

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
18 de noviembre de 2010 (18.11.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/130862 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 9/02 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01) C12R 1/645 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2010/070316

(22) Fecha de presentación internacional:

11 de mayo de 2010 (11.05.2010)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 200930157 12 de mayo de 2009 (12.05.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES];
C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):

GARCÍA RUIZ, Eva [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, María Jesús** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **RUIZ DUEÑAS, Francisco Javier** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **MARTÍNEZ FERRER, Ángel T.** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **ALCALDE GALEOTE, Miguel** [ES/ES]; Instituto De Catálisis Petroleoquímica (CIB), Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).

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

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

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

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

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

Publicada:

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

(54) Title: HIGH REDOX POTENTIAL PEROXIDASES DESIGNED BY DIRECTED EVOLUTION

(54) Título : PEROXIDASAS DE ELEVADO POTENCIAL REDOX DISEÑADAS POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA

(57) Abstract: Versatile peroxidases obtained by directed molecular evolution from a versatile peroxidase of *Pleurotus eryngii*, with improved functional expression, catalytic activity and thermal stability, and method for producing same.

(57) Resumen: Peroxidasas versátiles obtenidas mediante evolución molecular dirigida a partir de una peroxidasa versátil de *Pleurotus eryngii*, mejoradas en su expresión funcional, actividad catalítica y estabilidad térmica, y procedimiento de obtención.



WO 2010/130862 A1

**PEROXIDASAS DE ELEVADO POTENCIAL REDOX DISEÑADAS POR
EVOLUCIÓN DIRIGIDA.**

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular, la tecnología del ADN recombinante y la biotecnología. Específicamente se refiere a enzimas del grupo de las peroxidasas ligninolíticas, mejoradas en su expresión funcional, actividad catalítica y estabilidad térmica, sus usos y el procedimiento para su obtención. La expresión funcional así como la mejora de
10 actividad y estabilidad térmica de estas peroxidasas se lleva a cabo en células eucariotas de *Saccharomyces cerevisiae* a través de un proceso de evolución molecular dirigida. Dichas enzimas pueden emplearse como catalizadores en procesos industriales relacionados con la transformación de la biomasa lignocelulósica para la obtención de productos de celulosa, biocombustibles, el
15 sector alimentario, el desarrollo de detergentes, la producción textil y el sector químico, así como en el procesamiento de los efluentes originados en dichos procesos.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

20 Las peroxidasas (EC 1.11.1) son oxidorreductasas que utilizan H_2O_2 u otros hidroperóxidos como oxidantes divalentes de la enzima. La proteína una vez activada cataliza sucesivamente dos oxidaciones monovalentes de diferentes compuestos aromáticos, colorantes, iones metálicos y otros sustratos. Dicha
25 catálisis se lleva a cabo a través del grupo hemo, una protoporfirina IX con un átomo de hierro, que actúa como cofactor de la mayoría de las peroxidasas y que está situado en una cavidad central conectada a la superficie de la enzima por uno o varios canales que permiten el acceso de los sustratos a este centro catalítico.

30 Las peroxidasas se han dividido en dos superfamilias en función de sus diferencias estructurales: la superfamilia de las peroxidasas animales y la

superfamilia de las peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas (Welinder. 1992. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 388-393). Las peroxidasas de plantas han sido las más estudiadas, especialmente la del rábano picante (*Armoracia rusticana*) conocida por sus siglas en inglés (HRP), pero son las fúngicas las que
5 presentan mayor potencial biotecnológico. Esto es debido a que esta clase incluye las peroxidasas de los basidiomicetos ligninolíticos, caracterizadas por su elevado potencial redox ($E^{\circ'} \geq +1000$ mV) (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009. *Microbial Biotechnol.* 2:164-177). Esta característica les permite oxidar el polímero de lignina, otros sustratos aromáticos y colorantes recalcitrantes que
10 no pueden ser oxidados por otras peroxidasas o por las lacasas (enzimas de tipo fenoloxidasas producidas por hongos y otros organismos) -en ausencia de mediadores redox- (Martínez *et al.*, 2005. *Intern. Microbiol.* 8: 195-204).

Las peroxidasas fúngicas de alto potencial redox incluyen tres familias: lignina
15 peroxidasas (LiP), manganeso peroxidasas (MnP) y peroxidasas versátiles (VP, de sus siglas en inglés). Las LiP (EC 1.11.1.13) se caracterizan por su capacidad para oxidar dímeros de lignina de tipo no fenólico y otros compuestos aromáticos de alto potencial redox, siendo el alcohol veratrílico uno de los sustratos más comunes de la enzima. Se trata de un metabolito
20 aromático secretado por los hongos que degradan la lignina y que también se forma durante la degradación de ésta (siendo el sustrato habitualmente utilizado para medir la actividad LiP) que puede actuar como mediador redox de corto recorrido -debido a su baja estabilidad- durante la despolimerización de la lignina. Las MnP (EC 1.11.1.14) oxidan específicamente el Mn^{2+} a Mn^{3+} y
25 éste, al quelarse con ácidos orgánicos sintetizados por los hongos, actúa como un oxidante difusible (quelatos estables con $E^{\circ'} = 0,9-1,2$ V). A través de este mecanismo mediado, la MnP es capaz de degradar los elementos fenólicos y ácidos carboxílicos en el proceso de degradación de la lignina de la pared
30 vegetal, aunque no es capaz de oxidar directamente las unidades no fenólicas de la lignina.

Las VP (EC 1.11.1.16) descritas principalmente en especies de *Pleurotus* y *Bjerkandera* (Martínez 2002. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 425-444), y más recientemente en *Cerrena unicolor* (Rainio *et al.*, 2008. Proceedings of the 8th International Peroxidase Symposium, Tampere), combinan las propiedades catalíticas de la LiP y la MnP y de ciertas peroxidasas de plantas (como la HRP), lo que les confiere una gran versatilidad y potencial biotecnológico (Martínez, 2007. En Polaina y MacCabe (Eds.) *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer, Berlin, pags. 475-486). De esta forma, las VP pueden oxidar sustratos típicos de la LiP (como el alcohol veratrílico, los metoxibencenos, y compuestos modelo de lignina de tipo no fenólico), así como el Mn^{2+} , característico de la MnP. En concreto, la VP presenta en su estructura un hipotético sitio de unión del manganeso, responsable de la oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} , (al igual que la MnP) y un triptófano catalítico, responsable de la oxidación de compuestos aromáticos de alto potencial redox (al igual que la LiP). Además, la VP por si misma es capaz de oxidar compuestos fenólicos (como las peroxidasas de plantas), colorantes tipo azo y en general de alto potencial redox -como el Reactive Black 5- o hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) que la LiP solamente puede oxidar en presencia de alcohol veratrílico y la MnP no puede oxidar ni siquiera en presencia de Mn^{2+} . El pH óptimo para la oxidación de estos sustratos varía desde pH 5.0 para la oxidación del Mn^{2+} a pH 3.0 para el alcohol veratrílico, valores similares a los óptimos para la oxidación de estos mismos sustratos por la MnP y la LiP, respectivamente.

La VP mejor caracterizada es la de *Pleurotus eryngii* (conocida como “seta de cardo”), un hongo modelo para los estudios de degradación selectiva de la lignina. Su caracterización ha comprendido análisis espectroscópicos y cristalográficos y la aplicación de la mutagénesis dirigida, lo que ha convertido a la VP en un modelo tanto para el estudio de mecanismos generales de la catálisis por peroxidasas como para el establecimiento de las bases estructurales de sus propiedades catalíticas únicas. Recientemente se ha determinado la estructura cristalina de la VP recombinante procedente de un

replegado *in vitro* tras expresión en *Escherichia coli* (variante alélica VPL2) a una resolución de 1,33 Å (referencia PDB 2BOQ). En ella se observa el grupo hemo en el centro de una estructura formada por 12 hélices predominantemente alfa. Presenta 4 puentes disulfuro, dos sitios de unión a calcio, tres residuos ácidos potencialmente implicados en la oxidación del Mn²⁺ y un triptófano superficial (Trp164) que es el inicio de una ruta de transporte electrónico de largo recorrido para la oxidación de compuestos de alto potencial redox (como el alcohol veratrílico o el Reactive Black 5) (Pérez-Boada *et al.* 2005. *J. Mol. Biol.* 354: 385-402). Además la VP presenta un sitio para la oxidación de compuestos de bajo potencial redox (0,6-0,8 V) como fenoles y ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato).

La tecnología de las enzimas ligninolíticas de alto potencial redox puede ser empleada en prácticamente la totalidad de la cadena de producción de productos papeleros -desde la elaboración de la pasta de papel hasta el tratamiento de efluentes- aunque es en el blanqueo libre de cloro de las pastas donde resulta más atractiva. Además las enzimas ligninolíticas encuentran aplicaciones en los siguientes sectores (Xu, 2005. *Industrial Biotechnology* 1:38-50):

20

- i) La industria alimentaria: procesamiento de bebidas o de productos de panadería.
- ii) La industria textil: degradación (destoxificación) de los colorantes de los efluentes o blanqueo de tejidos (lavado a la piedra de *jeans*).
- iii) Nanobiotecnología: a) como detectores de fenoles, oxígeno, azidas, morfina, codeína, catecolaminas o flavonoides en la elaboración de biosensores para análisis clínicos y medioambientales; y b) elaboración de biopilas de combustible.
- iv) Biorremediación: degradación de PAHs, compuestos AOX, etc.

- v) Síntesis química: producción de polímeros complejos, síntesis de agentes farmacológicos, preparación de derivados antibióticos y cosméticos.

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

A pesar de las ventajas biotecnológicas que ofrecen las peroxidasas de alto potencial redox, éstas no se han podido aun aplicar a nivel industrial debido a que no se han conseguido expresar funcionalmente a niveles suficientemente
15 elevados en huéspedes apropiados. Esto en parte puede ser debido a que están glicosiladas lo que, unido a su inherente complejidad estructural (contienen cuatro-cinco puentes disulfuro, dos Ca^{2+} estructurales y un grupo hemo) dificulta su correcto plegamiento y expresión funcional. La variante alélica VPL2 de la VP de *P. eryngii* se expresó inicialmente en *Emericella*
20 *nidulans*, obteniéndose unos niveles en torno a 0,4 mg/L (Ruiz-Deñás *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4705-4707) y posteriormente en *Aspergillus niger* sin conseguir mejoras sobre los valores obtenidos con *E. nidulans* (Eibes *et al.*, 2009. *Bioprocess Biosyst Eng.* 32:129-134).

25 Considerando la eficiencia de transformación, la estabilidad del ADN plasmídico y la tasa de crecimiento, *E. coli* es el organismo hospedador más frecuentemente utilizado en la expresión funcional heteróloga de los genes que codifican la proteína de interés. Sin embargo, el diferente uso de codones y la imposibilidad de realizar las modificaciones post-traduccionales necesarias
30 para la correcta secreción de la proteína madura (como el procesamiento proteolítico o las glicosilaciones) pueden causar un plegamiento inapropiado de la proteína que es acumulada en cuerpos de inclusión, impidiendo su expresión

- funcional. Se ha descrito la expresión de la VP de *P. eryngii* en *E. coli* y su posterior replegado *in vitro* a partir de cuerpos de inclusión con rendimientos próximos al 7% (~5 mg/L) que son los más elevados obtenidos para una peroxidasa de secreción (Pérez-Boada *et al.* 2002. *Enzyme. Microb. Tech.* 30: 518-524). Este hecho, probablemente refleje la dificultad inherente de *E. coli* como un huésped de expresión para proteínas eucariotas, debido a su imposibilidad de glicosilar y a su limitada capacidad para favorecer la formación de puentes disulfuro. Muy recientemente se ha reportado la expresión funcional de la VP de *Bjerkandera adusta* en *E. coli*, aunque la enzima obtenida mostraba unos valores de actividad específica extremadamente bajos (en el orden de mU/mg). Los autores del trabajo atribuyen este fenómeno a un plegamiento conformacional diferente al de la proteína salvaje (Mohorcic *et al.*, 2009. *Bioresource Technology* 100:851-858).
- Algunos de los problemas anteriores pueden evitarse si los genes se expresan en hospedadores eucarióticos cuya maquinaria celular sea más próxima a la nativa, como es el caso de las levaduras. En especial, el uso de *Saccharomyces cerevisiae* es de gran interés ya que posee la habilidad de glicosilar y secretar las proteínas al medio extracelular (lo cual evita pasos intermedios de lisis celular) y tiene una elevada eficiencia de transformación. Además, haciendo uso de un vector episómico adecuado no integra el plásmido dentro de su genoma, facilitando así su posterior manipulación. Otra ventaja muy interesante desde un punto de vista de generación de diversidad para experimentos de evolución dirigida es su elevada frecuencia de recombinación de ADN, la cual a diferencia de *E. coli* permite la construcción de genotecas *in vivo* a través de la recombinación homóloga de diferentes genes (conocido como *in vivo* ADN *shuffling* o "*barajado*"). Por último, la ligación de los genes mutados en vectores de expresión es, en muchos casos, un paso laborioso que requiere un ajuste fino. En levaduras, el mecanismo reparador de huecos (*in vivo gap repair*) puede sustituir la ligación *in vitro* de una manera rápida y precisa (Bulter & Alcalde, 2003. Directed evolution: library creation. Methods and protocols. Ed. Arnold, F.H. y Georgiou, G. Humana

Press, Totowa, New Jersey (EEUU), pp. 17-22.). Sin embargo, la expresión funcional de peroxidasas ligninolíticas en *S. cerevisiae* tiene bajos rendimientos debido probablemente a los diferentes mecanismos moleculares e incompatibilidades entre el hongo de partida (basidiomiceto) y el huésped heterólogo (ascomiceto).

Las dificultades descritas para la expresión funcional heteróloga de peroxidasas ligninolíticas pueden ser superadas mediante el empleo de técnicas de evolución molecular dirigida (Arnold, 2001. *Nature* 409:253-257). Esta metodología recrea en el laboratorio los procesos claves de la evolución natural (mutación, recombinación y selección) de manera que es posible diseñar enzimas de gran interés científico y tecnológico. Sometiendo los genes seleccionados a ciclos sucesivos de evolución molecular, las diferentes mutaciones puntuales beneficiosas se irán acumulando y combinando hasta adquirir la propiedad deseada, que se ve mejorada de manera notoria, generación tras generación.

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

La evolución molecular dirigida de oxidorreductasas fúngicas requiere preferentemente la expresión funcional de la enzima en *S. cerevisiae* como vehículo para la producción de la enzima. Conviene indicar que primero se puede hacer uso de la evolución molecular dirigida para aumentar el nivel de

expresión de la enzima en *S. cerevisiae* y posteriormente usar el sistema de expresión diseñado para mejorar otras propiedades de la enzima (por ejemplo, la termoestabilidad). Un ejemplo claro de esta aproximación se detalló para la expresión funcional de lacasas fúngicas en *S. cerevisiae*. Utilizando este
5 procedimiento se consiguió incrementar hasta 18 mg/L la producción de lacasa del ascomiceto *Myceliophthora thermophila* en *S. cerevisiae* así como mejorar su estabilidad térmica (Bulter *et al.*, 2003. *Appl. Environ. Microb.* 69: 987-995).

La expresión funcional de la VP en *S. cerevisiae* no se ha descrito con éxito
10 hasta el momento. Únicamente se ha reportado la mejora por evolución dirigida o mutagénesis combinatorial de peroxidasas de bajo potencial redox o de otras peroxidasas ligninolíticas. En primer lugar se reportó la evolución dirigida de la peroxidasa de *Coprinopsis cinerea* (CiP) -de bajo potencial redox- para mejorar su estabilidad operacional frente a la temperatura, presencia de H₂O₂ y pH
15 alcalino. Como huésped heterólogo en el protocolo evolutivo se empleó *S. cerevisiae* y se sobre-expresó en *Aspergillus oryzae* (Cherry *et al.*, 1999. *Nature Biotech.* 17:379-384). Posteriormente, el grupo de Arnold describió la evolución dirigida de la HRP -de bajo potencial redox- para su expresión funcional en *S. cerevisiae* y sobre-expresión en *Pichia pastoris* (Morawski *et al.*,
20 2000. *Protein Engineering.* 13:377-384). En un trabajo ulterior, emplearon el mismo sistema para mejorar la estabilidad térmica y resistencia al H₂O₂ de la HRP (Morawski *et al.*, 2001. *Biotechnology and Bioengineering* 76: 99-107). Con respecto a peroxidasas ligninolíticas, se ha descrito un experimento de mutagenesis saturada combinatorial en la MnP para mejorar su estabilidad
25 frente al H₂O₂. Como sistema de expresión se hizo uso de un método de expresión *in vitro* de la proteína basado en el sistema de *E. coli* (Miyazaki-Imamura *et al.*, 2003. *Protein Engineering* 16:423-428). Más recientemente, se evolucionó la LiP para conferirle mayor eficiencia catalítica y resistencia frente al H₂O₂. Como sistema de expresión se empleó *S. cerevisiae* a través de un
30 "yeast surface display" o de la secreción directa (Ryu *et al.*, 2008. *Journal of Biotechnology* 133: 110-115; Ryu *et al.*, 2008. *Journal of Biotechnology* 135:241-246).

Es necesario, por tanto, desarrollar VP extracelulares, funcionales y solubles con actividad mejorada hacia uno o más sustratos y termoestabilidad incrementada, así como encontrar un método para producirlas heterológamente a niveles suficientemente elevados en huéspedes apropiados, que las expresen funcionalmente, para poder aplicarlas a nivel industrial. Dichas enzimas pueden emplearse como catalizadores en procesos industriales relacionados con la transformación de la biomasa lignocelulósica para la obtención de productos de celulosa, biocombustibles, el sector alimentario, el desarrollo de detergentes, la producción textil y el sector químico, así como en el procesamiento de los efluentes originados en dichos procesos

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la expresión de enzimas peroxidasas de elevado potencial redox, obtenidas a partir de la VP de *P. eryngii*, y producidas funcionalmente en sistemas de expresión basados en el organismo eucariótico *S. cerevisiae*. En mayor detalle, la presente invención se refiere a polipéptidos o proteínas generadas mediante varios métodos de evolución dirigida de las secuencias polinucleotídicas que comprenden el gen de la VP de *P. eryngii* y la secuencia codificante de la secuencia señal nativa del factor α de *S. cerevisiae*, dando lugar a una expresión funcional mejorada en dicho hospedador y/o a una actividad enzimática aumentada hacia uno o más sustratos así como a una mejora en la termoestabilidad de la enzima.

25

Un resumen de los polinucleótidos y polipéptidos descritos en la presente invención se resumen en la **Tabla 1**.

VARIANTE	SECUENCIAS AMINOACÍDICAS	VARIANTE	SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS
	SEQ ID N°		SEQ ID N°
11H10	1	11H10	2

15G9	3	15G9	4
4B5	5	4B5	6
4B1	7	4B1	8
16E12	9	16E12	10
19C2	11	19C2	12
20D1	13	20D1	14
13G1	15	13G1	16
10C3, 6B1	17	10C3	18
13E4	19	6B1	20
6E7	21	13E4	22
11F3	23	6E7	24
R4	25	11F3	26
24E10	27	R4	28
3H9	29	24E10	30
15B4	31	3H9	32
2-1B	33	15B4	34
α -VP	35	2-1B	36
Seq señal factor α nativo	37	α -VP	38
VP madura nativa	39	Seq señal factor α nativo	40
		VP madura nativa	41

Tabla 1. Polinucleótidos y polipéptidos de la invención.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a los polinucleótidos aislados que codifican el polipéptido con actividad peroxidasa, de ahora en adelante polinucleótidos de la invención, caracterizado porque su secuencia aminoacídica presenta una identidad de al menos un 50% con la SEQ ID NO: 35, y porque presenta al menos una de las mutaciones que se selecciona de la lista que comprende:

- a. la sustitución del aminoácido ácido glutámico (E) por el aminoácido lisina (K), en la posición homóloga a la posición 128 de la SEQ ID NO: 35,
- 5 b. la sustitución del aminoácido histidina (H) por el aminoácido arginina (R), en la posición homóloga a la posición 130 de la SEQ ID NO: 35,
- c. la sustitución del aminoácido valina (V) por el aminoácido alanina (A), en la posición homóloga a la posición 251 de la SEQ ID NO: 35,
- 10 d. la sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido metionina (M), en la posición homóloga a la posición 275 de la SEQ ID NO: 35,
- e. la sustitución del aminoácido glutamina (Q) por el aminoácido leucina (L), en la posición homóloga a la posición 293 de la SEQ ID NO: 35,
- 15 f. la sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) por el aminoácido alanina (A), en la posición homóloga a la posición 304 de la SEQ ID NO: 35,
- g. la sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido isoleucina (I), en la posición homóloga a la posición 375 de la SEQ ID NO: 35,
- 20 h. la sustitución del aminoácido alanina (A) por el aminoácido treonina (T), en la posición homóloga a la posición 399 de la SEQ ID NO: 35,
- 25 i. la sustitución del aminoácido ácido glutámico (G) por el aminoácido arginina (R), en la posición homóloga a la posición 421 de la SEQ ID NO: 35,

Dado que las peroxidasas versátiles de hongos basidiomicetos ligninolíticos, y
30 otras enzimas peroxidasas como las MnP producidas por la mayoría de los basidiomicetos ligninolíticos y otras VP producidas por especies de los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera*, pueden considerarse afines en cuanto a su evolución,

puede esperarse que la identidad global de los genomas al nivel de los aminoácidos, y más concretamente a nivel de la secuencia aminoacídica correspondiente a la SEQ ID NO: 35, sea de un 50% o mayor, y más preferiblemente de un 60% o mayor y más preferiblemente de un 80, un 90, un 5 95 o un 99% o mayor. La correspondencia entre la secuencia aminoacídica de la(s) peroxidasa(s) fúngicas putativa(s) y la secuencia de otras peroxidosas se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquéllas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia aminoacídica procedente de la peroxidasa putativa, y la secuencia 10 aminoacídica correspondiente a la SEQ ID NO: 35 de esta memoria.

