



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 335 951**

② Número de solicitud: 200701589

⑤ Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)  
**A61K 31/711** (2006.01)  
**C12N 15/12** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **08.06.2007**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**06.04.2010**

⑦ Solicitante/s:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Serrano, nº 117  
28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **García-Junceda Redondo, Eduardo;  
Iturrate Montoya, Laura y  
Bastida Codina, Agatha**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Proteína quimérica aldolasa/quinasa, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.**

⑤ Resumen:  
Proteína quimérica aldolasa/quinasa, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.  
La presente invención describe una nueva proteína quimérica que reúne en una única cadena polipeptídica dos actividades enzimáticas: una aldolasa y una quinasa, útil en la formación de enlaces C-C entre una cetona donadora y un aldehído aceptor complementándose el sistema con la regeneración *in situ* del ATP. Así, esta proteína quimérica permite desarrollar nuevos compuestos químicos con actividad biológica, por ejemplo, carbohidratos y análogos.

ES 2 335 951 A1

## DESCRIPCIÓN

Proteína quimérica aldolasa/quinasa, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se enmarca en los sectores Químico y Farmacéutico, más concretamente en el campo de los biocatalizadores para la formación estereoselectiva de enlaces C-C, originando carbohidratos y análogos.

10 **Estado de la técnica**

El aumento en la demanda de fármacos enantioméricamente puros por parte de la industria farmacéutica ha disparado la investigación en síntesis asimétrica en condiciones de regio- y estereoquímica controladas.

15 Es particularmente interesante en el caso de estructuras polihidroxiladas como los hidratos de carbono, donde la actividad biológica de los compuestos originados a partir de ellos, depende de la estereoquímica de la molécula. Además, estrategias de síntesis química clásica pueden resultar muy tediosas al necesitar múltiples pasos de protección-desprotección que disminuyen los rendimientos de las reacciones y, muchas veces, dan lugar a mezclas de productos difíciles de purificar.

20 Así, los métodos enzimáticos de síntesis de hidratos de carbono han despertado gran interés en las últimas décadas ya que permiten un gran control de la regio- y estereoquímica de los productos, porque usan condiciones de reacción suaves y eliminan los pasos de protección-desprotección aumentando así los rendimientos.

25 Las aldolasas son enzimas que catalizan la formación de enlaces C-C mediante una reacción aldólica entre una cetona y un aldehído. De entre éstas destacan por su interés sintético las aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Este grupo está formado por cuatro enzimas -fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa, tagatosa 1,6-bisfosfato aldolasa, fuculosa 1-fosfato aldolasa y rhamnulosa 1-fosfato aldolasa- que catalizan la adición aldólica de la dihidroxiacetona fosfato con un aldehído aceptor generando 2 nuevos estereocentros cuya estereoquímica viene determinada por la enzima y no por los sustratos. Otra característica importante de estas enzimas es que cada una de ellas da lugar a un producto cuya estereoquímica en los carbonos 3 y 4 es complementaria de los otros productos (Figura 1); es decir, la utilización de estas permite obtener los cuatro diastereoisómeros a partir de un amplio número de aldehídos naturales y no naturales (García-Junceda, E., García-García, J. F., Bastida, A., Fernández-Mayoralas, A., 2004. *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1817-1834). Las aldolasas dependientes de DHAP han demostrado su utilidad en la síntesis de carbohidratos, análogos de carbohidratos y otros compuestos no relacionados con éstos (Machajewski, T. D., Wong, C.-H., 2000. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 1352-1375; Fessner, W.-D., Helaine, V., 2001. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 574-586).

30 El principal inconveniente que presenta el uso en síntesis orgánica a nivel industrial de las enzimas aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato, es la disponibilidad de este compuesto (DHAP). Por un lado, la DHAP es lábil a pHs neutros o básicos, siendo éste el rango óptimo para las aldolasas implicadas en la formación de enlaces C-C, lo que provoca la disminución de la concentración de la DHAP por degradación durante el desarrollo de la reacción aldólica y, por otro lado, el precio de mercado de la DHAP es excesivamente caro para poder ser utilizada a nivel industrial.

45 Para intentar solventar la falta de disponibilidad de la DHAP han sido descritos diversos métodos de síntesis química y enzimática. Dentro de los métodos químicos se encuentran aquellos que parten de un dímero de dihidroxiacetona (DHA) (Jung, S. H., Jeong, J.-H., Miller, P., Wong, C.-H., 1994. *J. Org. Chem.*, 59, 7182-7184; Charmantray, F., El Blidi, L., Gefflaut, T., Hecquet, L., Bolte, J., Lemaire, M., 2004. *J. Org. Chem.*, 69, 9310-9312), o de la 1,3-dibromoacetona dando un precursor estable de la DHAP (Gefflaut, T., Lemaire, M., Valentín, M.-L., Bolte, J., *J. Org. Chem.*, 50 1997, 62, 5920-5922). El principal inconveniente de estos métodos es que suelen tener costes muy elevados y/o bajos rendimientos que no suelen superar el 65%.

