly	Pro	Ser	Thr	Tyr	Ala
	65				70					75						80
	Gly	Leu	Leu	Ser	His	Trp	Ala	Ser	His	Gly	Phe	Val	Val	Ala	Ala	Ala
15				85					90					95		
	Glu	Thr	Ser	Asn	Ala	Gly	Thr	Gly	Arg	Glu	Met	Leu	Ala	Cys	Leu	Asp
				100					105					110		
	Tyr	Leu	Val	Arg	Glu	Asn	Asp	Thr	Pro	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Ser	Gly	Lys
			115					120					125			
20	Leu	Asn	Thr	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Ser	Gly	His	Ser	Gln	Gly	Gly	Gly
	130						135					140				
	Gly	Ser	Ile	Met	Ala	Gly	Gln	Asp	Thr	Arg	Val	Arg	Thr	Thr	Ala	Pro
	145				150					155						160
25	Ile	Gln	Pro	Tyr	Thr	Leu	Gly	Leu	Gly	His	Asp	Ser	Ala	Ser	Gln	Arg
				165						170					175	
	Arg	Gln	Gln	Gly	Pro	Met	Phe	Leu	Met	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Ile
				180					185					190		
30	Ala	Phe	Pro	Tyr	Leu	Asn	Ala	Gln	Pro	Val	Tyr	Arg	Arg	Ala	Asn	Val
			195					200					205			
	Pro	Val	Phe	Trp	Gly	Glu	Arg	Arg	Tyr	Val	Ser	His	Phe	Glu	Pro	Val
	210					215						220				
35	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Tyr	Arg	Gly	Pro	Ser	Thr	Ala	Trp	Phe	Arg	Phe
	225					230					235					240
	Gln	Leu	Met	Asp	Asp	Gln	Asp	Ala	Arg	Ala	Thr	Phe	Tyr	Gly	Ala	Gln
				245					250						255	
	Cys	Ser	Leu	Cys	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ser	Val	Glu	Arg	Arg	Gly
40				260					265					270		
	Leu															