El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre do estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza o identidad entre los nucleótidos de dos 15 o más polinucleótidos.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos polinucleótidos que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el 20 estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1999)). Puesto que dos proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen función y estructura similares, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 30% indican estructuras 25 homólogas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80%, mantendrán las mismas propiedades de dicho péptido.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a los polinucleótidos aislados que codifican el polipéptido cuya secuencia 30 aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID

NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 33.

El término “aislado”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a
5 nucleótidos o péptidos que: 1) se encuentran sustancialmente libres de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con él en la naturaleza, o 2) si se encuentran en su medio natural, han sido sintéticamente (no naturalmente) alterados por la intervención humana y/o introducidos en una célula que no los posee de forma nativa. Por ejemplo, un nucleótido natural se
10 convierte en “aislado” si se ha alterado, o si proviene de un ADN que ha sido alterado por medio de la intervención humana (por medio de, por ejemplo pero sin limitarnos, mutagénesis dirigida, inserciones, deleciones, etc). De la misma manera, un nucleótido natural se convierte en “aislado” si se introduce por medios no naturales en un genoma no nativo a dicho nucleótido (transfección).
15 Por tanto, el término “aislado” en este último caso, es equivalente al término “heterólogo”.

Los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de secuencias aminoacídicas descritos corresponden a variantes de la proteína de fusión α -
20 VP nativa constituida por la secuencia señal del factor α operativamente enlazada a la secuencia de la VP nativa de *P. eryngii*. Dicha proteína de fusión α -VP nativa corresponde a la secuencia de nucleótidos, o polinucleótidos, que constituyen la secuencia codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 35.

25

Por tanto, los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la
30 SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 33 han sido obtenidos mediante un proceso de evolución dirigida a

partir de la α -VP nativa y podrán dar lugar a variantes de la VP cuya actividad catalítica y/o expresión funcional y/o termoestabilidad ha sido mejorada.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a los
5 polinucleótidos aislados que se seleccionan de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 34 y la SEQ ID NO: 36.

10

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

15

El primer polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 1, secuencia que presenta el mutante 11H10 de los ejemplos de la invención y
20 corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 2 o en su cadena complementaria,

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

25 (a), ó

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

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

El segundo polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 3, secuencia que presenta el mutante 15G9 de los ejemplos de la invención y
5 corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 4 o en su cadena complementaria,

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

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

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

El tercer polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de
20 una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 5, secuencia que presenta el mutante 4B5 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada
25 que consiste en la SEQ ID NO: 6 o en su cadena complementaria,

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

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

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

5 El cuarto polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 7, secuencia que presenta el mutante 4B1 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

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

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

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

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

El quinto polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 9,
25 secuencia que presenta el mutante 16E12 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

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

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

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

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al
5 polinucleótido aislado, de ahora en adelante sexto polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 11.

El sexto polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional
10 mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 11, secuencia que presenta el mutante 19C2 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 12 o en su cadena complementaria,

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

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

20

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

25

El séptimo polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 13, secuencia que presenta el mutante 20D1 de los ejemplos de la invención y
30 corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 14 o en su cadena complementaria,

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

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

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

El octavo polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 15, secuencia que presenta el mutante 13G1 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 16 o en su cadena complementaria,

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

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

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

El noveno polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 17,

secuencia que presentan los mutantes 10C3 y 6B1 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

- 5 a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 18 o la SEQ NO: 20 o en sus cadenas complementarias,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de (a), ó
- 10 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético.

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

El décimo polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 19,
20 secuencia que presenta el mutante 13E4 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 22 o en su cadena complementaria,
- 25 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de (a), ó
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético.

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

invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 21.

El undécimo polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 21, secuencia que presenta el mutante 6E7 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

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

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

El duodécimo polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 23, secuencia que presenta el mutante 11F3 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 26 o en su cadena complementaria,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de (a), ó

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

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

El decimotercer polinucleótido de la invención constituye la secuencia
10 codificante de una variante de la α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 25, secuencia que presenta el mutante R4 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada
15 que consiste en la SEQ ID NO: 28 o en su cadena complementaria,

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

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

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

El decimocuarto polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad y termoestabilidad mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 27,
30 secuencia que presenta el mutante 24E10 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 30 o en su cadena complementaria,

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

5 (a), ó

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

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

El decimoquinto polinucleótido de la invención constituye la secuencia
15 codificante de una variante de la α -VP con actividad y termoestabilidad mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 29, secuencia que presenta el mutante 3H9 de los ejemplos de la invención y corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada
20 que consiste en la SEQ ID NO: 32 o en su cadena complementaria,

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

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

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al polinucleótido aislado, de ahora en adelante decimosexto polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica
30 corresponde a la SEQ ID NO: 31.

El decimosexto polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la α -VP con actividad y termoestabilidad mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 31, secuencia que presenta el mutante 15B4 de los ejemplos de la invención y
5 corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 34 o en su cadena complementaria,

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

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

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al
15 polinucleótido aislado, de ahora en adelante decimoséptimo polinucleótido de la invención, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica corresponde a la SEQ ID NO: 33.

El decimoséptimo polinucleótido de la invención constituye la secuencia
20 codificante de una variante de la α -VP con actividad y termoestabilidad mejorada, cuya secuencia polipeptídica se recoge en la SEQ ID NO: 33, secuencia que presenta el mutante 2-1B de los ejemplos de la invención y corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada
25 que consiste en la SEQ ID NO: 36 o en su cadena complementaria,

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

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

Se reportan, por tanto, las secuencias polinucleotídicas de los mutantes obtenidos por evolución dirigida que codifican para variantes de α -VP con actividad catalítica y/o expresión funcional y/o termoestabilidad mejorada.

- 5 Hasta el momento no se ha descrito la expresión funcional de la VP en *S. cerevisiae*. La invención incluye el procedimiento para producir dichos polinucleótidos y enzimas mejoradas mediante la metodología de evolución molecular dirigida, proporcionando además una solución para producir heterológamente VP extracelulares, funcionales y solubles con actividad
- 10 mejorada hacia uno o más sustratos y termoestabilidad incrementada.

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

1) Introducción de la secuencia señal del factor α para favorecer la expresión funcional de la VP en *S. cerevisiae*. La secuencia señal del factor α se emplea habitualmente para favorecer la secreción de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae* (Shuster, J.R. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2:685-690. 1991). Dicha
5 secuencia señal se escinde durante la maduración de la proteína y su secreción al medio extracelular, por lo que no forma parte de la enzima madura. La nueva construcción (la secuencia señal del factor α fusionada con el gen que codifica la proteína madura, denominada en esta memoria como α -VP) se somete al proceso de evolución dirigida con el fin de aumentar la
10 expresión funcional y los valores de actividad total VP. Por lo tanto, la acumulación de mutaciones beneficiosas puede tener lugar tanto en la secuencia señal del factor α como en la secuencia de la VP madura.

2) Desarrollo de protocolos de generación de diversidad y creación de las librerías de mutantes. La generación de diversidad se lleva a cabo
15 empleando diferentes herramientas: i) introducción aleatoria de mutaciones puntuales en α -VP mediante amplificación del ADN en reacciones en cadena de ADN polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) sometida a error y denominada desde este momento PCR mutagénica; y ii) recombinación de ADN de diferentes genes mutados de α -VP para facilitar la acumulación de
20 mutaciones beneficiosas y la eliminación de aquellas que se presentan como deletéreas o neutrales, a través de: a) el barajado *in vivo* del ADN mutagenizado; b) el ensamblaje *in vivo* de librerías mutantes con diferente espectro mutacional (lvAM “*in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra*”); o c) la recombinación *in vitro* del ADN a través de una
25 modificación del proceso conocido como *Staggered Extension Process* (StEP), que desde este momento denominamos StEP mutagénico.

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

3) Exploración de alta capacidad o *screening high-throughput* para la selección de los mejores mutantes de expresión y actividad. Esta fase

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

10

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

30

Por tanto, el método para la obtención de los polinucleótidos y enzimas mejoradas requiere el diseño de una nueva construcción genética, (la

secuencia señal del factor α fusionada con el gen que codifica la proteína madura, denominada α -VP). Así pues, otro aspecto de la invención se refiere a una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante construcción genética de la invención, que comprende uno de los siguientes tipos de

5 secuencias:

- a) un polinucleótido aislado de la invención,
- b) un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la
- 10 SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 35.
- c) una molécula de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida
- 15 en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a), ó
- d) una secuencia de nucleótidos de a), ó b), preferiblemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la
- 20 transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras
- secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc...

25

Esta construcción genética incluye los vectores de clonación y expresión que comprenden los polinucleótidos aislados de la invención. Tales vectores de expresión incluyen secuencias de control, tales como, por ejemplo, elementos de control de la traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la

30 transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión). Los vectores conforme a la invención pueden incluir plásmidos y virus, y otros vectores de acuerdo con procedimientos bien conocidos y documentados en la

técnica, y pueden expresarse en una variedad de sistemas de expresión diferentes, asimismo bien conocidos y documentados en la técnica.

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

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

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

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

“Unidos de forma operativa” se refiere a una yuxtaposición en la que los
componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar de la
30 manera deseada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a una secuencia codificadora está ligada de tal manera que la expresión de la

secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Un “marco de lectura abierto” (ORF de su nombre en inglés) es una región de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido; esta región puede representar una porción de una secuencia codificadora o una secuencia codificadora completa.

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

En una realización preferida de este aspecto, el polinucleótido de (a), de la construcción genética de la invención, codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 35.

20

En otra realización preferida de este aspecto, el polinucleótido de (a), de la construcción genética de la invención, se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 34 y la SEQ ID NO: 38. En otra realización más preferida de este aspecto, la secuencia nucleotídica del polinucleótido de (a), de la construcción genética de la invención, consiste en la SEQ ID NO: 38.

30

La presente invención permite producir, en cantidades hasta ahora no disponibles, VP que presenta una mayor expresión funcional, una mayor actividad catalítica y una termoestabilidad mejorada.

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

Por tanto, otro aspecto se refiere a una célula, de ahora en adelante célula de la invención, que comprende un polinucleótido aislado de la invención, o la construcción genética de la invención.

El término “célula” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. En esta invención, preferiblemente se refiere a una célula eucariótica, y más preferiblemente a una célula que puede clasificarse dentro del género *Saccharomyces*.

Otro aspecto se refiere al uso de los polinucleótidos aislados de la invención, a la construcción genética de la invención, o a la célula de la invención, para producir peroxidasas versátiles (VP) con mayor expresión funcional y/o mayor actividad catalítica y/o mayor estabilidad térmica.

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

Medios de cultivos adecuados son conocidos en el estado de la técnica. Un “hospedador” o “célula hospedadora” o “célula hospedante” se refiere a un organismo, célula o tejido que sirve como diana o recipiente del polinucleótido que codifica una proteína recombinante de interés, donde la célula

hospedadora se transforma con un vector de expresión conteniendo el polinucleótido de interés. En esta memoria, la proteína recombinante de interés es una VP de origen fúngico, de alto potencial redox, que presenta una mayor expresión funcional, una mayor actividad catalítica y una mayor
5 termoestabilidad.

Preferiblemente, el hospedador es *S. cerevisiae*. La levadura de cerveza *S. cerevisiae* es un hongo unicelular que pertenece al superreino *Eukaryota*, (grupo Metazoa/Fungi), reino *Fungi*, subreino *Dikarya*, phylum *Ascomycota*,
10 subphylum *Saccharomycotina*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales*, familia *Saccharomycetaceae* y género *Saccharomyces*.

La presente invención comprende, por tanto, variantes de genes y enzimas del grupo de las VP que presentan una mayor expresión funcional en *S. cerevisiae*,
15 una mayor actividad catalítica y/o una mayor termoestabilidad.

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

- a) diseñar una construcción genética que comprenda el polinucleótido aislado que codifica el polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 39 o cualquiera de sus variantes,
- b) generar diversidad sobre la construcción genética de (a) y crear las
25 librerías de mutantes, y
- c) seleccionar los mejores mutantes de expresión, actividad y/o termoestabilidad.

En una realización preferida de este aspecto, el polinucleótido aislado que
30 codifica el polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 39, o cualquiera de sus variantes, del paso (a) del método de la invención, se encuentra operativamente enlazado a otra secuencia nucleotídica que dirija la

secreción y/o facilite el correcto procesamiento de la enzima. En una realización más preferida, el polinucleótido aislado que codifica el polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 39 o cualquiera de sus variantes, del paso (a) del método de la invención, se encuentra operativamente enlazado al polinucleótido aislado que codifica el polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 39 o cualquiera de sus variantes.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteína cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 39. En general, una variante incluye adiciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a la proteína cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 39 (o en la SEQ ID NO: 37), cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con dicha secuencia de aminoácidos, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 39 (o en la SEQ ID NO: 37), de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 70%, ventajosamente de, al menos, un 80%, preferiblemente de, al menos un 90%, más preferiblemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferiblemente de, al menos, un 99%.

En la construcción genética del procedimiento de la invención se fusiona el gen de la proteína madura de la VP con la secuencia señal del factor α para favorecer la expresión funcional de la VP madura en *S. cerevisiae*. La secuencia señal del factor α se corresponde con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 37 y la secuencia del gen de la proteína madura de la VP se corresponde con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 39.

En el contexto de la presente invención, la secuencia señal nativa del factor α se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la

secuencia codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO 37, que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 40, o en su cadena complementaria,
 - 5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de (a), ó
 - c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético,
- 10 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la secuencia señal nativa del factor α .

La VP de *P. eryngii* está definida en la presente invención por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del

15 polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO 39, que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada que consiste en la SEQ ID NO: 41, o en su cadena complementaria,
 - 20 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de (a), ó
 - c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- 25 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la VP. de *P. eryngii*.

En otra realización preferida de este aspecto, el método de la invención además comprende la identificación y el mapeo de las mutaciones introducidas

30 en las variantes seleccionadas. En otra realización más preferida, la construcción genética del paso (a) del método de la invención, comprenda el polinucleótido aislado cuya secuencia nucleotídica consiste en la SEQ ID NO:

40, operativamente enlazado con el polinucleótido aislado cuya secuencia nucleotídica consiste en la SEQ ID NO: 41.

En otra realización preferida, el método de la invención además comprende
5 repetir los pasos (a)-(c), empleando en la construcción genética según (a) los polinucleótidos que codifican para los mejores mutantes de expresión, actividad y/o termoestabilidad obtenidos en el paso (c), de manera consecutiva.

En esta memoria “de manera consecutiva” significa que los pasos (a) – (c) del
10 método de la invención se repiten en ciclos, uno después de otro, empleando en la construcción genética según (a) los polinucleótidos que codifican para los mejores mutantes de expresión, actividad y/o termoestabilidad obtenidos en el paso (c) del ciclo anterior. Los ciclos pueden repetirse tantas veces como se
quiera, comprobando, por ejemplo, las características de los diferentes
15 mutantes obtenidos (características de interés como por ejemplo, pero sin limitarnos, expresión funcional, actividad y/o termoestabilidad), hasta que los valores de dichas características en los mutantes obtenidos en el paso (c) del último ciclo no varíen significativamente desde un punto de vista estadístico de los mutantes obtenidos en el paso o los pasos (c) de los ciclos anteriores, o
20 hasta que obtengamos un mutante con las características que sean de interés.

Así, en una realización particular de la presente invención el procedimiento se aplica en un primer ciclo de evolución dirigida del gen parental α -VP. La fase 1 del procedimiento se lleva a cabo empleando como molde el vector pGAPZ α de
25 InvitrogenTM y el ADNc *vpl2* de *P. eryngii*, cuya secuencia nucleotídica se recoge en la SEQ ID NO: 41.

El fragmento de ADN amplificado de α -VP es subclonado en el vector lanzadera pJRoc30 (Novozymes) para facilitar la expresión funcional en *S. cerevisiae* y la sobre-producción plasmídica en *E. coli* (**Fig. 1**). La fase 2 del
30 procedimiento se lleva a cabo a través de la construcción de una librería de mutantes con una tasa mutacional baja (promedio de mutaciones puntuales

introducidas al azar en el gen parental α -VP) creada mediante PCR mutagénica. En la **Fig. 2** se muestra el paisaje de evolución dirigida de la librería construida, con un 13 % de los clones explorados con menos del 10 % de la actividad del tipo parental. El clonaje de las librerías mutantes con el
5 vector de expresión se lleva a cabo *in vivo* haciendo uso de la maquinaria celular eucariota de *S. cerevisiae*. Para ello, se co-transforma la librería en cuestión con el plásmido de expresión linearizado. Los productos de PCR generados poseen extensiones solapantes de no menos de 50 pares de bases que facilitan el clonaje *in vivo* y la reparación del vector de expresión mediante
10 un proceso de recombinación homóloga. Los extremos solapantes se generan gracias al diseño de oligonucleótidos cebadores de la reacción de PCR mutagénica que confieran dicha homología con los extremos del vector linearizado.

15 Para la fase 3 del procedimiento se realiza un *screening* empleando ensayos de actividad en modo de punto final con el sustrato no fenólico ABTS. Los protocolos de re-*screening* (en especial el segundo re-*screening*) se llevan a cabo a partir de células transformantes nuevas para promover la sincronización celular y evitar la selección de falsos positivos. Los detalles citados para esta
20 fase son también aplicables en todas las realizaciones particulares que se describen a continuación referentes a ciclos evolutivos. De la presente realización se seleccionan 4 genes mutantes de α -VP denominados 11H10, 15G9, 4B5 y 4B1 con mejoras que van desde 9 a 3,6 veces mejor actividad total que el parental α -VP expresado en *S. cerevisiae* (**Tabla 2** y **Fig. 3**). En
25 esta memoria se define como “actividad total” aquella que se deriva de la mejora en el nivel de expresión y la actividad catalítica de la enzima.

En otra realización particular de la presente invención el procedimiento se aplica en un segundo ciclo de evolución dirigida utilizando como parentales los genes mutantes obtenidos en la primera generación: 11H10, 15G9, 4B5 y 4B1.
30 La fase 2 del procedimiento se lleva a cabo mediante la construcción de una librería mutagénica a través de un barajado *in vivo* de los genes parentales previamente mutagenizados. Este enfoque facilita el empuje evolutivo hacia

mejoras en la actividad total mediante: i) la recombinación de las mejores mutaciones de los genes parentales, ii) la introducción de nuevas mutaciones puntuales beneficiosas. La recombinación *in vivo* de los mejores parentales se lleva a cabo mediante una co-transformación de los productos de PCR mutagénica de dichos genes con el vector linearizado en *S. cerevisiae*. Los extremos solapantes facilitan el clonaje *in vivo* al tiempo que la elevada tasa de recombinación homóloga de *S. cerevisiae* favorece la recombinación de las mutaciones acumuladas para generar genes quimera.

- 10 La fase 3 se lleva a cabo mediante protocolos de ensayo de actividad en modo de punto final. En la **Fig. 4** se muestra el paisaje de evolución dirigida de la librería construida, con un 35 % de los clones explorados con menos del 10 % de la actividad del tipo parental. De esta realización se seleccionan 4 genes mutantes de α -VP denominados 16E12, 19C2, 20D1 y 13G1, con mejoras que van desde 4.6 a 3.2 veces la actividad total del mejor gen mutante de la anterior generación, 11H10 (**Tabla 2** y **Fig. 5**).

En una realización particular de la presente invención el procedimiento se aplica en un tercer ciclo de evolución dirigida utilizando como parentales los genes mutantes obtenidos en la segunda generación: 16E12, 19C2, 20D1 y 13G1. La fase 2 del procedimiento se lleva a cabo mediante la construcción de una librería mutagénica a través de un barajado *in vivo* de los genes parentales previamente mutagenizados, de igual manera que se describe en la realización anterior. La fase 3 se realiza mediante protocolos de ensayo de actividad en modo cinético, debido a la mayor actividad de partida de los tipos parentales. En la **Fig. 6** se muestra el paisaje de evolución dirigida de la librería construida, con un 40 % de los clones explorados con menos del 10 % de la actividad del tipo parental. De esta realización se seleccionan 5 genes mutantes de α -VP denominados 10C3, 6B1, 13E4, 6E7 y 11F3, con mejoras que van desde 3,1 a 2,4 veces la actividad total del mejor gen mutante de la anterior generación, 16E12 (**Tabla 2** y **Fig. 7**).

En una realización particular de la presente invención el procedimiento se aplica en un cuarto ciclo de evolución dirigida utilizando como parentales los genes mutantes obtenidos en la tercera generación: 10C3, 6B1, 13E4, 6E7 y 11F3. En este cuarto ciclo además del *screening* hacia la mejora de actividades, se introduce un nuevo *screening* para la mejora de la estabilidad térmica. La fase 2 del procedimiento se lleva a cabo mediante la construcción de una librería mutagénica a través de un barajado *in vitro* de los genes parentales mediante una reacción de StEP mutagénico combinado con un posterior barajado *in vivo* de los genes en *S. cerevisiae*. Este protocolo de diversidad se aplica con la finalidad de generar entrecruzamientos diferentes a los obtenidos con la técnica de barajado *in vivo* empleada en las generaciones anteriores. La fase 3 se realiza mediante protocolos de ensayo de actividad en modo cinético y de punto final. Para este cuarto ciclo se diseña adicionalmente un ensayo de *screening* de termoestabilidad para seleccionar mutantes con estabilidad mejorada frente a la temperatura. El ensayo estuvo basado en la oxidación del ABTS y se expresó en valores relativos con respecto a las actividades iniciales mostradas por los mutantes antes y después de su incubación a una temperatura dada (**Fig. 8**).