Otros métodos químicos alternativos para superar la dependencia de las aldolasas a la DHAP, son la formación *in situ* de ésteres de arsenato o vanadato de la DHA que actúan como miméticos del éster fosfato (D. G. Drucekhammer, J. R. Durrwachter, R. L. Pederson, D. C. Crans, L. Daniels, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* 1989, 54, 70-77; R. Schoevaart, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *J. Org. Chem.* 2001, 66, 4559-4562; D. C. Crans, K. Sudhakar, T. J. Zamborelli, *Biochemistry.* 1992, 31, 6812-6821). En el uso de estos compuestos también se han detectado las siguientes objeciones: Aunque el arsenato ha sido utilizado eficazmente con propósitos sintéticos, su alta toxicidad impide su aplicación práctica. El vanadato también se ha utilizado incluso a menores concentraciones que el arsenato, pero el vanadato tiene una actividad redox que puede interferir con la reacción aldólica siendo también su alto precio, un factor importante a tener en cuenta en su utilización práctica.

Recientemente se ha reportado que en tampones de borato la DHA puede formar reversiblemente un éster borato que puede ser utilizado como sustrato por la rhamnulosa 1-fosfato aldolasa (M. Sugiyama, Z. Hong, L. J. Whalen, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Adv. Synth. Catal.* 2006, 348, 2555-2559).

Por otra parte, la preparación enzimática de DHAP se lleva a cabo usualmente acoplada a la reacción catalizada por la aldolasa. Así, la DHAP puede ser preparada a partir de la oxidación del L-glicerol 3-fosfato (L-G3P) catalizada por

la glicerofosfato oxidasa, junto con la descomposición del peróxido de hidrógeno mediada por la catalasa (Fessner, W.-D., Sinerius, G., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33, 209-212; United States Patent 5683897). Posteriormente, este sistema de preparación de DHAP ha sido acoplado con la preparación *in situ* del D,L-G3P bien mediante fosforilación del glicerol con la fosfatasa fitasa (Schoevaart, R., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A., 2000. J. Org. Chem., 65, 6940-6943), o mediante apertura regioselectiva del epóxido rac-glicidol con fosfato (Charmantray, F., Dellis, P., Samreth, S., Hecquet, L., 2006. Tetrahedron Lett., 47, 3261-3263).

Otras estrategias descritas hasta el momento para la obtención de DHAP enzimáticamente son:

- la fosforilación de la DHA mediante la glicerol quinasa utilizando ATP como donador de grupos fosfato (Wong, C.-H., Whitesides, G. M., 1983. J. Org. Chem., 48, 3199-3205).

- la utilización de la isoenzima I de la enzima dihidroxiacetona quinasa (DHAK) procedente de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0354 como biocatalizador para la producción de DHAP con la regeneración *in situ* del ATP mediante un sistema basado en la utilización de la acetato quinasa (Itoh, N., Tujibata, Y., Liu, J. Q., 1999. Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 193-200).

- la fosforilación de la DHA catalizada por la fosfatasa ácida de *Shigella flexneri* utilizando pirofosfato como donador y su utilización acoplada a la reacción catalizada por la aldolasa (Van Herk, T., Hartog, A. F., Schoemaker, H. E., Wever, R., 2006. J. Org. Chem., 71, 6244-6247).

Además, los inventores de la presente invención desarrollaron un sistema multienzimático en el que, partiendo de DHA se obtiene DHAP mediante la fosforilación catalizada por la dihidroxiacetona quinasa (DHAK) de *Citrobacter freundii* CECT 4626 con consumo de ATP; la reacción aldólica se acopla a la generación *in situ* de la DHAP y el sistema se completa con la regeneración del ATP usando acetilfosfato como donador de fosfato y acetato quinasa (Sánchez-Moreno, I., García-García, J. F., Bastida, A., García-Junceda, E., 2004, Chem. Commun., 1634-1635). Este sistema de generación *in situ* de DHAP ya ha sido optimizado para la reacción acoplada con tres aldolasas dependientes de DHAP de utilidad sintética, mostrando su aplicabilidad con un amplio rango de aldehídos. Este sistema permite la formación de enlaces C-C catalizada por aldolasas dependientes de DHAP a partir de la DHA, que es un compuesto de bajo coste y alta estabilidad. El ATP es utilizado en concentraciones catalíticas para cebar el sistema. La DHAK de *Citrobacter freundii* CECT 4626 tiene una eficiencia catalítica hacia la DHA muy superior a otros biocatalizadores empleados en la fosforilación enzimática de DHA. Además, la DHAP es producida en condiciones no oxidantes que podrían disminuir la estabilidad del aldehído aceptor. Sin embargo, este sistema adolece de la necesidad de utilizar 3 biocatalizadores con lo que esto implica en cuanto al coste de producción y purificación de las tres enzimas.

Un objeto de la presente invención es una proteína quimérica que reúne en una única cadena polipeptídica dos actividades enzimáticas, una actividad quinasa capaz de producir DHAP a partir de DHA y una actividad aldolasa responsable de la adición aldólica. Esto supone una simplificación del sistema multienzimático descrito por lo que facilita y abarata su utilización.