Generación	Mutación		1G			2G				3G					4G	5G	5G	6G		
	Aminoácido	Codón	11H10	15G9	4B5	4B1	16E12	19C2	20D1	13G1	10C3	6B1	13E4	6E7	11F3	R4	24E10	3H9	15B4	2-1B
	K(α6)T	ATT/ACT							*						+					
	L(α11)S	TTA/TCA												*						
	F(α12)F	TTC ₁₉ /TTT ₂₆											*							
	E(α45)K	GAA/AAA											*							
	A(α49)A	GCT ₂₇ /GCC ₁₂				*				+										
	E(α27)G	GAA/GGA					*		+						+					
	V(α50)A	GTT/GCT			*															
	P(α54)P	CCA ₁₉ /CCG ₁₃													*					
	E37K	GAG/AAG		*				+			+	+	+	+		+	+	+	+	+
	H39R	CAC/CGC			*				+						+					*
	V160A	GTC/GCC				*				+			+			+	+	+	+	+
	T184M	ACG/ATG	*				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P185P	CCA ₁₉ /CCG ₁₃									*									
	O202L	CAA/CAT									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L207P	CTC/CCC																		
	D213A	GAC/GCC											*							
	I278I	ATT ₂₇ /ATC ₁₇			*															
	T284I	ACC/ATC																*	*	
	A308T	GCC/ACC																		
	D316D	GAC ₂₀ /GAT ₂₈						*				+								
	S324T	TCC/ACC				*														
	G330R	GGA/AGA															*	+	+	+
Mejoras de actividad total mutante/sivestre (nº veces)			9	7.4	6.3	3.6	41.4	36	34.2	28.8	129	128	121	118	97.7	238	138	109	164	87.4
Termoestabilidad - T _{1/2} (°C)-			60.5	nd	nd	nd	60.5	nd	nd	nd	60.5	nd	nd	nd	nd	59.4	62.7	63.9	62.4	65.3

Tabla 2. Mutaciones en los mutantes seleccionados de la α-VP durante su evolución para la mejora de actividad total y termoestabilidad. +, mutación acumulada; •, nueva mutación. En sombreado se muestran las mutaciones sinónimas; el subíndice en los codones indica su uso para *S. cerevisiae*. nd: no determinada. Las mejoras (en veces) de actividad total proceden de los datos del protocolo en *high-throughput* en el 2º re-screening.

En la **Fig. 9** se muestran los paisajes de evolución dirigida de la librería construida, con un 16 % de los clones explorados con menos del 10 % de la actividad del tipo parental. De esta realización se seleccionan 2 genes mutantes de α -VP denominados R4 (mejor y último mutante seleccionado de actividad; relación mejora de actividad total/mejora de estabilidad: 1,84/1,07 con respecto al mejor mutante de la generación anterior, 10C3) y 24E10 (mejor mutante de estabilidad; relación mejora de actividad total/mejora de estabilidad: 1.07/1.23 con respecto al mejor mutante de la generación anterior, 10C3) (**Tabla 2 y Fig. 10**).

10

En una realización particular de la presente invención el procedimiento se aplica en un quinto ciclo de evolución dirigida exclusivamente hacia termoestabilidad utilizando como parental el gen mutante del *screening* de termoestabilidad de la cuarta generación, 24E10. La fase 2 del procedimiento se lleva a cabo mediante la construcción de una librería mutagénica a través de la recombinación *in vivo* de librerías mutagénicas del parental 24E10 con diferente espectro mutacional (lvAM). Este protocolo de diversidad se introduce para generar un espectro mutacional diferente al obtenido con los ensayos mutagénicos con Taq/MnCl₂ de las generaciones anteriores. La fase 3 se realiza mediante protocolos de ensayo de termoestabilidad en modo cinético y de punto final. El *screening* de termoestabilidad se modifica aumentando la temperatura de incubación hasta valores que supongan la pérdida de las 2/3 partes de la actividad del parental 24E10.

15

20

25

30

En la **Fig. 11** se muestra los paisajes de evolución dirigida de la librería construida, con un 37 % de los clones explorados con menos del 10 % de la actividad del tipo parental. De esta realización se seleccionan 2 genes mutantes de α -VP denominados 3H9 y 15B4 (relaciones mejora de actividad total/mejora de estabilidad con respecto al mejor mutante de termoestabilidad de la generación anterior -24E10- de 0,79/1,35 y 1,19/1,21 respectivamente) (**Tabla 2 y Fig. 12**).

En una realización particular de la presente invención el procedimiento se aplica en un sexto ciclo de evolución dirigida hacia termoestabilidad utilizando como parental los genes mutantes del *screening* de termoestabilidad de la quinta generación, 3H9 y 15B4. La fase 2 del procedimiento se lleva a cabo mediante la construcción de una librería mutagénica a través de un barajado *in vivo* de los genes parentales previamente mutagenizados, de igual manera que se describe para los ciclos evolutivos segundo y tercero. La fase 3 se realiza mediante protocolos de ensayo de actividad en modo cinético y de punto final. El *screening* de termoestabilidad se modifica aumentando la temperatura de incubación hasta valores que supongan la pérdida de las 2/3 partes de la actividad de los parentales 3H9 y 15B4. Del cuarto al sexto ciclo de evolución la presión selectiva del ensayo de *screening* (la temperatura fijada) se incrementa de 60°C a 90°C.

En la **Fig. 13** se muestra los paisajes de evolución dirigida de la librería construida, con un 43 % de los clones explorados con menos del 10 % de la actividad del tipo parental. De esta realización se selecciona 1 gen mutante de α -VP denominado 2-1B (relaciones mejora de actividad total/mejora de estabilidad con respecto al mejor mutante de la generación anterior -3H9- de 0,8/1,27) (**Tabla 2 y Fig. 14**).

En una realización particular, el método de la invención comprendería la identificación y el mapeo de las mutaciones introducidas en las variantes seleccionadas. La identificación de las mutaciones introducidas en las variantes seleccionadas se llevo a cabo mediante la secuenciación del ADN de los mutantes del gen α -VP obtenidos tras seis ciclos de evolución dirigida (**Tabla 2 y Figs. 3, 5, 7, 10, 12, 14 y 15**). Para la interpretación de las mutaciones obtenidas, y si no se indica de otra manera, el número determina la posición del residuo mutado en la secuencia de aminoácidos original de la VP madura, el primer aminoácido (a la izquierda del número) es el original en la secuencia de la VP madura y el segundo es aquel por el que se muta. Para el caso de mutaciones en la secuencia señal del factor α , el número va acompañado de la

letra " α ". G indica Glicina, V indica Valina, L indica Leucina, I indica Isoleucina, F indica Fenil Alanina, Y indica Tirosina, W indica Triptófano, S indica Serina, T indica Treonina, C indica Cisteína, M indica Metionina, N indica Asparragina, Q indica Glutamina, D indica Ácido Aspártico, E indica Ácido Glutámico, K indica
5 Lisina, R indica Arginina, H indica Histidina y P indica Prolina.

La localización de las mutaciones identificadas en el plegamiento global de la proteína (**Figs. 16 y 17**) se realiza en base a la estructura cristalográfica de la VPL2 depositada en la base de datos estructurales de proteínas PDB (Berman
10 *et al.*, 2000. *Nucleic Acids. Res.* 28: 235-242) con la referencia 2BOQ (Pérez-Boada, 2005. *Mol. Biol.* 354: 385-402). En dicha estructura se pueden predecir los cambios ocasionados como consecuencia de la incorporación de las diferentes mutaciones puntuales (p. ej. contactos con aminoácidos adyacentes, incluyendo puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, etc)
15 responsables de las mejoras observadas en cada uno de los mutantes obtenidos en los diferentes ciclos de evolución.

Así pues, en la realización particular de la invención se han completado 6 ciclos evolutivos: los tres primeros orientados hacia la mejora de la actividad total de
20 α -VP; los tres últimos hacia la termoestabilidad de α -VP. El cuarto ciclo evolutivo combinó la exploración de mutantes tanto para mejora de actividad total como para mejora de termoestabilidad (**Fig.15**).

El mejor mutante de la última generación de actividad total (cuarta generación),
25 mutante R4, acumula 4 mutaciones tras 4 ciclos evolutivos y 6400 clones explorados (**Tabla 2 y Figs. 10 y 15**). El mejor mutante de termoestabilidad de la última generación (sexta generación), mutante 2-1B, acumula 7 mutaciones tras 6 ciclos evolutivos y 9000 clones explorados (**Tabla 2 y Figs. 14 y 15**).

30 Ninguna de estas mutaciones (ni en R4 ni en 2-1B) se encuentra en la secuencia señal del factor α . La secuencia señal del factor α comprende 83 aminoácidos, de los cuales 19 constituyen el pre-péptido y 64 el pro-péptido. El

pre-péptido es el responsable de la inserción de la cadena polipeptídica en maduración en el retículo endoplasmático, tras lo cual es escindido por la acción de una endo-peptidasa entre los aminoácidos 19 y 20. El pro-péptido interviene en el plegamiento de la cadena polipeptídica durante su transición y estancia del retículo endoplasmático al aparato de Golgi. El pro-péptido es escindido en el Golgi antes de que la enzima madura sea secretada al exterior mediante la actuación de tres proteasas específicas (*KEX1*, *KEX2* y *STE13*). Aunque durante el protocolo evolutivo se llegan a introducir hasta 8 mutaciones (3 de ellas sinónimas) tanto en el pre- como en el propéptido, el que los mutantes finales de actividad total y estabilidad no conserven ninguna de estas mutaciones indica que no son indispensables para la secreción de la VP en *S. cerevisiae* y la secuencia señal del factor α nativa -sin modificaciones adicionales en su secuencia- funciona de manera adecuada para orientar y favorecer la secreción de los mutantes finales de VP.

A partir de la cuarta generación, todos los mutantes seleccionados presentan un “armazón aminoacídico” común constituido por las mutaciones E37K, V160A, T184M y Q202L (**Tabla 2** y **Figs. 10 y 15**). Tres de estas cuatro mutaciones (E37K, V160A, T184M) fueron introducidas de manera independiente en diferentes mutantes de la primera generación (11H10, 15G9, 4B1) mientras que la mutación Q202L procede del mejor mutante de la segunda generación, 16E12. Los protocolos de recombinación de ADN escogidos han permitido entrecruzamientos idóneos por lo que tras cuatro ciclos estas mutaciones aparecen en los mejores genes seleccionados, produciendo un efecto sinérgico para aumentar la actividad total de los mutantes y conservándose en los ciclos ulteriores de evolución.

La evaluación de la mejora de los mutantes de α -VP se estima determinando su actividad total a partir de los sobrenadantes de los fermentados celulares a escala de microcultivo (formato 96 pocillos) y de manera más precisa por litro de fermentado. En una realización particular de la presente invención se evalúa la actividad total de los mejores mutantes de las generaciones orientadas a la mejora de actividad total (ciclos 1º al 4º; **Tabla 3**). El mejor mutante de

actividad total, R4, muestra una actividad de 2400 U/L, lo que supone una mejora de aproximadamente 700 veces la actividad total del parental inicial α -VP en *S. cerevisiae*. Estos resultados significan de manera particular la primera VP expresada de forma funcional y soluble en *S. cerevisiae* y en términos generales constituyen los niveles de expresión más altos descritos para cualquier peroxidasa ligninolítica en *S. cerevisiae* hasta el momento, estimados en torno a 29 mg/L de cultivo (**Tabla 4**). Las mutaciones que constituyen el armazón aminoacídico (E37K, V160A, T184M y Q202L) en los mutantes de α -VP son las responsables de los niveles de expresión obtenidos.

10

Las mutaciones del armazón aminoacídico (E37K, V160A, T184M y Q202L) (**Tabla 2 y Fig. 10**) podrían ser aplicables en la expresión heteróloga de cualquier otro gen eucariótico relacionado filogenéticamente con la VP susceptible o deseable de ser expresado en especies del género *Saccharomyces* o en otras levaduras relacionadas (como *P. pastoris*) para su mejora mediante evolución dirigida, y más particularmente en la expresión heteróloga y mejora de genes de otras peroxidases de alto potencial redox, como la MnP que es producida por la mayoría de los basidiomicetos ligninolíticos.

20

	Generación	Actividad total (U-ABTS/L)	Mejora (veces)
α -VP	---	3.5	1
Mutante 11H10	1	68	20
Mutante 16E12	2	210	61
Mutante 10C3	3	730	212
Mutante R4	4	2400	696
Mutante 24E10 (de termoestabilidad)	4	1760	509

Tabla 3. Actividades por litro de fermentado para los mejores mutantes de cada generación. La Unidad de actividad catalítica (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones de reacción.

5

	Actividad total (U-ABTS/L cultivo)	Actividad específica (U-ABTS/mg VP)	Proteína VP secretada (mg VP/L cultivo) Actividad total/Actividad específica
Mutante R4	2400	84	28.5 (13% del total de proteína secretada)

Tabla 4. Proteína VP secretada por el mutante R4 en *S. cerevisiae*.

En una realización particular de la presente invención se evaluó la termoestabilidad de los diferentes mutantes obtenidos. Para ello, se determina la T_{50} definida como la temperatura a la que la enzima pierde la mitad de su actividad catalítica (actividad residual/actividad inicial) tras 10 min de incubación.

Como se puede apreciar en la **Fig. 18**, la T_{50} se desplaza aproximadamente 2°C por ciclo evolutivo de termoestabilidad con una mejora final de 5°C (de 60,5 hasta 65,3°C) con respecto al parental α -VP. Es notorio observar una mejora 29.5°C en la T_{50} si se compara el mejor mutante de termoestabilidad (2-1B, T_{50} =65.3°C) con la VP nativa expresada en *E. coli* (T_{50} =37°C).

El grado de glicosilación de α -VP en *S. cerevisiae* se estimó inferior al 10 % (equivalente al encontrado para la VP salvaje de *P. eryngii*). Los bajos porcentajes de glicosilación de la VP en *S. cerevisiae* y las diferencias encontradas en las termoestabilidades con respecto a la VP expresada en *E. coli* sugieren un plegamiento idóneo de la enzima cuando se expresa

funcionalmente en *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* es conocido por hiperglicosilar enzimas heterólogas lo que puede aumentar la estabilidad de la enzima. No es el caso de los mutantes de la α -VP, sus termoestabilidades se deben a un plegamiento apropiado y a la mejora genética debido a los ciclos evolutivos de termoestabilidad introducidos. Además, el bajo grado de glicosilación indica que el período de residencia de los mutantes de la α -VP en su tránsito del retículo endoplasmático al Golgi y su posterior exocitosis debe ser corto, lo que es indicativo de una secreción optimizada para este sistema de expresión heteróloga.

En una realización particular de la presente invención se purifica la variante R4 (**Fig. 19**). Se calculan las actividades ($\mu\text{mol producto } \mu\text{mol peroxidasa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) del mutante R4 y de la VP expresada en *E. coli*. El mutante R4 es activo frente a una amplia gama de sustratos de diferente naturaleza (**Tabla 5**).

	ABTS	RB5	Alcohol veratrílico	Mn ²⁺	Dimetoxifenol
VP nativa*	53	0,68	11,4	89	2,88
Mutante R4	113	0,84	4,5	34	1,41

Tabla 5. Actividades catalíticas ($\mu\text{mol producto } \mu\text{mol peroxidasa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) de la VP nativa expresada en *E. coli* y el mutante R4 expresado en *S. cerevisiae*. *La VP nativa expresada en *E. coli* procede de un repliegado *in vitro* a partir de cuerpos de inclusión.

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

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

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la
15 presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Construcción de pJRoC30- α -VP.

20

Fig. 2. Paisajes del ensayo de *screening* frente a ABTS de la primera generación. Las actividades de los clones de las bibliotecas de mutantes se representan en orden descendente. Las líneas discontinuas indican la actividad del tipo parental α -VP.

25

Fig. 3. Mutantes obtenidos en el primer ciclo de evolución dirigida.

Fig. 4. Paisaje del ensayo de *screening* frente a ABTS de la segunda generación. Las actividades de los clones de la biblioteca de mutantes se representan en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del
30 tipo parental usado como estándar interno en el *screening* (mutante 11H10).

Fig. 5. Mutantes obtenidos en el segundo ciclo de evolución dirigida. Se indican con diferentes colores los eventos de entrecruzamiento y la introducción de nuevas mutaciones.

5 **Fig. 6.** Paisaje del ensayo de *screening* frente a ABTS de la tercera generación. Las actividades de los clones de la biblioteca de mutantes se representan en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental usado como estándar interno en el *screening* (mutante 16E12).

10 **Fig. 7.** Mutantes obtenidos en el tercer ciclo de evolución dirigida. Se indican con diferentes colores los eventos de entrecruzamiento y la introducción de nuevas mutaciones.

15 **Fig. 8.** Protocolo de *screening* de termoestabilidad empleado de la 4ª a la 6ª generación.

Fig. 9. A) Paisaje de selección de termoestabilidad empleando ABTS como sustrato en la cuarta generación. La línea discontinua indica la actividad/termoestabilidad del parental 10C3. **B)** Paisaje del ensayo de *screening* frente a ABTS de la cuarta generación. Las actividades de los clones de la biblioteca de mutantes se representan en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental usado como estándar interno en el *screening* (mutante 10C3).

25 **Fig. 10.** Mutantes obtenidos en el cuarto ciclo de evolución dirigida. Se indican con diferentes colores los eventos de entrecruzamiento y la introducción de nuevas mutaciones.

30 **Fig. 11. A)** Paisaje de selección de termoestabilidad empleando ABTS como sustrato en la quinta generación. La línea discontinua indica la actividad/termoestabilidad del parental 24E10. **B)** Paisaje del ensayo de *screening* frente a ABTS de la quinta generación. Las actividades de los clones

de la biblioteca de mutantes se representan en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental usado como estándar interno en el *screening* (mutante 24E10).

- 5 **Fig. 12.** Mutantes obtenidos en el quinto ciclo de evolución dirigida. Se indican con diferentes colores los eventos de entrecruzamiento y la introducción de nuevas mutaciones.

- 10 **Fig. 13. A)** Paisaje de selección de termoestabilidad empleando ABTS como sustrato en la sexta generación. La línea discontinua indica la actividad/termoestabilidad del parental 3H9. **B)** Paisaje del ensayo de *screening* frente a ABTS de la sexta generación. Las actividades de los clones de la biblioteca de mutantes se representan en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental usado como estándar interno en el *screening* (mutante 3H9).

- 15 **Fig. 14.** Mutantes obtenidos en el sexto ciclo de evolución dirigida. Se indican con diferentes colores los eventos de entrecruzamiento y la introducción de nuevas mutaciones.

20

Fig. 15. Esquema general del proceso de evolución artificial. Las mejoras se calculan con respecto al correspondiente parental empleado como referencia durante el *screening* del ciclo evolutivo.

- 25 **Fig. 16.** Modelo molecular de la VP (referencia PDB 2BOQ) (**A**) y del mutante R4 (**B**). Los aminoácidos mutados presentes en el mutante R4 y los correspondientes en la VP nativa se muestran subrayados en ambos modelos. Los puentes de hidrógeno entre estos residuos y los aminoácidos adyacentes aparecen en línea discontinua. También se muestra una interacción potencialmente desestabilizadora entre E37 y D30 en la enzima nativa
- 30 (sombreada en rojo) que desaparece con la sustitución E37K en el mutante R4.

Fig. 17. Modelo molecular de la VP (**A**) y del mejor mutante de termoestabilidad, 2-1B (**B**). Se muestran los 7 aminoácidos mutados en el mutante 2-1B, y los correspondientes presentes en la VP nativa. Los tres aminoácidos subrayados (R39, A213 y R330) son específicos del mutante 2-1B, mientras que los restantes cuatro aminoácidos mutados corresponden al “armazón aminoacídico” común a todos los mutantes seleccionados a partir de la cuarta generación.

Fig. 18. Termoestabilidad de la VP. El estudio de termoestabilidad se realizó con ayuda de un termociclador de gradiente (Mycycler, Biorad EEUU). El ensayo de actividad se llevó a cabo en tampón tartrato sódico 100 mM (pH 3,5) con ABTS 2 mM siguiendo la formación de su radical catiónico ($\epsilon_{418} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras la adición de H_2O_2 0,1 mM. Los valores de actividad a diferentes temperaturas se normalizaron con la actividad inicial a temperatura ambiente antes de la incubación. Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes.

Fig. 19. Caracterización bioquímica del mutante R4. **A)** Electroforesis (SDS-PAGE) de los distintos pasos de purificación de la variante R4. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con Azul de Coomassie. 1) Patrón de peso molecular; 2) VP nativa expresada en *E. coli* y replegada *in vitro*; 3) Extracto crudo de un fermentado de *S. cerevisiae* que expresa R4; 4) Después de precipitación con sulfato amónico al 65%, resuspendido y dializado en tampón piperazina- Cl^- 20 mM (pH 5,5); 5) Después de cromatografía de baja resolución en columna de intercambio aniónico fuerte (HiTrap-Q FF de Amersham Bioscience); 6) Después de cromatografía de alta resolución en columna de intercambio aniónico fuerte (Mono-Q 5/5HR, Amersham Biosciences). **B)** Perfiles de actividad a diferentes valores de pH de R4 expresada en *S. cerevisiae* y VP nativa expresada en *E. coli*. Las actividades se midieron con ABTS 2 mM en tampón Britton y Robinson 100 mM (sin CaCl_2 y con 1 mM de CaCl_2) ajustado a los diferentes pH de la medida, y 0,1 mM de H_2O_2 . La actividad VP se representa normalizada con respecto a su valor óptimo de

actividad. Cada punto procede del valor medio de tres experimentos independientes.

EJEMPLOS

5

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, los cuales no pretenden ser limitativos del alcance de su protección.

10 EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN DE α -VP

La proteína de fusión (α -VP) empleada en la presente invención está constituida por la secuencia señal del factor α fusionada con el gen que codifica para la proteína VP madura. Para fusionar la secuencia señal del factor α , se tomó como molde el vector de StratageneTM pGAPZ α , utilizado para expresión de proteínas en *P. pastoris*, que contiene el pre-pro péptido señal del factor α . En primer lugar, se linearizó pGAPZ α con las enzimas de restricción EcoRI y NotI. El ADNc *vpl2* de *P. eryngii*, 996 pb, (SEQ ID NO: 41), fue amplificado con los oligonucleótidos cebadores NecoRI-directo (SEQ ID NO: 15 42) y CtNotI-reverse (SEQ ID NO: 43) que incluyen dianas de restricción para EcoRI y NotI (**GAATTC** y **GCGGCCGC** respectivamente, subrayadas y en negrita), generando el molde de la VP madura que excluye la secuencia señal nativa. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes: 400 nM del oligonucleótido NecoRI-directo, 400 nM oligonucleótido CNotI-reverse, 0,25 mM dNTPs, 0,05 U/ μ L Taq polimerasa (Invitrogen), 0,5 ng/ μ L de ADNc *vpl2* en tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,4) y 4 mM de MgCl₂ en un volumen final de 50 μ L. El programa de PCR empleado fue: 94 °C durante 5 min, 55 °C durante 5 min, 72 °C durante 5 min (1 ciclo), 95 °C durante 0,35 min, 50 °C durante 2 min, 72 °C durante 4 min (25 ciclos) y 72 °C durante 10 min (1 25 ciclo). El producto amplificado VP fue digerido con EcoRI y NotI y ligado al vector linearizado pGAPZ α generando la construcción pGAPZ α -VP. Dicho 30

vector se transformó en células competentes de *E. coli* DH5α por choque térmico para sobre-producir y purificar el plásmido.

α-VP se amplificó a partir de pGAPZα-VP mediante PCR con ayuda de los
5 oligonucleótidos NtpJRBamHI-directo (SEQ ID NO: 44) y CtNotI-reverse (SEQ ID NO: 43) los cuales incluyen dianas de restricción para *Bam*HI y *Not*I (**GGATCC** y **GCGGCCGC**, respectivamente, subrayadas y en negrita). La reacción de PCR se llevo a cabo en 50 µl conteniendo 400 nM del oligonucleótido NtpJRBamHI-directo, 400 nM oligonucleótido CtNotI-reverso,
10 0,25 mM dNTPs, 0,05 U/µL Taq polimerasa (Invitrogen), 0,4 ng/µL de pGAPZα-VP en tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,4) y 4 mM de MgCl₂. El programa de PCR empleado fue: 94 °C durante 5 min, 55 °C durante 5 min, 72 °C durante 5 min (1 ciclo), 95 °C durante 0,35 min, 50 °C durante 2 min, 72 °C durante 4 min (25 ciclos) y 72 °C durante 10 min (1 ciclo).

15

α-VP fue subclonado en el vector lanzadera pJRoC30 (Novozymes, USA). pJRoC30 es un vector episómico bifuncional de 10477 pb que contiene el promotor GAL1 (inducible por galactosa), el gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli* y el gen *URA3* que complementa la auxotrofia para
20 uracilo en cepas *ura3-* de *S. cerevisiae* (las células de *S. cerevisiae* crecidas con este vector pueden cultivarse en medio selectivo, sin uracilo). Se llevo a cabo la digestión de pJRoC30 con las enzimas *Bam*HI y *Not*I, así como la digestión de α-VP con *Bam*HI y *Not*I. Se ligó α-VP digerido y el plásmido pJRoC30 linearizado dando lugar a la construcción pJRoC30-α-VP (**Fig. 1**).
25 Debido a la estrategia de clonación utilizada, en el extremo amino terminal de la proteína aparecen dos aminoácidos extras (E-F) tras el procesamiento del péptido señal. Las mutaciones introducidas en la proteína madura durante el proceso evolutivo mantienen la numeración descrita para la VP madura de *P. eryngii* nativa.

30

EJEMPLO 2. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE α-VP

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

1.1 Ajuste de las condiciones de PCR mutagénica

5

La generación de diversidad mediante PCR-mutagénica se llevó a cabo en un termociclador de gradiente (Thermocycler Mycycler, Biorad, EEUU) bajo los siguientes parámetros de reacción: 95 °C durante 2 min (1 ciclo); 94 °C durante 45 s, 53 °C durante 45 s, 74 °C durante 3 min (28 ciclos); y 74 °C durante 10 min (1 ciclo). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación mutagénica fueron RMLN directo (SEQ ID NO: 45; con sitio de unión a pJRoC30- α -VP en la posición pb 5'-160-181-3') y RMLC reverso (SEQ ID NO: 46; con sitio de unión a pJRoC30- α -VP en la posición pb 5'-1532-1551-3'). Para promover la ligación *in vivo*, los productos de PCR se diseñaron conteniendo extensiones con una homología de 40 pb y 66 pb para los extremos digeridos con *Bam*HI y *Xho*I del vector linearizado, respectivamente.

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

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

A) Genotecas Mutazima-II:

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

nM de oligonucleótido RMLC, 0,8 mM dNTPs, 3 % (v/v) DMSO, 0,05 U/ μ L de Mutazima ADN polimerasa (Genemorph II Random Mutagenesis kit, Stratagene) y 52 ng/ μ L de pJRoc30- α -VP.

5 B) Genotecas *Taq* polimerasa/MnCl₂:

En este caso, la tasa de mutación se controló variando la concentración de MnCl₂. Adicionalmente también se analizó el efecto de concentraciones equilibradas/desequilibradas de dNTPs y de la concentración del ADN molde en la reacción de PCR mutagénica (**Tabla 6**).

1.2 Primera generación: PCR mutagénica con *Taq* polimerasa/MnCl₂

Se diseñó y exploró una genoteca de 1408 clones, usando como parental α -VP. Éste fue amplificado mediante PCR propensa a error con dNTPs equilibrados y una concentración de MnCl₂ de 0,01 mM, tal como se detalla en la **Tabla 6**. La mezcla de transformación de la genoteca contenía una relación vector linealizado:producto de PCR 1:4 (200 ng de vector y 800 ng de producto de PCR). El *screening* de punto final se desarrolló como se describe en el apartado 2 del presente ejemplo.

1.3 Segunda generación: barajado *in vivo* de ADN mutagenizado

Las mejores variantes de la primera generación (mutantes 11H10, 15G9, 4B5 y 4B1) se tomaron como parentales y fueron sometidos a un nuevo ciclo de evolución mediante PCR mutagénica con *Taq*/MnCl₂, para posteriormente recombinar estos productos mediante un barajado *in vivo*. Se exploraron 1740 clones. Cada uno de los parentales fue amplificado mediante PCR propensa a error con dNTPs equilibrados y una concentración de MnCl₂ de 0,01 mM tal y como se detalla en la **Tabla 6**. Los productos mutagenizados por PCR se mezclaron en la misma proporción (800 ng totales, 200 ng de cada producto) y se transformaron conjuntamente con el vector linealizado (relación

vector:producto PCR 1:4). El *screening* de punto final se desarrolló como se describe en el apartado 2 del presente ejemplo.

1.4 Tercera generación: barajado *in vivo* de ADN mutagenizado

5

Las mejores variantes de la segunda generación (mutantes 16E12, 19C2, 20D1 y 13G1) se tomaron como parentales y fueron sometidos a un nuevo ciclo de evolución mediante PCR mutagénica con *Taq*/MnCl₂, para posteriormente recombinar estos productos mediante un barajado *in vivo*. Se exploraron 1131 clones. Cada uno de los parentales fue amplificado mediante PCR propensa a error con dNTPs equilibrados y una concentración de MnCl₂ de 0,01 mM, como se detalla en la **Tabla 6**. Los productos mutagenizados por PCR se mezclaron en la misma proporción (400 ng totales, 100 ng de cada producto) y se transformaron conjuntamente con el vector linearizado (relación vector:producto PCR 1:4). El *screening* se desarrolló como se describe en el apartado 2 del presente ejemplo. En esta generación en particular, el *screening* pudo llevarse a cabo en modo cinético debido a la mejora de actividad tras tres ciclos evolutivos.

20 1.5 Cuarta generación: StEP mutagénico + barajado *in vivo*

Las mejores variantes de la tercera generación (mutantes 10C3, 6B1, 13E4, 6E7 y 11F3) se tomaron como parentales y fueron sometidos a un nuevo ciclo de evolución mediante StEP mutagénico. Las condiciones mutagénicas vienen determinadas por la baja concentración de DNA molde -0,1 ng/μL- en combinación con la utilización de una polimerasa de baja fidelidad (*Taq* polimerasa) y el protocolo de amplificación en el termociclador con ciclos cortos de anillamiento y extensión. La concentración de cada uno de los reactivos, en un volumen final de 50 μL, fue la siguiente: 90 nM de oligonucleótido RMLN, 90 nM de oligonucleótido RMLC, 0,3 mM dNTPs, 3 % (v/v) DMSO, 0,05 U/μL de *Taq* polimerasa -Sigma-, MgCl₂ 1,5 mM y 0,1 ng/μL de mezcla equimolar 10C3, 6B1, 13E4, 6E7 y 11F3. Los parámetros de la reacción de amplificación fueron

los siguientes: 95 °C durante 5 min (1 ciclo); 94 °C durante 30 s y 55 °C durante 20 s (90 ciclos). Con los productos de PCR se realizó un barajado *in vivo* a través de la mezcla del producto de PCR (800 ng) y el plásmido linearizado (200 ng); (relación vector:producto PCR 1:4). El *screening* se desarrolló como se describe en el apartado 2 del presente ejemplo incorporando el protocolo de exploración de termoestabilidad, evaluando la estabilidad a 60°C.

1.6 Quinta generación: IvAM

10

Se construyó una genoteca de 1392 clones a partir del ensamblaje *in vivo* de dos experimentos de PCR propenso a error con diferente predisposición mutacional (IvAM), usando como DNA molde el mejor mutante de termoestabilidad de la generación anterior (variante 24E10). La genoteca de Mutazima se preparó según el apartado 1.1.A). La genoteca Taq/MnCl₂ se preparó con dNTPs equilibrados y una concentración de MnCl₂ de 0,01 mM tal y como se detalla en la **Tabla 6**. Ambas genotecas se mezclaron en la misma proporción y se recombinaron *in vivo* tras la transformación en *S. cerevisiae* y reparación *in vivo* del vector pJRoc30 linearizado con los fragmentos mutagenizados. Se empleó una relación vector linearizado:genoteca mixta a partir de 100 ng de vector de 1:8. El *screening* se desarrolló como se describe en el apartado 2 del presente ejemplo incorporando el protocolo de exploración de termoestabilidad y aumentando la temperatura de incubación a 80°C.

25 1.7 Sexta generación: barajado *in vivo* de ADN mutagenizado

Las mejores variantes de la quinta generación (mutantes 3H9 y 15B4) se tomaron como parentales y fueron sometidos a un nuevo ciclo de evolución mediante PCR mutagénica con Taq/MnCl₂, para posteriormente recombinar estos productos mediante un barajado *in vivo*: Se exploraron 1219 clones. Cada uno de los parentales fue amplificado mediante PCR propensa a error con dNTPs equilibrados y una concentración de MnCl₂ de 0,01 mM tal y como

30

se detalla en la **Tabla 6**. Los productos mutagenizados por PCR se mezclaron en la misma proporción (800 ng totales, 200 ng de cada producto) y se transformaron conjuntamente con el vector linearizado (relación vector:producto PCR 1:4). El *screening* se desarrolló como se describe en el apartado 2 del presente ejemplo incorporando el protocolo de exploración de termoestabilidad y aumentando la temperatura de incubación a 90°C.

Componente	TIPOS DE GENOTECAS <i>Taq</i> /MnCl ₂		
	dNTPs desequilibrados		dNTPs equilibrados
	Concentración de ADN alta	Concentración de ADN baja	
Oligonucleótidos (RMLN y RMLC)	90 nM	90 nM	90 nM
pJRoC30- α-VP	1,5 ng/μL	0,1 ng/μL	0,1 ng/μL
dNTPs	0,2 mM dATP; 0,2 mM dGTP 0,6 mM dCTP; 0,6 mM dTTP	0,04 mM dATP; 0,04 dGTP 0,1 mM dCTP; 0,1 mM dTTP	0,3 mM (0,075 mM de cada uno)
DMSO	3% (v/v)	3% (v/v)	3% (v/v)
MgCl₂	0,75 mg/mL	1,5 mg/mL	1,5 mg/mL
<i>Taq</i> polimerasa	0,05 U/μL	0,05 U/μL	0,05 U/μL
			0 / 0,002 mM /
	0 mM / 0,05 mM /	0 mM/ 0,05 mM/	0,005mM
MnCl₂¹	0,1 mM /	0,1 mM /	/0,01mM / 0,02
	0,2 mM	0,2 mM	mM / 0,05 mM /
			0,1 mM / 0,2 mM

Tabla 6. Ajuste de las condiciones de las genotecas *Taq*/MnCl₂ con las diferentes variables.

2. PROTOCOLO DE SCREENING DE ALTA CAPACIDAD

2.1 Transformación de células de *S. cerevisiae*

5 Los medios YPD y medio mínimo líquido, las placas SC y el medio de expresión se prepararon tal como se indica en Zumárraga *et al.* 2008 (*Proteins* 71: 250-260) con la salvedad de que en el medio de expresión se incluyó hemoglobina bovina (Sigma) en concentraciones finales de 100 mg/L para favorecer la incorporación del grupo hemo a la VP. Las genotecas de cada ciclo

10 evolutivo generadas mediante diferentes estrategias se transformaron en células de *S. cerevisiae* (*Yeast transformation Kit*, Sigma) para una expresión funcional de los correspondientes clones. Se incubaron colonias aisladas de células silvestres de *S. cerevisiae* en 20 mL de medio YPD líquido a 30 °C y 210 rpm en un agitador (Edmund Bühler GmbH SM-30, Alemania) durante toda

15 la noche ($DO_{600} > 2$). Una cantidad adecuada del cultivo se inoculó en un volumen total de 120 mL de YPD atemperado para alcanzar una DO_{600} de 0,3. Se incubó de nuevo durante 4-6 h, hasta completar dos ciclos de crecimiento y alcanzar una DO_{600} de 1,2. Las células se transformaron con las correspondientes genotecas en presencia del plásmido linearizado, con el kit

20 de transformación de levadura. Inmediatamente antes del choque térmico (42 °C durante 15 min), se añadió DMSO a la mezcla de transformación con una concentración final de 10% (v/v) para aumentar la eficiencia de transformación (aproximadamente 20000 clones por reacción de transformación).

25 2.2 Preparación de las librerías para el *screening* de alta capacidad

Las células de *S. cerevisiae* transformadas con la correspondiente genoteca y el vector pJRoC30 linearizado se sembraron en placas SC e incubaron a 30 °C. Trascurridos 3-4 días se picaron colonias individuales y se inocularon en

30 microplacas de 96 pocillos (Sero-well, Reino Unido) que contenían 50 µL de medio mínimo por pocillo. La columna completa número 6 de cada placa se inoculó con el tipo parental seleccionado del ciclo previo (columna de

referencia) y uno de los pocillos (H1) se inoculó con células de *S. cerevisiae* sin transformar (control negativo). Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 30 °C, 210 rpm y 80% de humedad relativa en un incubador con sistema de humidificación Minitron-INFORS (Biogen, España). Tras 48 h, se
5 añadieron 160 µL de medio de expresión a cada pocillo y se volvieron a incubar a 30 °C y 210 rpm. Después de 24 h, se midió la DO₆₀₀ para determinar la densidad celular de cada pocillo con un lector de microplacas SPECTRAMax Plus 384 (Molecular Devices, EEUU). Se centrifugaron las placas (placas maestras) durante 10 min a 3200 g y 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5810R
10 (Alemania). 20 µL del sobrenadante de cada pocillo fue transferido desde la placa maestra a una placa replica 1 mediante un robot manipulador de líquidos Quadra 96-320 (Tomtec, EEUU). En la placa réplica 1 se realizó el *screening* de actividad frente a ABTS. A partir de la tercera generación, y debido a la elevada actividad/nivel de secreción de la VP, a la placa réplica se la
15 adicionaron 180 µL de tampón tartrato sódico 10 mM (pH 5,1). De esta placa réplica se hizo una extracción de 20 µL a una placa réplica 2 sobre la que se aplicó el método colorimétrico. La finalidad de esta dilución es que permitiera cuantificar en modo de punto final.

De la 4^a a la 6^a generación se incluyó un protocolo de termoestabilidad (**Fig. 8**)
20 consistente en los pasos descritos a continuación. De la placa maestra se extrajeron 20 µL de sobrenadante sobre los que se adicionaron 180 µL de tampón tartrato sódico 10 mM (pH 5,1) (placa A). La placa A se duplicó mediante sendas extracciones de 50 y 20 µL para las placas B y C respectivamente. La placa B -placa especial de termociclador (Multiply PCR
25 Plate without skirt, neutral, Sarstedt)- se selló con film termorresistente (Film adhesivo PCR, Deltalab) y se incubó a la temperatura correspondiente en termociclador (MyCycler, Biorad, EEUU) durante 10 min (de manera que la actividad se redujera aprox. 2/3 de la actividad inicial). Tras la incubación, la placa B se incubó en hielo durante 10 min y se atemperó 5 min más a
30 temperatura ambiente. Se transfirieron 20 µL de la placa B a la placa D (placa de ensayo de actividad residual). Las placas C y D se emplearon para el ensayo de *screening* colorimétrico como se describe en el apartado 2.3.

2.3 Ensayos colorimétricos

El *screening* de actividad frente a ABTS se realizó añadiendo a la correspondiente placa réplica 180 μ L de tampón tartrato sódico 100 mM (pH 3,5) conteniendo ABTS 2 mM y H_2O_2 0,1 mM. Se agitaron las placas brevemente y se midió la absorbancia en el lector de placas a 418 nm. Las placas se incubaron a temperatura ambiente hasta que se desarrolló el color verde del radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$ y se midió nuevamente la absorbancia ($\epsilon_{418} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para las generaciones de estabilidad térmica, la medida de termoestabilidad vino dada por el cociente Actividad residual/Actividad inicial, relativos al correspondiente parental.

2.4 Re-screenings

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

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

Segundo re-screening: alícuotas de 100 μ L de los clones más activos del primer *re-screening* se crecieron en 3 mL de medio YPD a 30 °C y 210 rpm durante 24 h. Se extrajeron los plásmidos de estos cultivos (Zymoprep yeast plasmid miniprep kit, Zymo Research). Como el producto de las zymoprep no

era puro y la concentración del ADN extraído fue muy baja, se transformaron los plásmidos en células de *E. coli* supercompetentes XL2-blue según el protocolo correspondiente (Stratagene) y se seleccionaron en placas LB/amp. Colonias aisladas se inocularon en 5 mL de medio LB/amp y se crecieron durante toda la noche a 37 °C. Se extrajeron los plásmidos (NucleoSpin® Plasmid kit, Macherey-Nagel). Las células de *S. cerevisiae* se transformaron con los plásmidos de los mejores mutantes así como con el correspondiente tipo parental y el *screening* se llevó a cabo de la misma manera, con la salvedad de que cada valor de actividad procedió de la media de 5 microcultivos por clon.

Ejemplo 3: producción, purificación y caracterización bioquímica de los mutantes

3.1 Producción de VP en *S. cerevisiae*

Los clones de *S. cerevisiae* que contenían los genes de α -VP tanto del tipo nativo como de mutantes fueron cultivados en 3 mL de medio mínimo durante 48 h, a 30 °C y 250 rpm (Micromagmix shaker, Ovan). Una alícuota de este precultivo se inoculó para alcanzar una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0,25 en un volumen total de 50 mL de medio mínimo en un matraz de 500 mL con tapón poroso. Cuando se completaron dos ciclos de crecimiento (DO₆₀₀ = 1; 6-8 h de incubación), se añadieron 450 mL de medio de expresión conteniendo 100 mg/L de hemoglobina bovina y se incubó a 30 °C y 220 rpm en un matraz de 2 L de base ancha (20 cm Ø en la base). El cultivo se paró tras 48 horas cuando tanto el crecimiento celular como la actividad VP se estacionaron (DO₆₀₀ 28-32; actividad VP 0,2-3000 U/L, dependiendo de la variante).

3.2 Purificación de los mutantes

Las VP nativa y mutantes fueron purificadas con un equipo de cromatografía de proteínas FPLC (LC-500 CI, Amersham Bioscience) siguiendo el procedimiento siguiente:

- 5 1.- Las células del cultivo (apartado 3.1) se separaron por centrifugación a 4°C durante 15 min a 8000 g (centrífuga Beckman Coulter, Avanti J-E centrifuge). El sobrenadante se filtró dos veces con membranas de fibra de vidrio y nitrocelulosa con un poro de 0,45 µm.
- 10 2.- El extracto crudo se sometió a una precipitación fraccionada con sulfato amónico al 65 % de saturación (p/v) a 0°C. Tras equilibrar la muestra durante 15-30 min, se centrifugó 20 min a 18514 g a 3°C (centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania).
- 15 3.- Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 4 mL de tampón piperazina-Cl⁻ 20 mM (pH 5,5) conteniendo CaCl₂ 1 mM (Tampón A).
- 20 4.- La muestra se dializó frente a 1-3 L de tampón A durante toda la noche en tubos de diálisis (PlusOne Mini Diálisis, Amersham Pharmacia) con un corte molecular de 8 KDa.
- 25 5.- Se filtró el dializado con filtro de 0,45-0,22 µm de diámetro de poro y se cargó en una columna de intercambio aniónico HiTrapQFF (Amersham Bioscience) de 5 mL preequilibrada en tampón A. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 1 M NaCl (flujo 1 mL/min).
- 30 6.- Se seleccionaron las fracciones con mayor relación grupo hemo:actividad peroxidasa sobre ABTS (410 nm:418 nm), se juntaron y dializaron en tampón A como se indica en el paso 4.

7.- La muestra dializada se filtró y se cargo en una columna de intercambio aniónico MonoQ 5/5 HR (Amersham Bioscience) preequilibrada en buffer A. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 1 M NaCl, (flujo 0,4 mL/min).

- 5 8.- Se seleccionaron las fracciones con mayor relación grupo hemo:actividad peroxidasa sobre ABTS (410 nm:418 nm), se juntaron y dializaron en tampón A como se indica en el paso 4.

3.3 Caracterización bioquímica de los mutantes

10

A) Desglicosilación

Las proteínas purificadas se desglicosilaron con la péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F) (Sigma), que hidroliza los oligosacáridos unidos a los residuos de asparagina. Concretamente, 8 µg de VP pura se desnaturalizaron con SDS 0,2% (p/v) y β-mercaptoetanol 100 mM a 100 °C durante 10 min. Posteriormente se añadieron 2.5 unidades de PNGasa F y la mezcla de reacción se incubó toda la noche a 37 °C. La reacción se paró a 100 °C durante 10 min. Los productos se analizaron en un gel de electroforesis (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomasie.

15

20

B) Medida de la estabilidad térmica (T₅₀)

El estudio de termoestabilidad se realizó con ayuda del termociclador Mycycler equipado con un formador de gradientes (Bio-Rad, EEUU), el cual permite crear gradientes de temperatura a diferentes intervalos. Se prepararon diluciones de las proteínas en tampón tartrato 10 mM (pH 5,1) de tal manera que alícuotas de 20 µL dieran una respuesta adecuada para medir la actividad en el lector de microplacas en modo cinético. Se incubaron 50 µL de VP por cada punto del gradiente. El gradiente de temperatura estudiado comprendió el intervalo 30-80 °C con temperaturas intermedias de 30,0 °C, 31,7 °C, 34,8 °C, 39,3 °C, 45,3 °C, 49,9 °C, 53,0 °C, 55,0 °C, 56,8 °C, 59,9 °C, 64,3 °C, 70,3 °C,

25

30

75,0 °C, 78,1 °C y 80,0 °C. Tras 10 min de incubación las muestras se enfriaron en hielo durante 10 min. A continuación se extrajeron alícuotas de 20 µL de VP y se incubaron a temperatura ambiente 5 min más. Las muestras se mezclaron con 180 µL de ABTS 2 mM y H₂O₂ 0,1 mM en tampón tartrato 100 mM. La actividad se valoró en continuo (oxidación del ABTS a 418 nm). La medida de termoestabilidad vino determinada por el cociente entre actividad residual de las muestras incubadas a diferentes temperaturas en el termociclador con respecto a la actividad de la VP a temperatura ambiente.

10 C) Ensayos de actividad a diferentes valores de pH

Los perfiles de pH de la actividad de las diferentes VP purificadas se realizaron en tampón ByR 100 mM a diferentes valores de pH (2,0-9,0, ajustado con NaOH). Se prepararon diluciones de las enzimas en tampón tartrato sódico 10 mM (pH 5,0) conteniendo 1 mM CaCl₂ para que alícuotas de 10 µL dieran una respuesta adecuada en la medida de actividad en el lector de microplacas en modo cinético. Las VP (10 µL) se añadieron por filas y el tampón a diferentes valores de pH (180 µL) por columnas. Finalmente, se añadieron 10 µL solución ABTS/H₂O₂ (concentración en el ensayo 2 mM y 0,1 mM respectivamente) y se midieron las actividades de cada una de las condiciones por triplicado.

D) Determinación las actividades específicas

Las actividades específicas de la enzima nativa y de R4 se determinaron en un lector de microplacas SPECTRAMax Plus 384 (Molecular Devices, EEUU) con ancho de banda de 1 nm. Cada dato experimental se obtuvo a partir de la media de tres experimentos independientes. Se prepararon diluciones de las enzimas en tampón tartrato sódico 10 mM (pH 5,0) conteniendo 1 mM CaCl₂ para que alícuotas de 10 µL dieran una respuesta adecuada en la medida de actividad en el lector de microplacas en modo cinético (en un volumen final de ensayo de 200 µL). Se determinaron las actividades específicas de la enzima nativa y de R4 frente a los siguientes sustratos:

- 1) ABTS (Sigma) 2 mM en tampón tartrato sódico 100 mM (pH 3,5) (180 μ L) y 0,1 mM H_2O_2 (10 μ L) (concentraciones en el ensayo) a 418 nm ($\epsilon_{418} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- 5 2) Reactive Black 5 (Sigma) 15 μ M en tampón tartrato sódico 100 mM (pH 3,5) (180 μ L) y 0,1 mM H_2O_2 (10 μ L) (concentraciones en el ensayo) a 598 nm ($\epsilon_{598} = 50000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- 10 3) 2,6-Dimetoxifenol (DMP) (Fluka) 0,1mM en tampón tartrato sódico 100 mM (pH 3,5) (180 μ L) y 0,1 mM H_2O_2 (10 μ L) (concentraciones en el ensayo) a 469 nm ($\epsilon_{469} = 27500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- 15 4) Alcohol veratrílico (Sigma-Aldrich) 40 mM en tartrato sódico 100 mM (pH 3,0) (180 μ L) y 0,1 mM H_2O_2 (10 μ L) (concentraciones en el ensayo) a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- 5) MnSO_4 (Sigma) 2 mM en tartrato sódico 100 mM (pH 5.0) (180 μ L) y 0,1 mM H_2O_2 (10 μ L) (concentraciones en el ensayo) a 238 nm ($\epsilon_{238} = 6500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido con actividad peroxidasa caracterizado porque su secuencia aminoacídica presenta una identidad de al menos un 50% con la SEQ ID NO: 35, y porque presenta al menos una de las mutaciones que se selecciona de la lista que comprende:
 - 10 a. la sustitución del aminoácido ácido glutámico (E) por el aminoácido lisina (K), en la posición homóloga a la posición 128 de la SEQ ID NO: 35,
 - b. la sustitución del aminoácido histidina (H) por el aminoácido arginina (R), en la posición homóloga a la posición 130 de la SEQ ID NO: 35,
 - 15 c. la sustitución del aminoácido valina (V) por el aminoácido alanina (A), en la posición homóloga a la posición 251 de la SEQ ID NO: 35,
 - d. la sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido metionina (M), en la posición homóloga a la posición 275 de la
20 SEQ ID NO: 35,
 - e. la sustitución del aminoácido glutamina (Q) por el aminoácido leucina (L), en la posición homóloga a la posición 293 de la SEQ ID NO: 35,
 - f. la sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) por el
25 aminoácido alanina (A), en la posición homóloga a la posición 304 de la SEQ ID NO: 35,
 - g. la sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido isoleucina (I), en la posición homóloga a la posición 375 de la SEQ ID NO: 35,
 - 30 h. la sustitución del aminoácido alanina (A) por el aminoácido treonina (T), en la posición homóloga a la posición 399 de la SEQ ID NO: 35,

- i. la sustitución del aminoácido ácido glutámico (G) por el aminoácido arginina (R), en la posición homóloga a la posición 421 de la SEQ ID NO: 35,

5

2. Polinucleótido aislado según la reivindicación 1, que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 33.
3. Polinucleótido aislado según la reivindicación 1 que se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 34 y la SEQ ID NO: 36.
4. Construcción genética de ADN o ARN, que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:
- a. un polinucleótido según la reivindicación 1,
- b. un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica se selecciona de la lista que comprende la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 35,

- c. una molécula de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a) ó (b), ó
- d. una secuencia de nucleótidos de (a), (b), ó (c) correspondiente a un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
5. Construcción genética de ADN o ARN según la reivindicación anterior, donde el polinucleótido aislado de (a) se selecciona de la lista que comprende: la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 34 y la SEQ ID NO: 38.
 6. Construcción genética de ADN o ARN según la reivindicación 4, donde el polinucleótido aislado de (a) codifica el polipéptido cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 35.
 7. Construcción genética de ADN o ARN según la reivindicación 5, donde la secuencia nucleotídica del polinucleótido de (a) consiste en la SEQ ID NO: 38.
 8. Célula que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 4-7.
 9. Célula según la reivindicación anterior que puede clasificarse taxonómicamente como perteneciente al género *Saccharomyces*.

10. Uso de los polinucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, de la construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, o de una célula según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, para producir peroxidasas versátiles.
- 5
11. Método para generar peroxidasas versátiles (VP) extracelulares, funcionales y solubles con actividad mejorada hacia uno o más sustratos y/o termoestabilidad mejorada, que comprende:
- 10
- a. diseñar una construcción genética que comprenda el polinucleótido aislado que codifica el polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 39 o cualquiera de sus variantes,
 - b. generar diversidad sobre la construcción genética de (a) y crear las librerías de mutantes, y
 - c. seleccionar los mejores mutantes de expresión, actividad y/o
- 15
- termoestabilidad.
12. Método según la reivindicación 11, donde el polinucleótido aislado que codifica el polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 39, o cualquiera de sus variantes, del paso (a) se encuentra operativamente
- 20
- enlazado a otra secuencia nucleotídica que dirija la secreción y/o facilite el correcto procesamiento de la enzima peroxidada versátil.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, donde el polinucleótido aislado que codifica el polipéptido con la secuencia
- 25
- aminoacídica SEQ ID NO: 39 o cualquiera de sus variantes, del paso (a) se encuentra operativamente enlazado al polinucleótido aislado que codifica el polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 37 o cualquiera de sus variantes.
- 30
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, que además comprende la identificación y el mapeo de las mutaciones introducidas en las variantes seleccionadas.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, donde la construcción genética del paso (a) comprende el polinucleótido aislado cuya secuencia nucleotídica consiste en la SEQ ID NO: 40, operativamente enlazado con el polinucleótido aislado cuya secuencia nucleotídica consiste en la SEQ ID NO: 41.

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11-15, que además comprende repetir los pasos (a)-(c), empleando en la construcción genética según (a) los polinucleótidos que codifican para los mejores mutantes de expresión, actividad y/o termoestabilidad obtenidos en el paso (c), de manera consecutiva.

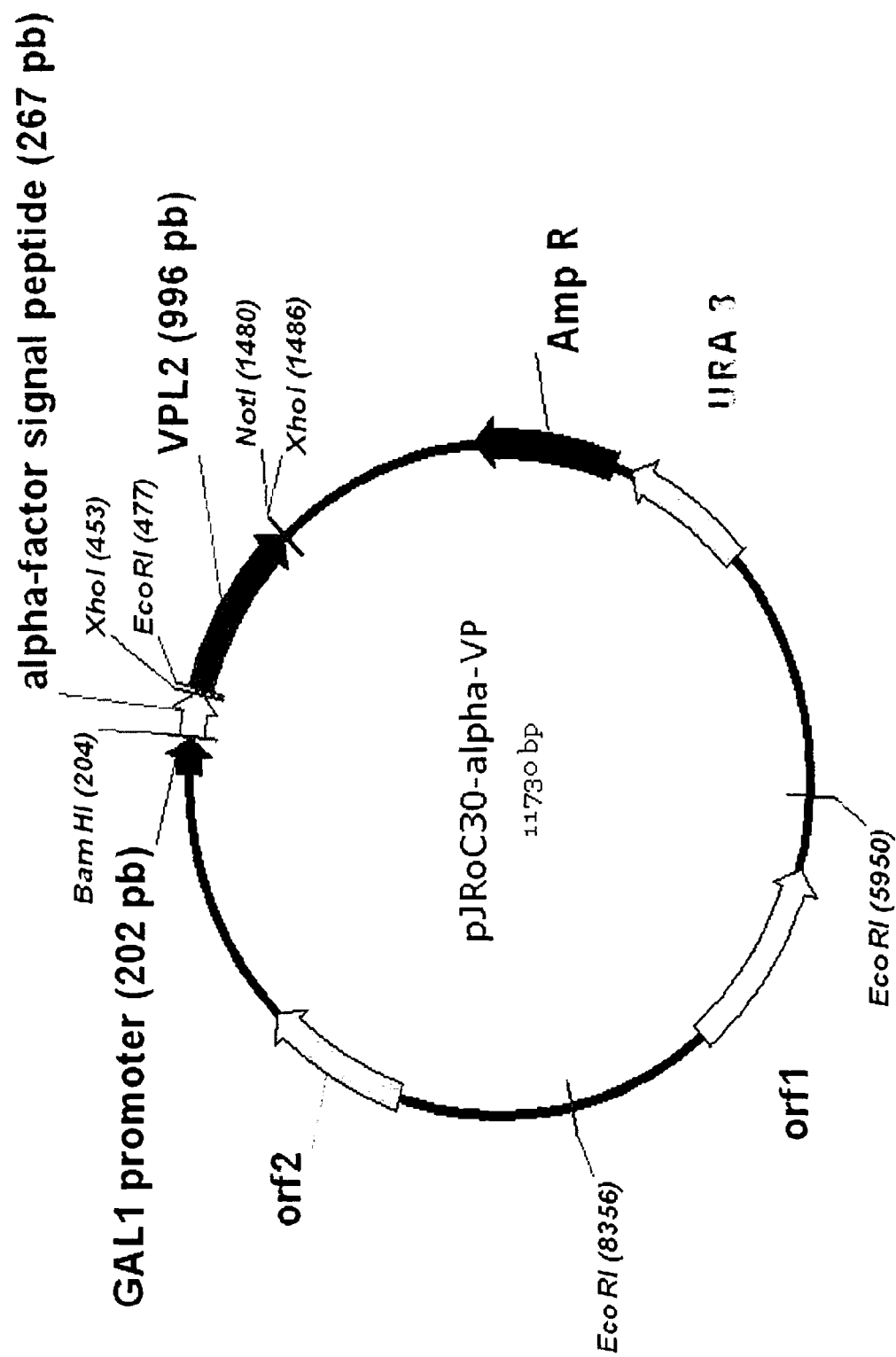


FIG. 1

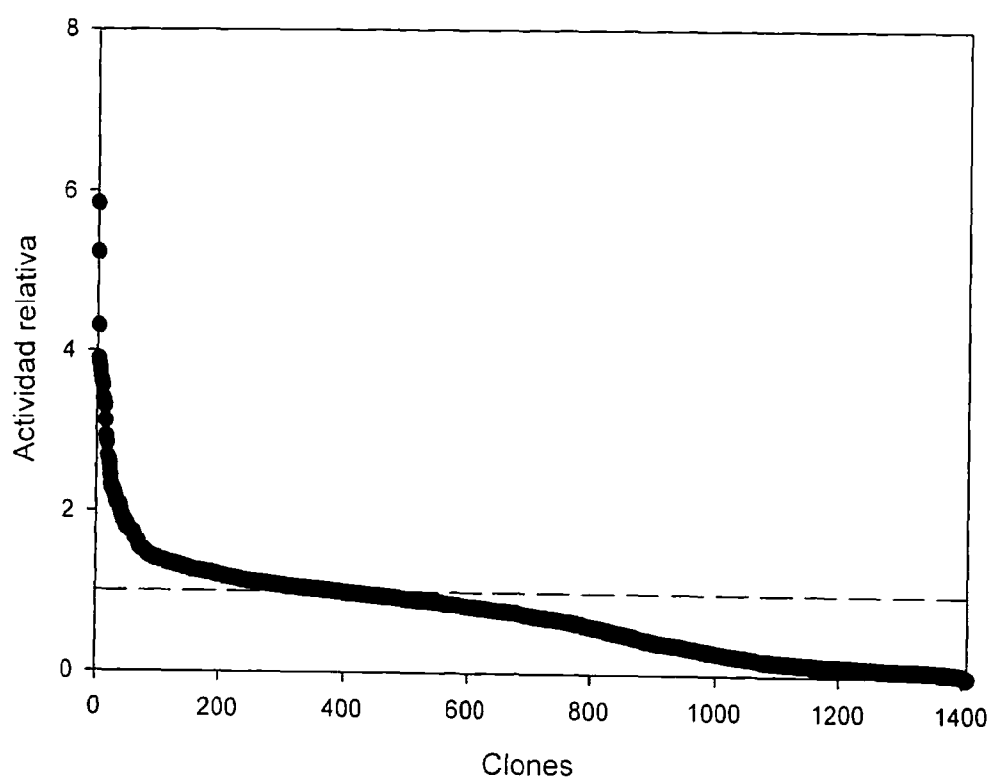


FIG. 2

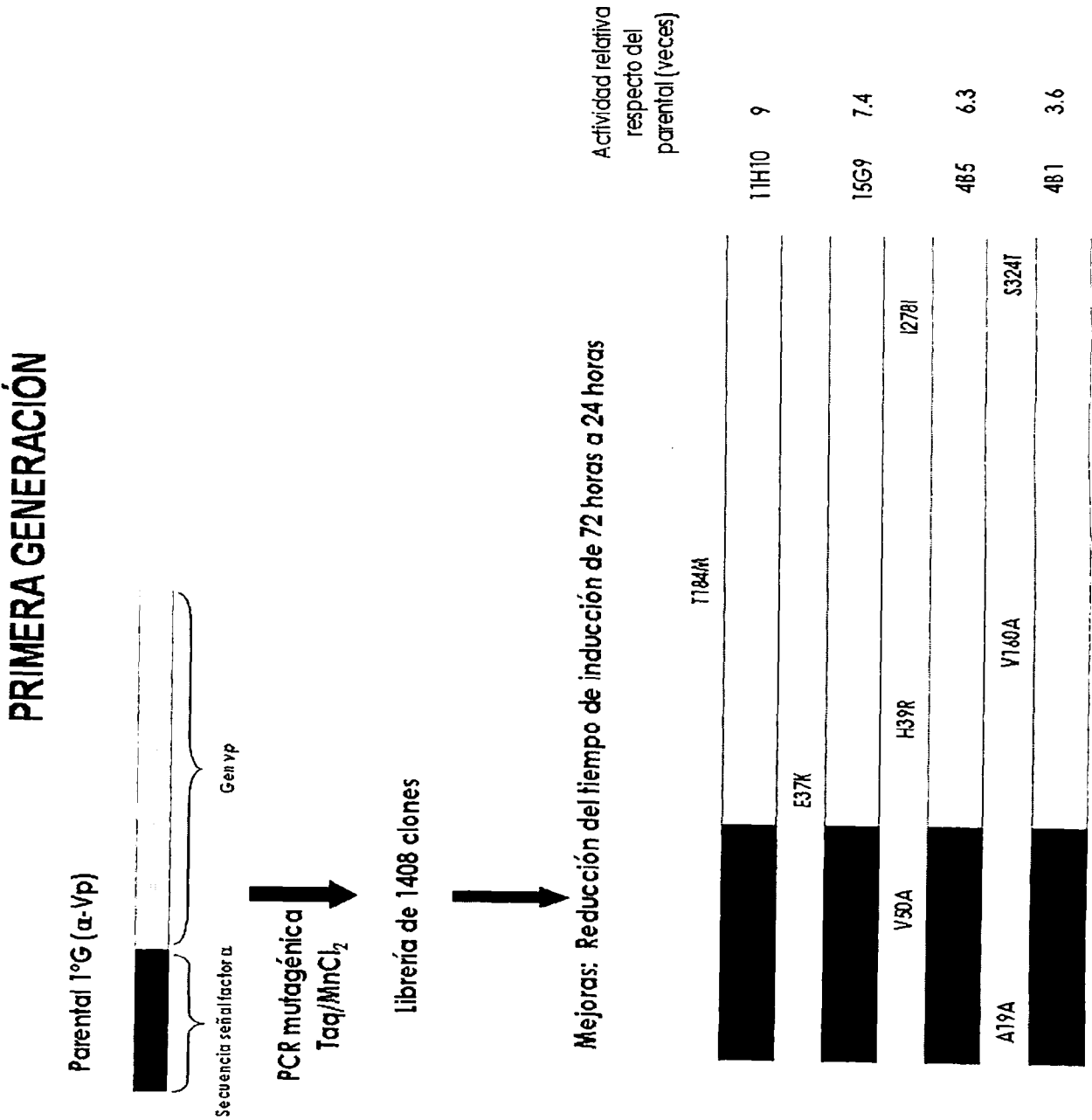
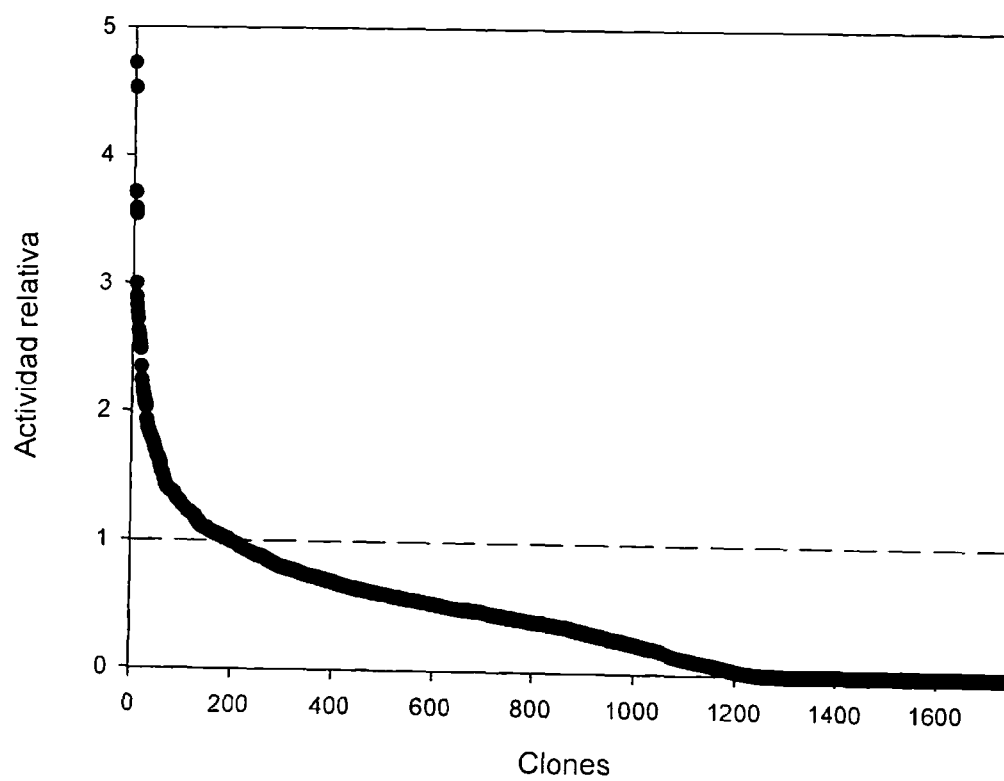


FIG. 3

**FIG. 4**

SEGUNDA GENERACIÓN

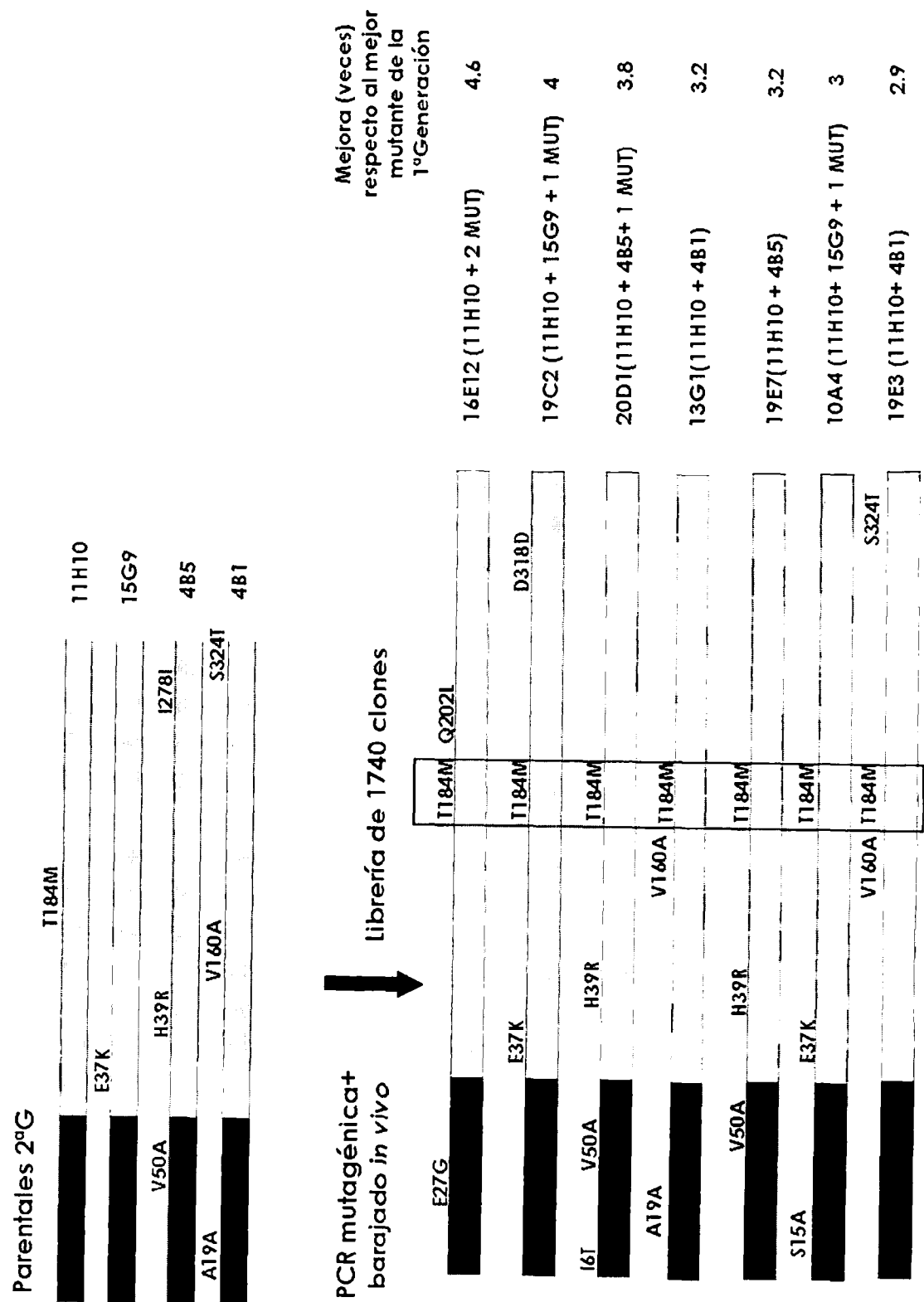


FIG. 5

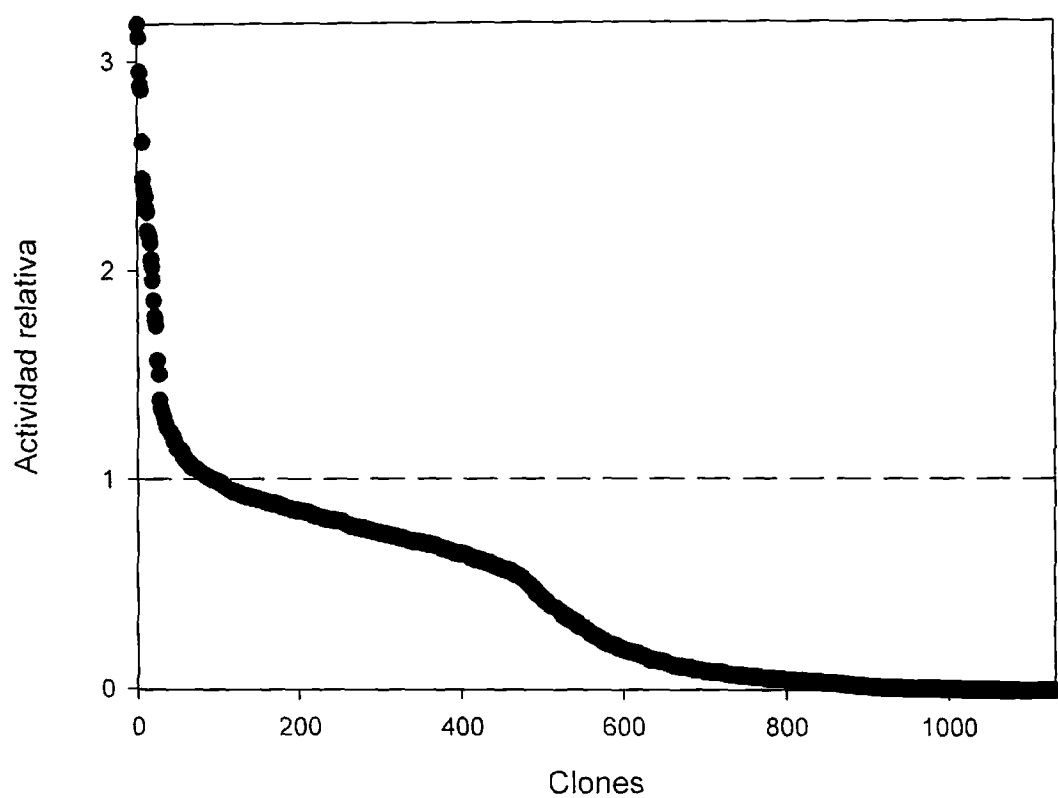


FIG. 6

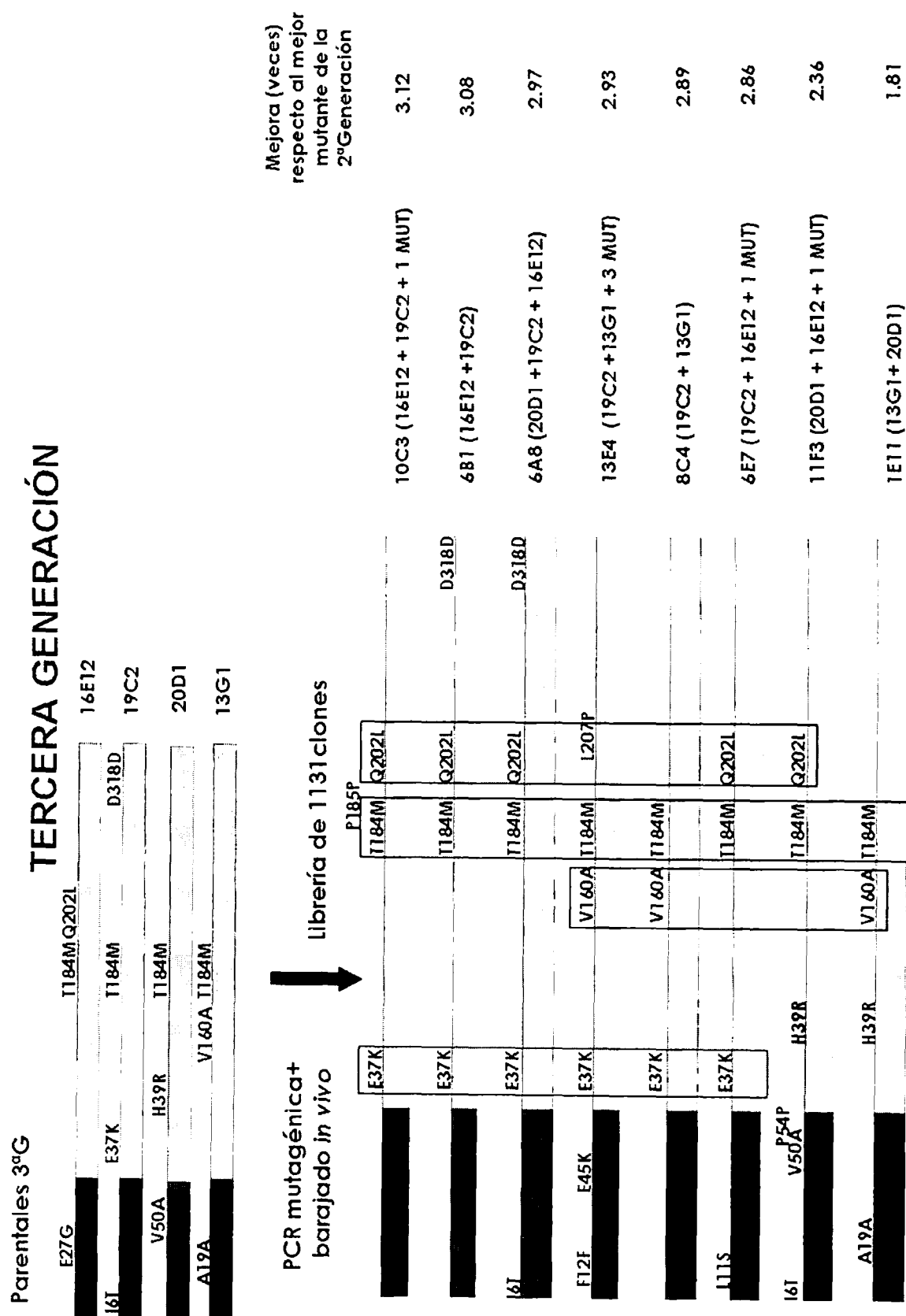


FIG. 7

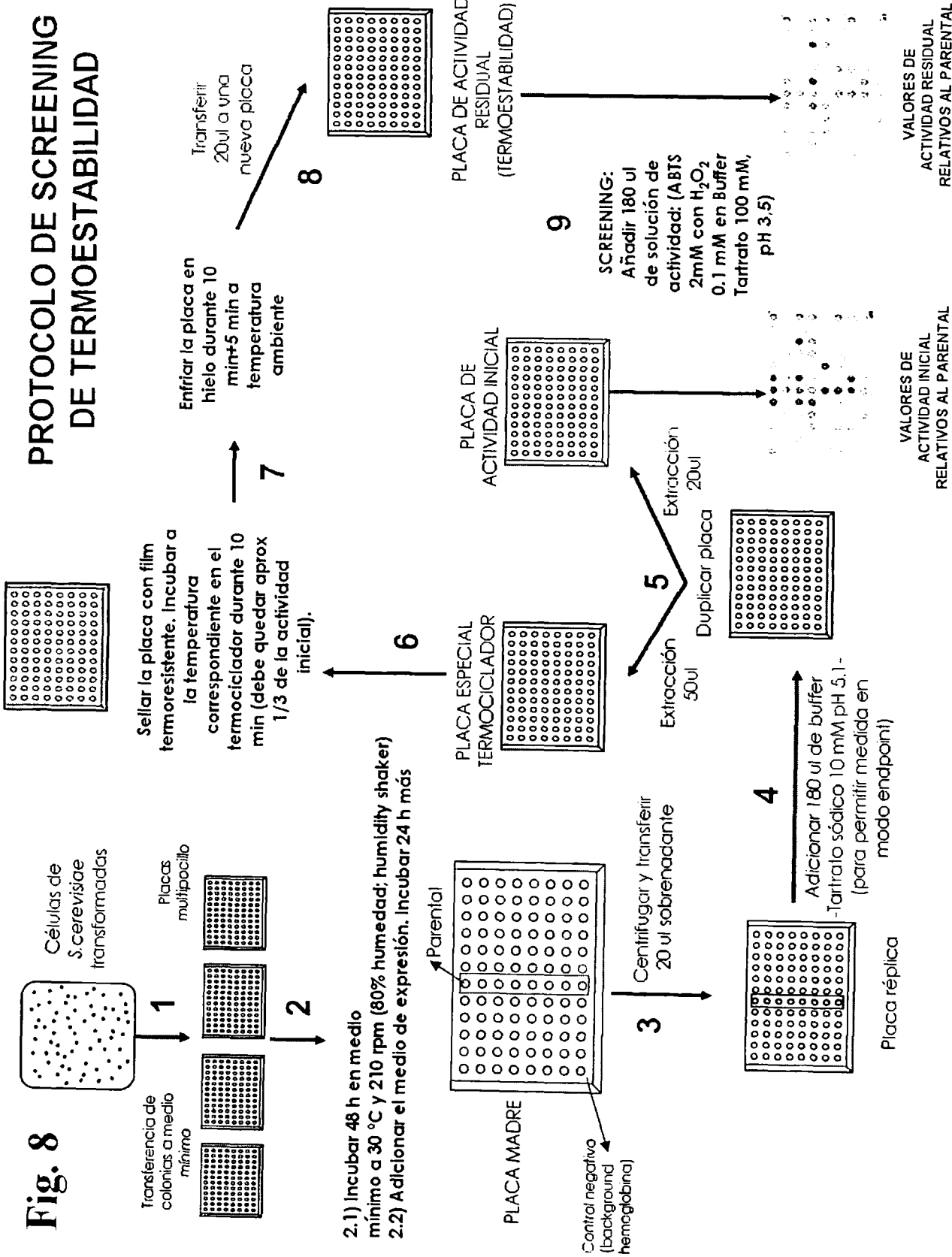
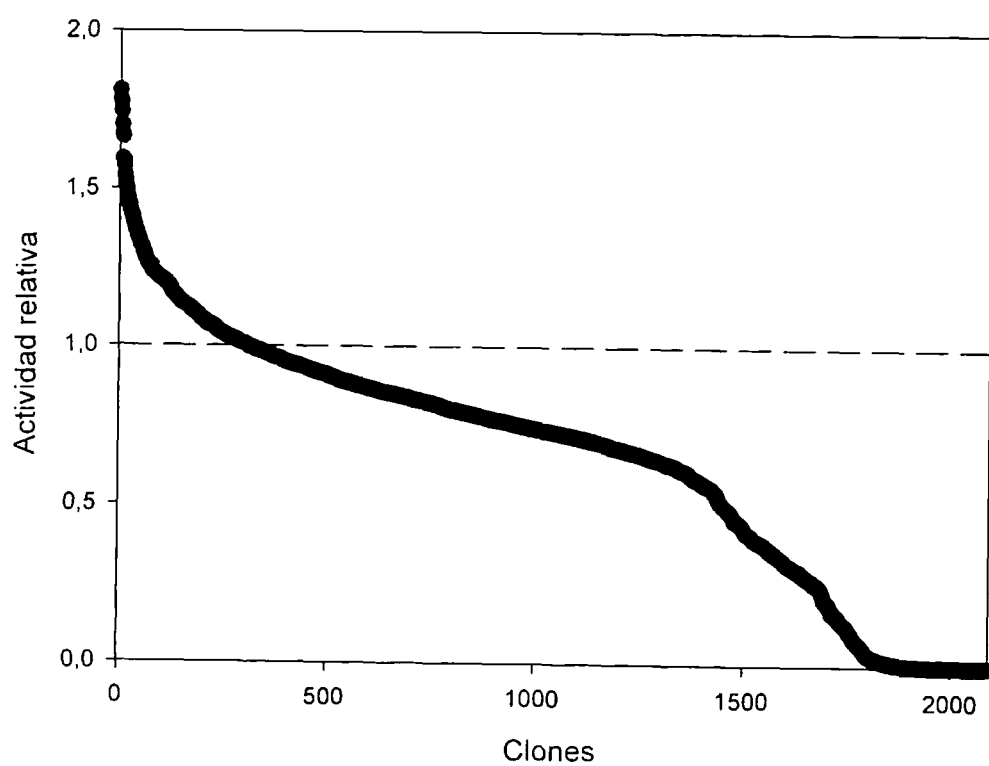
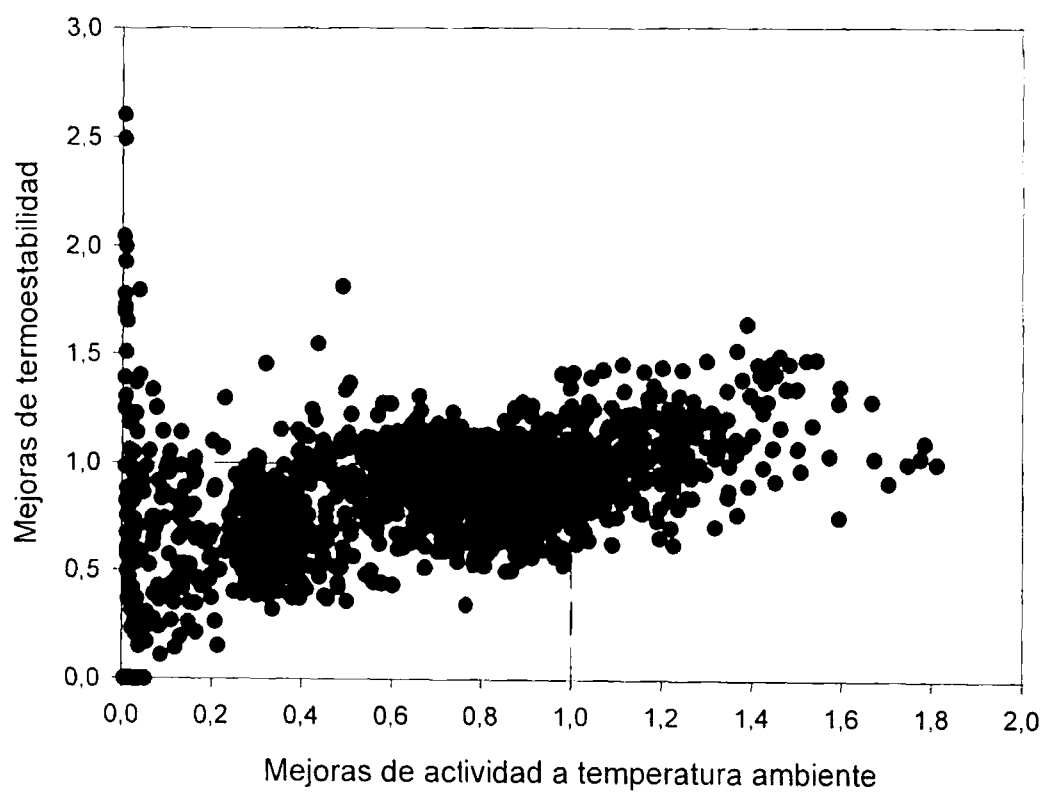


FIG. 8

9/20

**FIG. 9**

10/20

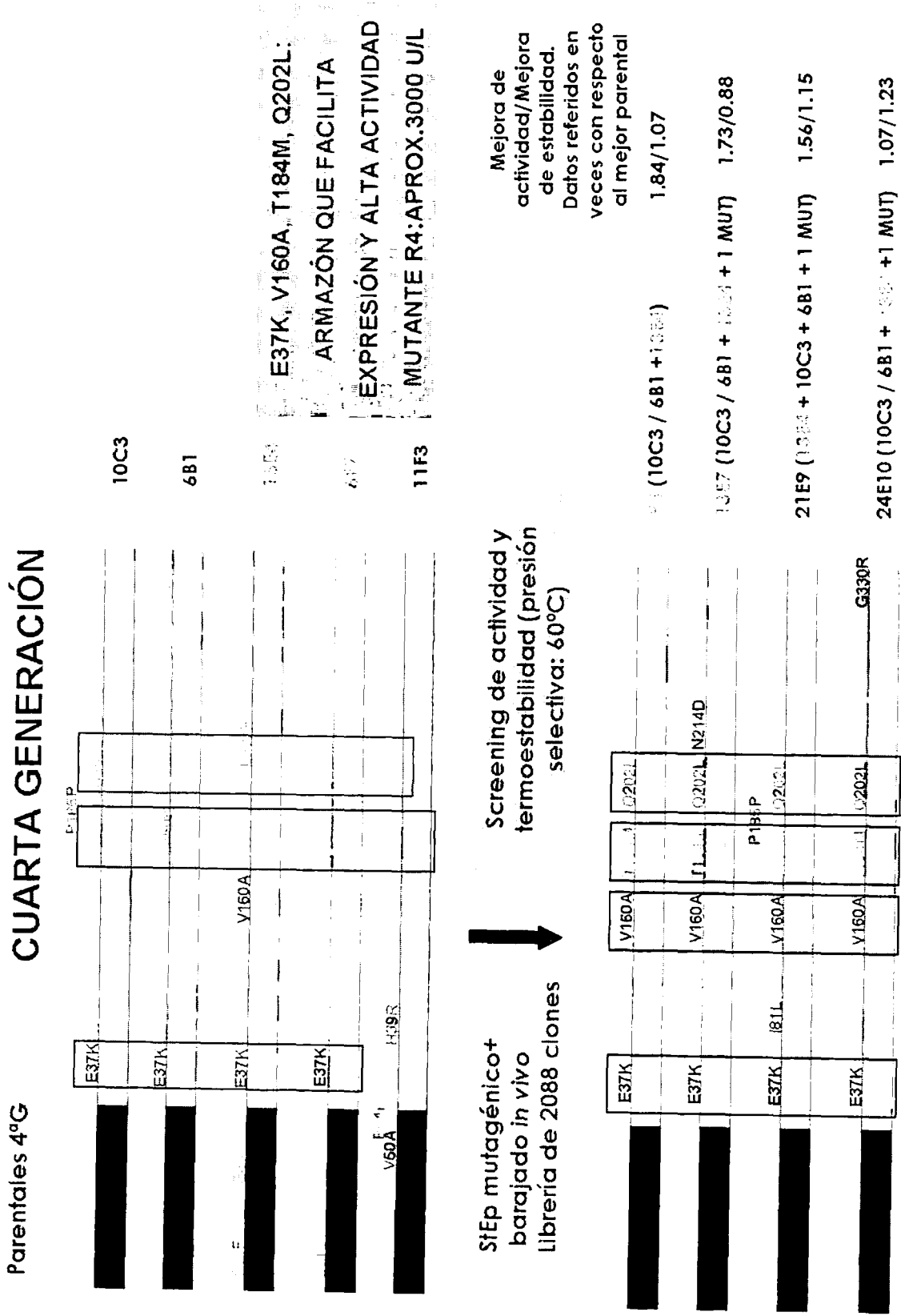


FIG. 10

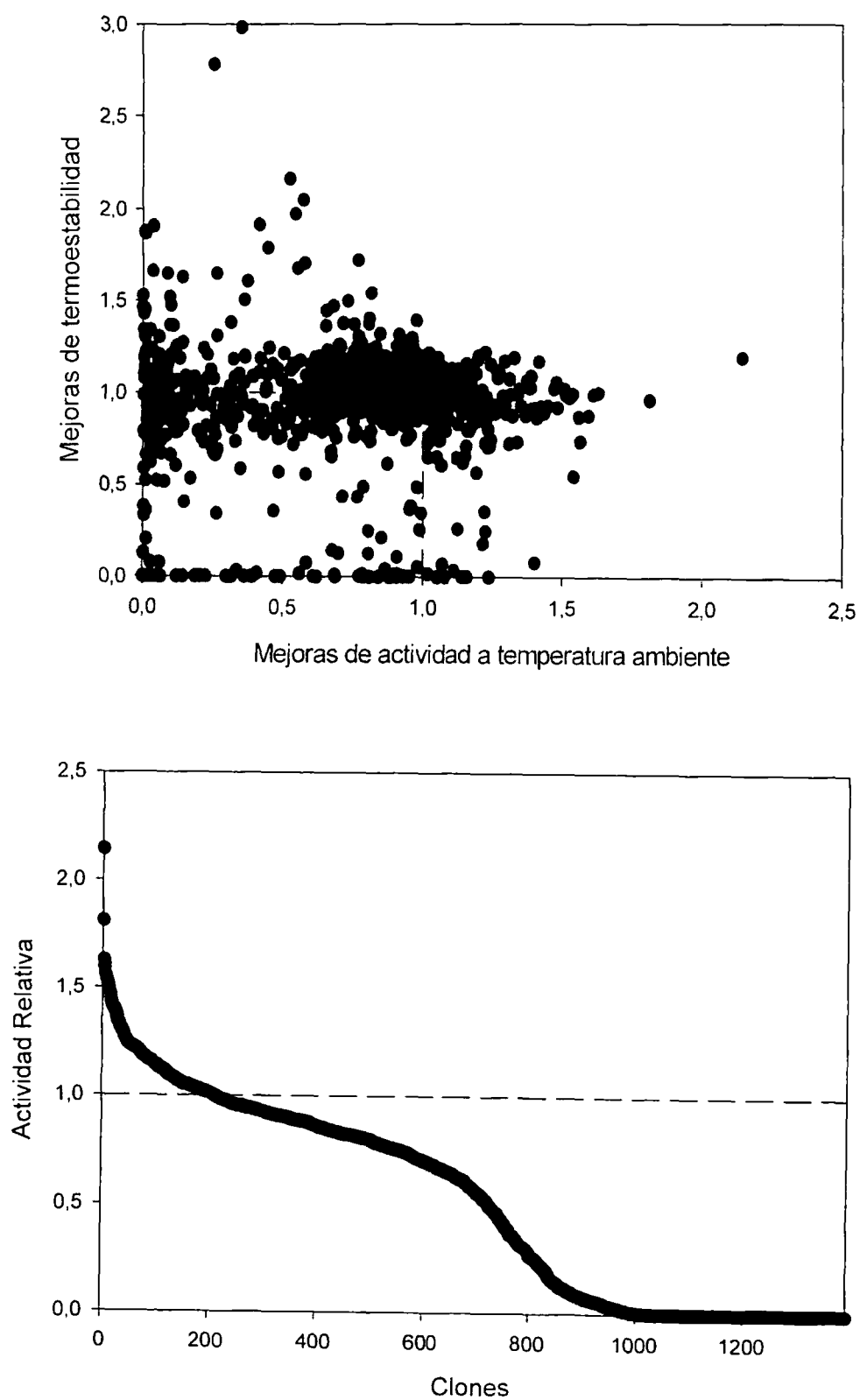


FIG. 11

QUINTA GENERACIÓN

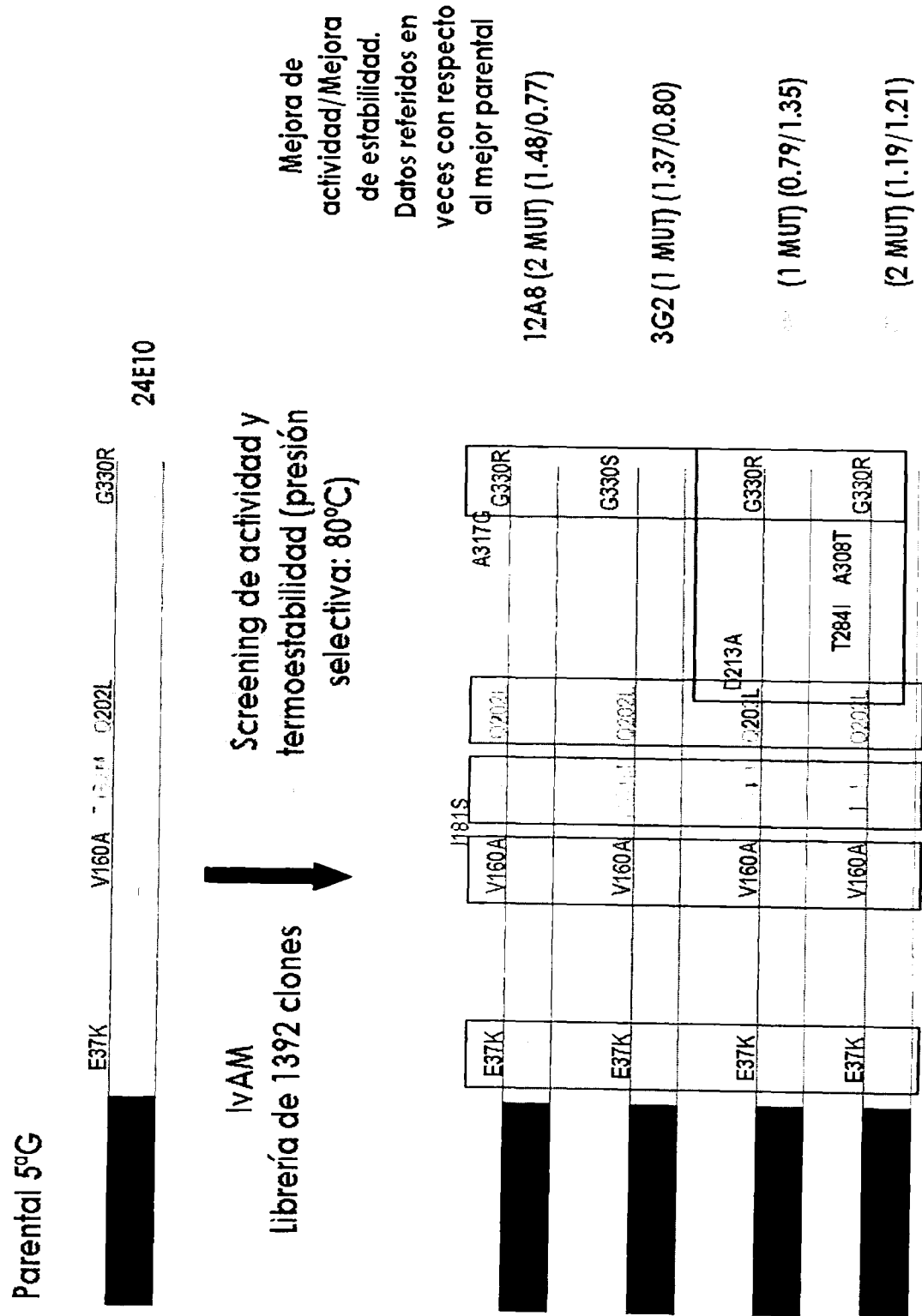


FIG. 12

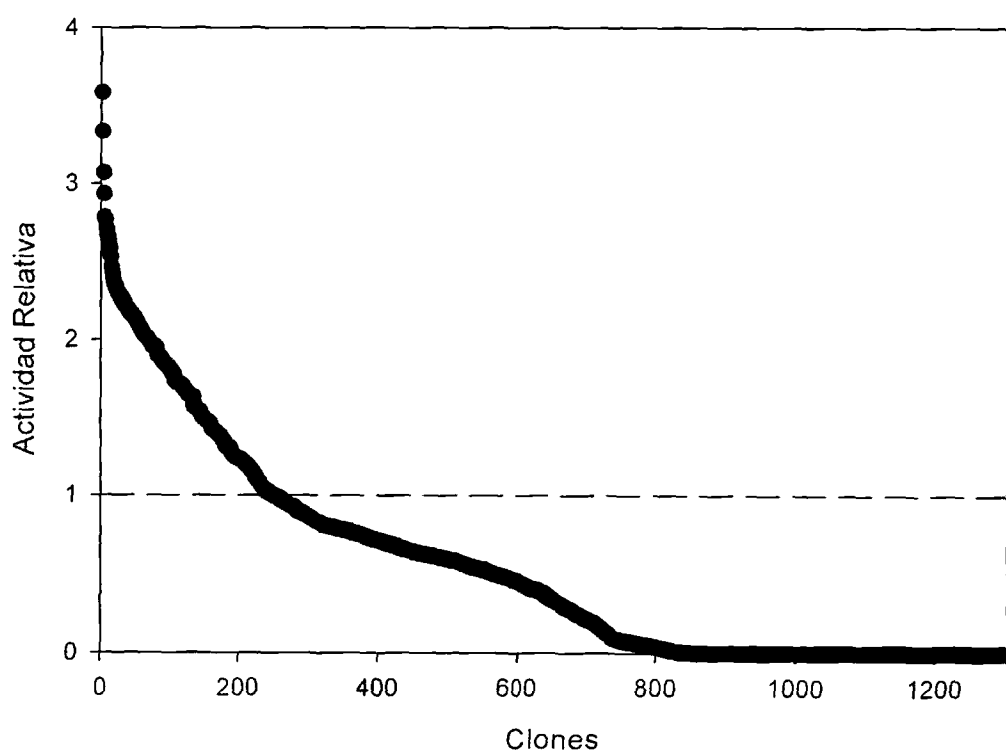
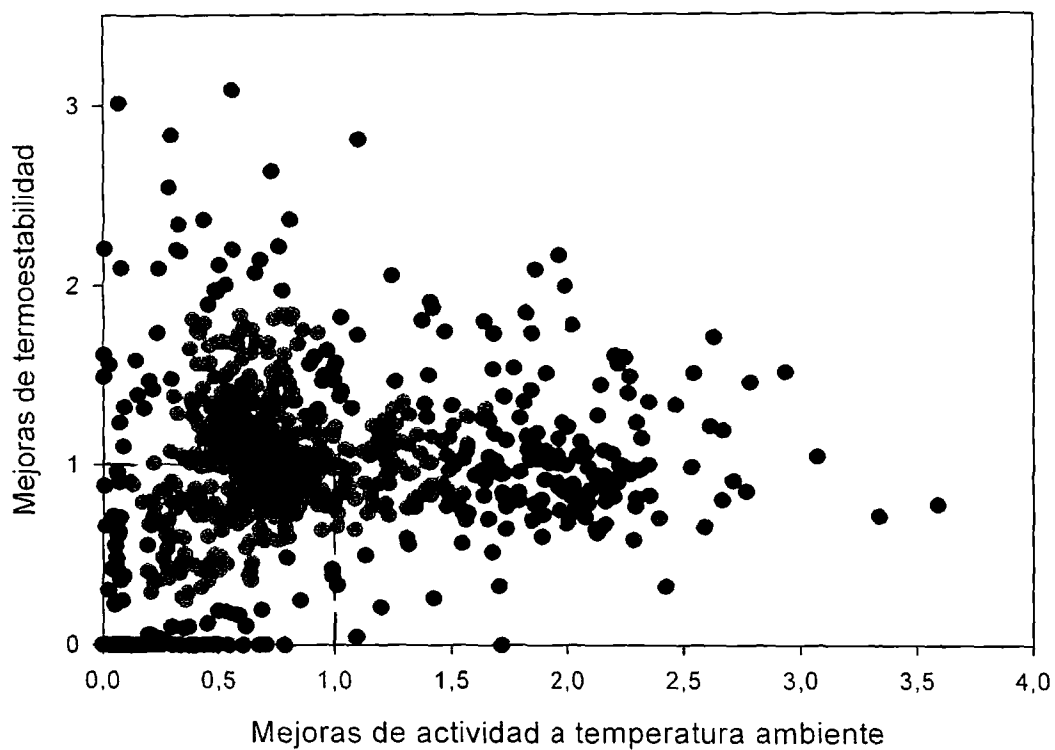


FIG. 13

SEXTA GENERACIÓN

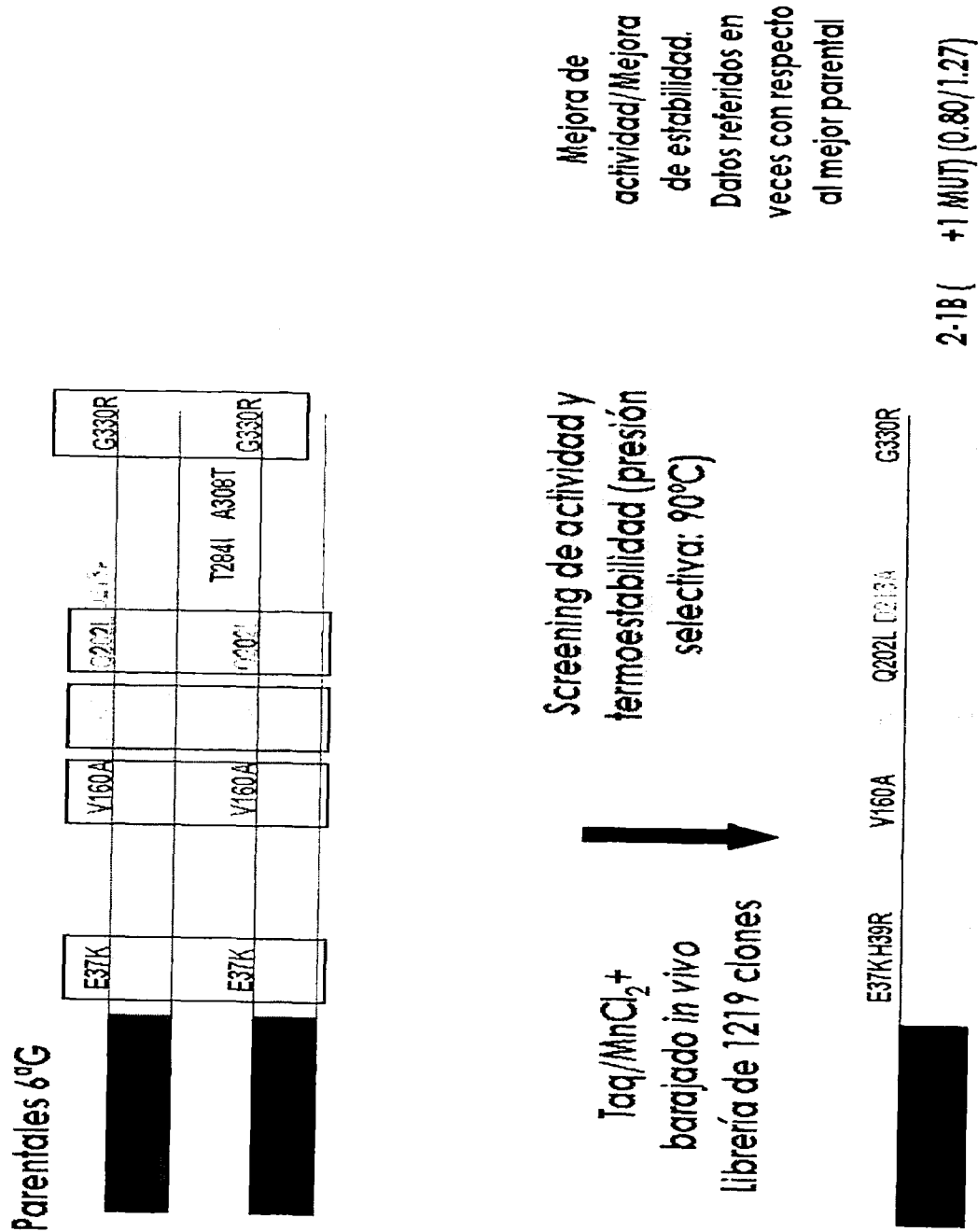


FIG. 14

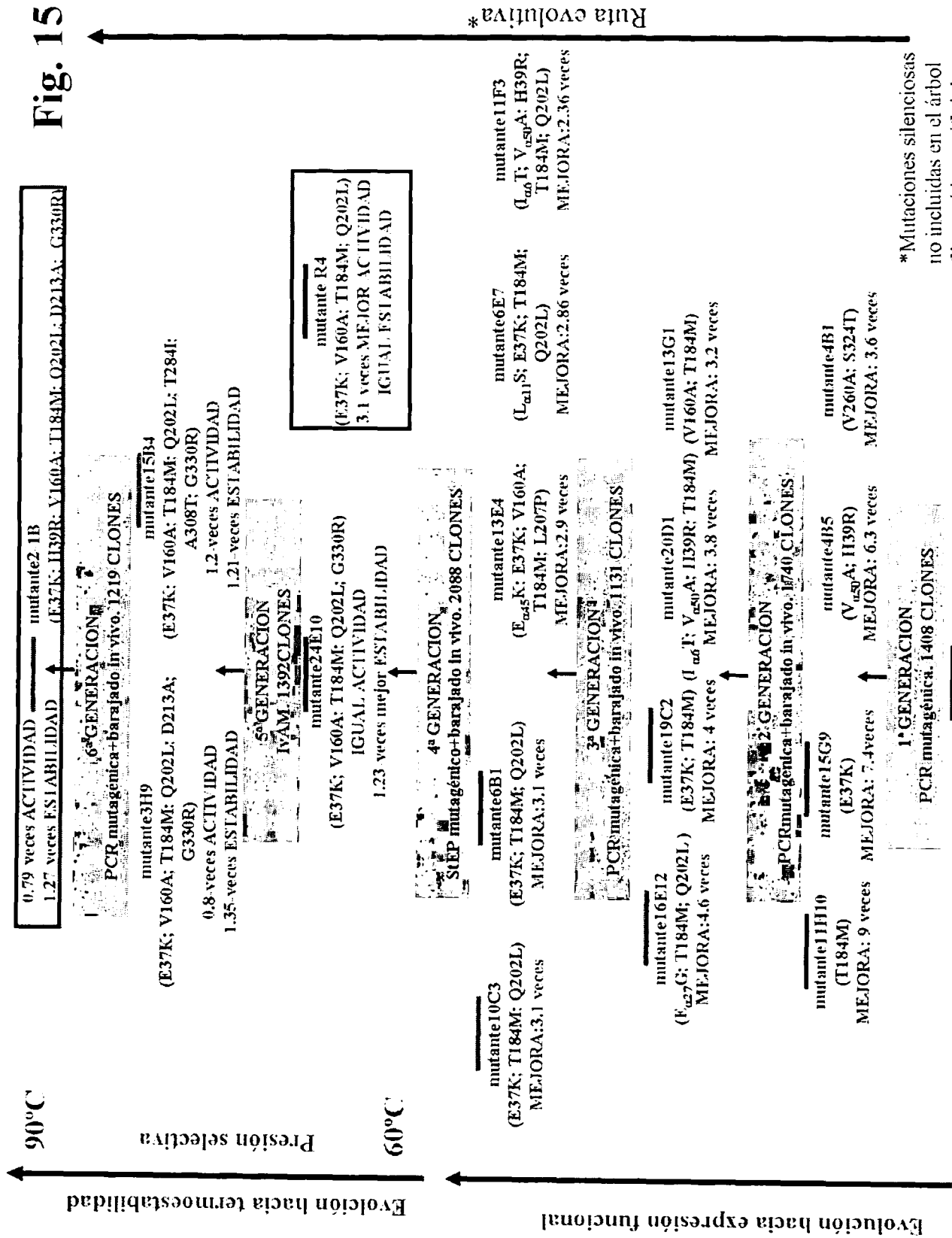


FIG. 15



FIG. 16

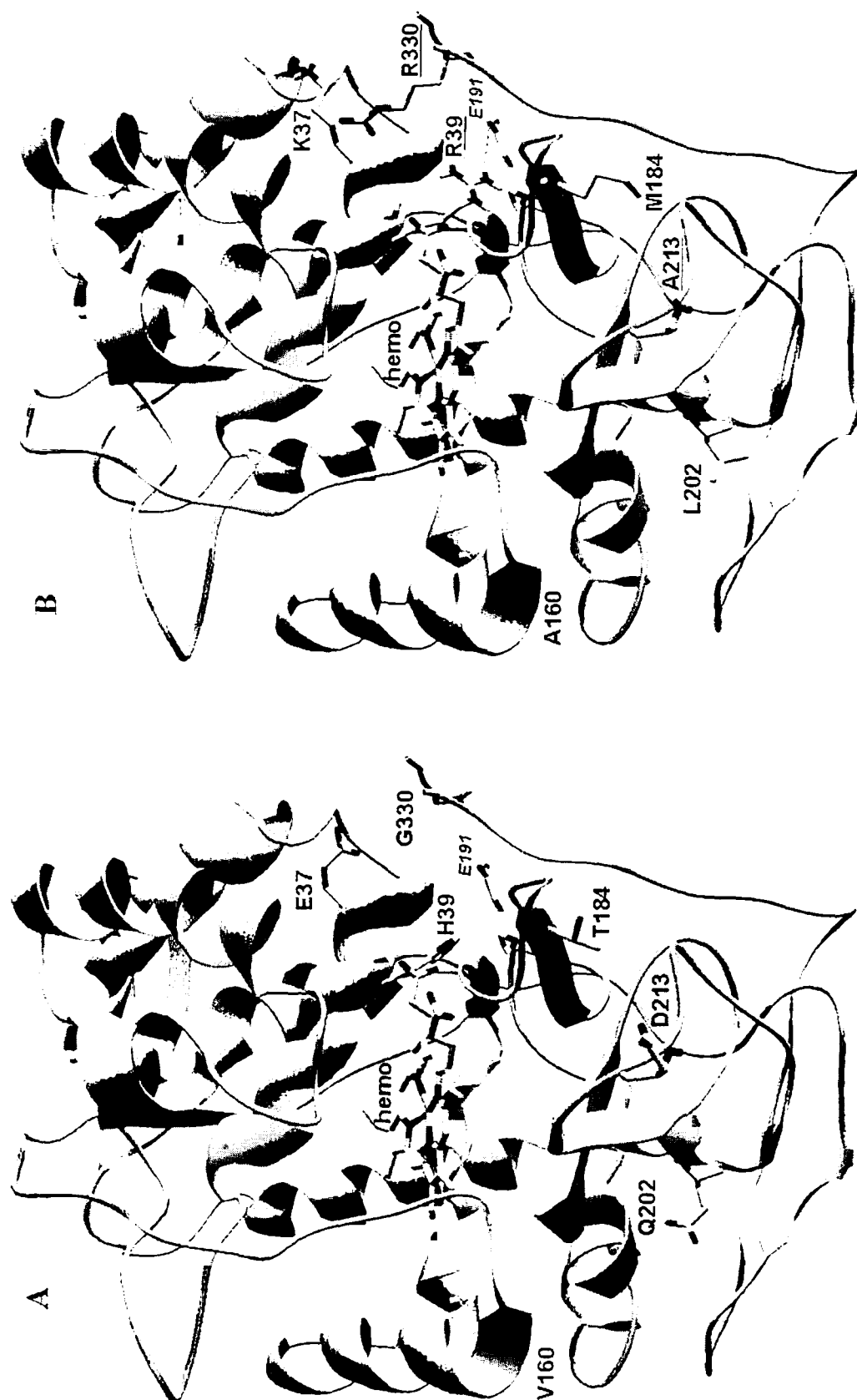


FIG. 17

Gradiente de Temperatura 30-70°C

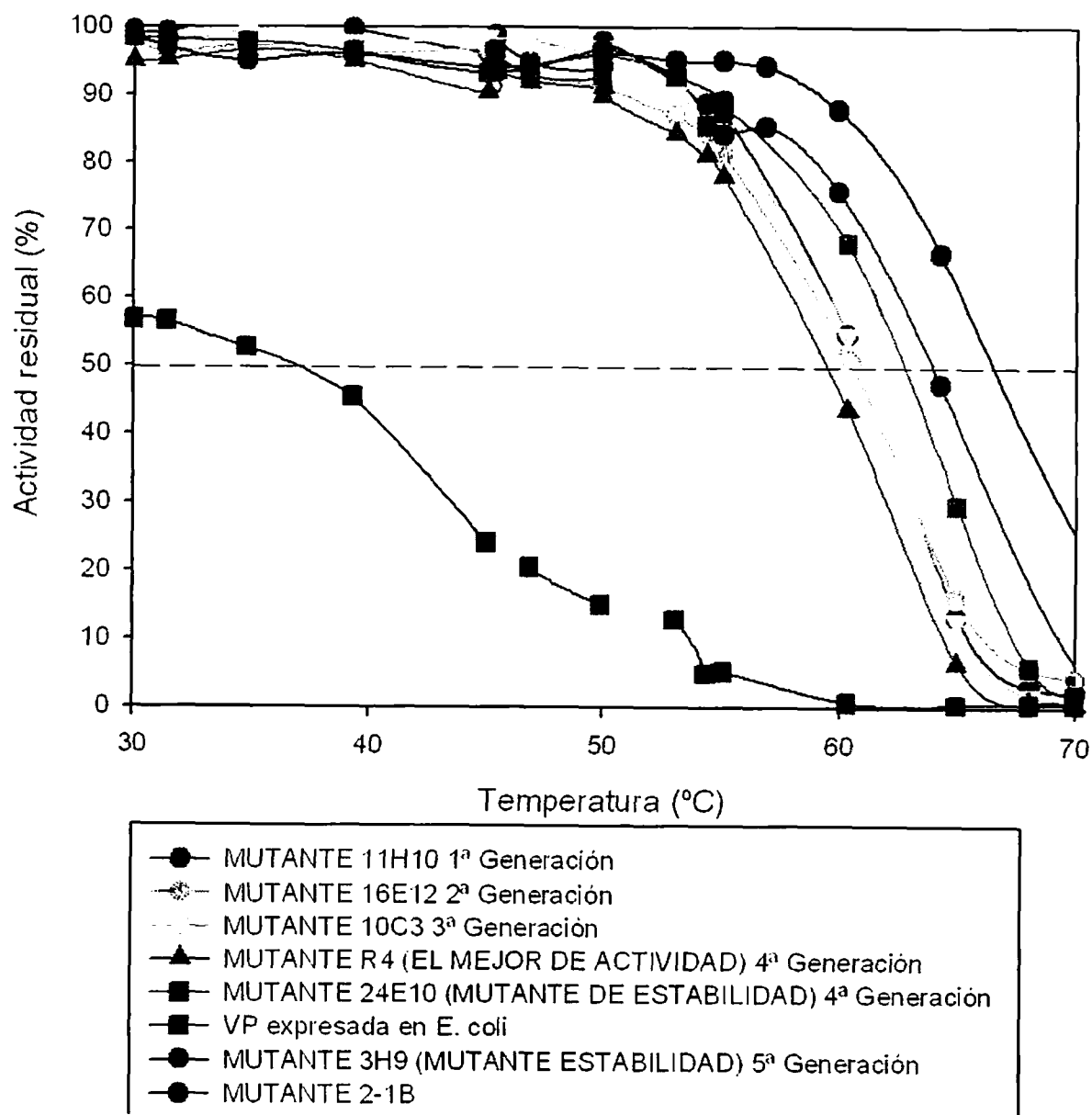


FIG. 18

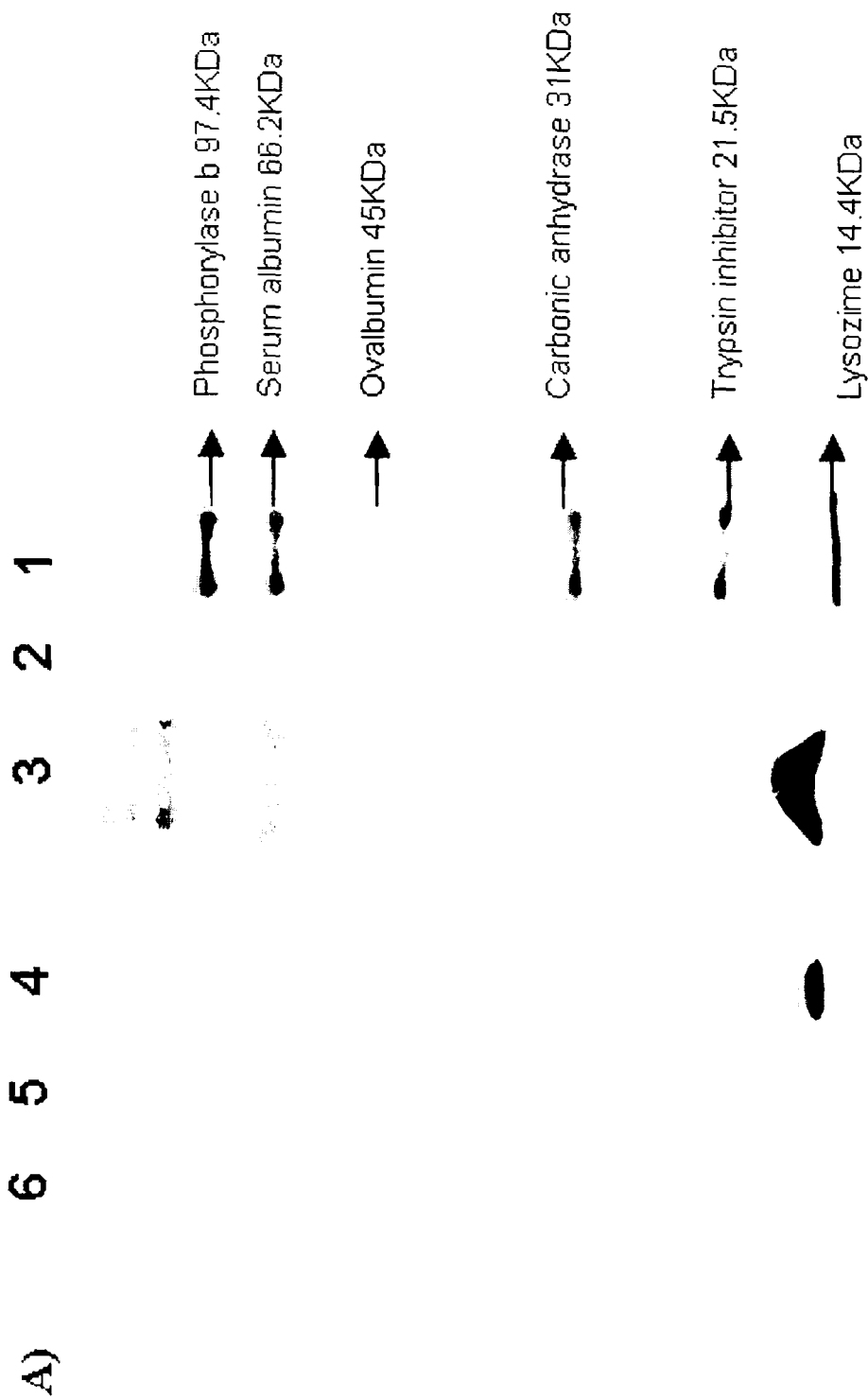


FIG. 19A

Perfil de actividad a diferentes pHs de R4 expresada en *S.cerevisiae* y de VP nativa expresada por *E.coli* (ausencia de CaCl_2)

Perfil de actividad a diferentes pHs de R4 expresada en *S.cerevisiae* y de VP nativa expresada por *E.coli* (en presencia de 1mM CaCl_2)

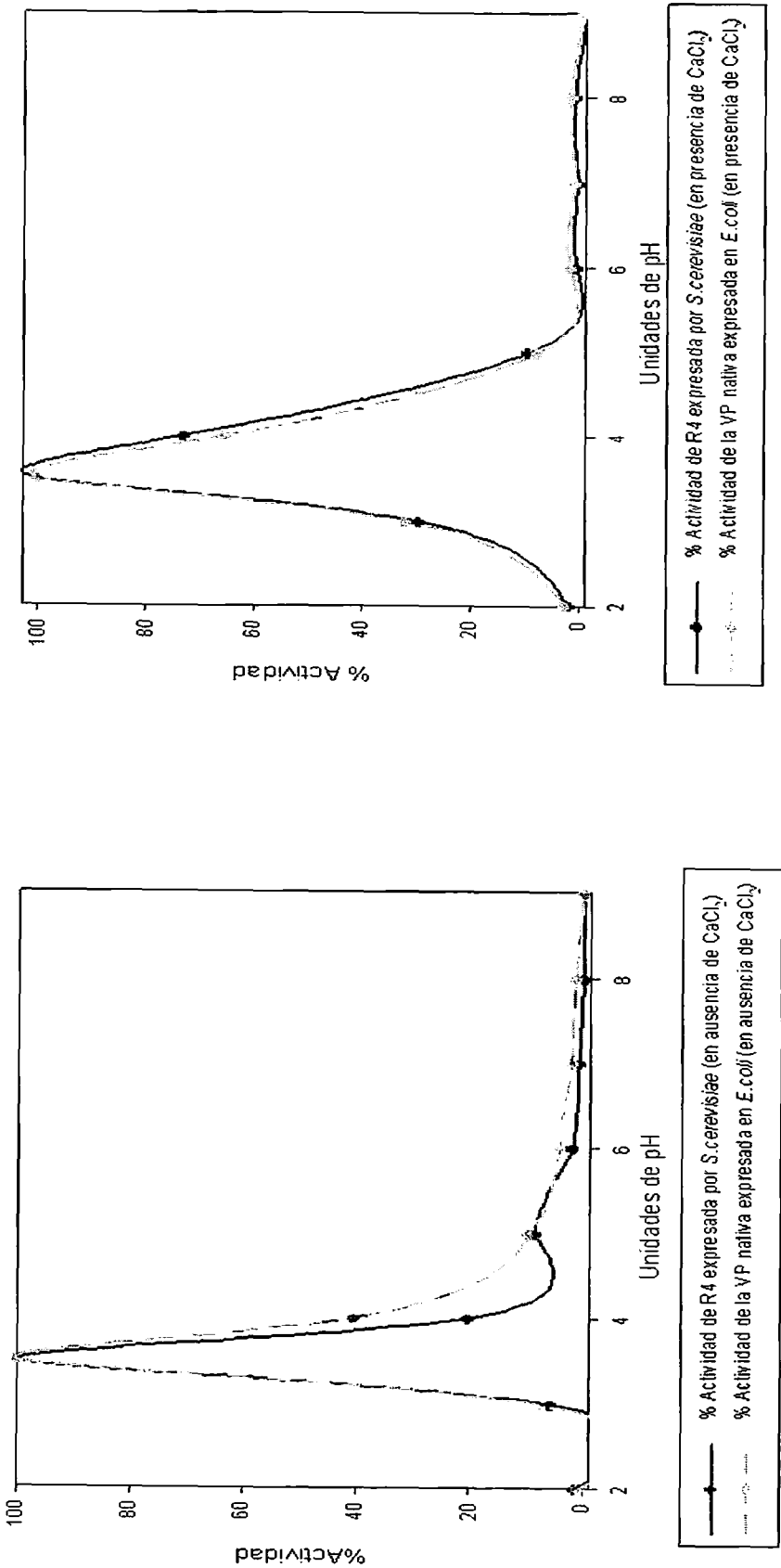


FIG. 19B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2010/070316

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N9

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

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

EPODOC,WPI, EBI SEQUENCES DATABASES, MEDLINE,BIOSIS,EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	GARCIA-RUIZ ET AL., "Evolving thermostability in mutant libraries of ligninolytic oxidoreductases expressed in yeast" Microbial Cell Factories (2010), 9:17, the whole document.	1-16
A	RUIZ-DUEÑAS F.J. ET AL., "Manganese oxidation site in Pleurotus eryngii versatile peroxidase: A site-directed mutagenesis, kinetic, and crystallographic study" Biochemistry (2007), 46(1), pág.66-77, the whole document.	1-16
A	PEREZ BOADA M. ET AL., "Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways." J. Mol. Biol.(2005) 354:385-402, the whole document	1-16

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

☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search

07.October.2010 (07.10.2010)

Date of mailing of the international search report

(18/10/2010)

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

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Hernández Cuéllar

Telephone No. +34 91 349 84 09

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/070316

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PEREZ BOADA M. ET AL., "Expression of Pleurotus eryngii versatile peroxidase in Escherichia coli and optimisation of in vitro folding" Enzyme and Microbial Technology (2002), 30(4), pág. 518-524, the whole document. Citado in the application	1-16
A	BUTLER T. ET AL., "Functional expression of a fungal lacasse in Sacharomyces cerevisiae by directed evolution," Applied and Enviromental Microbiology, (2003), 69(2), pág. 987-995, the whole document. Citado in the application .	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2010/070316

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

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

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

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Additional sheet (continuation of Box III)

The present patent application does not identify the structural feature common to the different VP variants claimed. Consequently, this Authority considers that the application contains multiple inventions:

1. Claims 1-16, to the extent to which they relate to the 11H10 variant
2. Claims 1-16, to the extent to which they relate to the 15G9 variant
3. Claims 1-16, to the extent to which they relate to the 4B5 variant
4. Claims 1-16, to the extent to which they relate to the 4B1 variant
5. Claims 1-16, to the extent to which they relate to the 16E12 variant
6. Claims 1-16, to the extent to which they relate to the 19C2 variant
7. Claims 1-16, to the extent to which they relate to the 20D1 variant
8. Claims 1-16, to the extent to which they relate to the 13G1 variant
9. Claims 1-16, to the extent to which they relate to the 10C3 variant
10. Claims 1-16, to the extent to which they relate to the 6B1 variant
11. Claims 1-16, to the extent to which they relate to the 13E4 variant

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2010/070316

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2010/070316

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N9

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

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

EPODOC,WPI, EBI SEQUENCES DATABASES, MEDLINE,BIOSIS,EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
P,X	GARCIA-RUIZ ET AL., "Evolving thermostability in mutant libraries of ligninolytic oxidoreductases expressed in yeast" Microbial Cell Factories (2010), 9:17, todo el documento.	1-16
A	RUIZ-DUEÑAS F.J. ET AL-, "Manganese oxidation site in Pleurotus eryngii versatile peroxidase: A site-directed mutagenesis, kinetic, and crystallographic study" Biochemistry (2007), 46(1), pág.66-77, todo el documento.	1-16
A	PEREZ BOADA M. ET AL., "Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways." J. Mol. Biol.(2005) 354:385-402, todo el documento	1-16

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

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

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 07.Octubre.2010 (07.10.2010)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 18-OCTUBRE-2010 (18/10/2010)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. N° de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado M. Hernández Cuéllar N° de teléfono +34 91 349 84 09

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2010/070316

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	PEREZ BOADA M. ET AL., "Expression of Pleurotus eryngii versatile peroxidase in Escherichia coli and optimisation of in vitro folding" Enzyme and Microbial Technology (2002), 30(4), pág. 518-524, todo el documento. Citado en la solicitud	1-16
A	BUTLER T. ET AL., "Functional expression of a fungal lacasse in Sacharomyces cerevisiae by directed evolution," Applied and Enviromental Microbiology, (2003), 69(2), pág. 987-995, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-16

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2010/070316

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

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

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

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

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

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s: **Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 11H10**

Indicación en cuanto a la protesta

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

HOJA ADICIONAL

En la presente solicitud de patente no se identifica cual es el elemento estructural común que comparten las diferentes variantes de la VP reivindicadas. En consecuencia esta Oficina considera que existen múltiples invenciones:

- 1.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 11H10
- 2.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 15G9
- 3.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 4B5
- 4.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 4B1
- 5.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 16E12
- 6.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 19C2
- 7.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 20D1
- 8.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 13G1
- 9.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 10C3
- 10.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 6B1
- 11.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 13E4
- 12.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 6E7
- 13.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 11F3
- 14.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante R4
- 15.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 24E10
- 16.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 3H9
- 17.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 15B4
- 18.- Reivindicaciones 1-16 en la medida en que se refieren a la variante 2-1B

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)