## Descripción de la invención

### Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye una Proteína quimérica con actividad dihidroxiacetona quinasa y aldolasa, en adelante Proteína quimérica DHAK-L-FDA de la invención, que comprende, al menos:

- i) una secuencia de aminoácidos de una dihidroxiacetona quinasa,
- ii) una secuencia de aminoácidos de una aldolasa monomérica, preferentemente de *Staphylococcus carnosus*, y
- iii) una secuencia conectora L de las secuencias de aminoácidos de i) y ii).

Una realización particular de la invención lo constituye la proteína quimérica de SEQ ID NO: 2.

Otro objeto de la invención lo constituye el procedimiento de obtención de la proteína quimérica de la invención, en adelante procedimiento de la invención, y que comprende las siguientes etapas (ver ejemplo 1):

- diseño de oligonucleótidos específicos conteniendo una secuencia conectora, preferentemente, la secuencia conectora L (Gln-Gly-Gln-Gly-Gln),
- amplificación por PCR por separado del gen *dhak* (dihidroxiacetona quinasa) de *Citrobacter freundii* CECT 4626 y de un gen de un enzima con actividad fructosa 1-6 bisfosfato aldolasa, preferentemente el gen *fda* de *Staphylococcus carnosus*, incorporando dianas de corte para enzimas de restricción,

## ES 2 335 951 A1

- introducción en los extremos 3' de la quinasa y 5' de la aldolasa de la secuencia conectora L. preferentemente la secuencia Gln-Gly-Gln-Gly-Gln, y purificación de los fragmentos,
- amplificación por PCR de la secuencia de nucleótidos de la Proteína quimérica de la invención, preferentemente la construcción DHAK-L-FDA (SEQ ID NO:1),
- introducción de la secuencia de nucleótidos de la Proteína quimérica en un vector de expresión, transformación de una célula, ya sea eucariota o procariota, y producción y purificación de la proteína resultante, preferentemente la proteína de SEQ ID NO:2.

Otro objeto de la invención lo constituye una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica DHAK-L-FDA de la invención, en adelante secuencia de nucleótidos de la invención, constituida por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- i) una secuencia de nucleótidos codificante de una dihidroxiacetona quinasa,
- ii) una secuencia de nucleótidos codificante de una aldolasa monomérica, preferentemente de *Staphylococcus carnosus*, y
- iii) una secuencia de nucleótidos codificante de una secuencia conectora L intercalada entre las secuencias i) y ii).

Una realización particular de la invención lo constituye la secuencia de nucleótidos de la proteína quimérica de la invención de SEQ ID NO:1.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la enzima de la invención, en adelante uso de la invención, en la formación de enlaces de C-C partiendo de dihidroxiacetona y diferentes aldehídos, naturales o no naturales, con el objeto de obtener nuevos compuestos químicos.

### Descripción detallada

Para solucionar el problema expuesto, los inventores de la invención han demostrado por primera vez que es posible elaborar una nueva Proteína quimérica que reúna en una única cadena polipeptídica actividad dihidroxiacetona quinasa y actividad aldolasa, unidas con una región conectora L, utilizando de forma expresa la proteína monomérica secuencia, del gen de la aldolasa de *Staphylococcus carnosus* y la secuencia del gen de la dihidroxiacetona quinasa dependiente de ATP de cualquier microorganismo habiéndose probado su eficacia en el Ejemplo 1. Esta proteína quimérica se comporta en estudios de ultracentrifugación como un dímero de masa molecular 199.853 Da. Además, sorprendentemente se ha podido constatar que la Proteína quimérica de la invención sólo mantiene la actividad mencionada cuando comprende una parte enzimática con actividad aldolasa que proviene de una forma enzimática original monomérica (como es, por ejemplo, la aldolasa de *Staphylococcus carnosus*) mientras que cuando se utiliza una aldolasa que funciona como tetrámero (como es, por ejemplo, la aldolasa de *E. coli*) la Proteína quimérica así construida forma agregados y no tiene la actividad biológica deseada (ver Ejemplo 2).

El uso de dicha Proteína quimérica permite la formación de enlaces C-C entre una cetona donadora y un aldehído aceptor complementándose el sistema con la regeneración *in situ* del ATP, permitiendo de esta manera desarrollar nuevos compuestos químicos con actividad biológica, por ejemplo carbohidratos y análogos.

El procedimiento para la formación de enlaces C-C que forma parte de la presente invención, parte de la DHA, que es fosforilada por la actividad quinasa de la Proteína quimérica, con el consumo de ATP para obtener DHAP. A su vez la DHAP es utilizada por la actividad aldolasa del Proteína quimérica, para dar lugar al producto de adición aldólica con el aldehído aceptor. Tanto el ATP como el ADP generado actúan como inhibidores de la actividad quinasa por lo que, para evitar la acumulación de ADP, es necesario usar cantidades catalíticas de ATP. Esto se consigue regenerando *in situ* el ATP mediante la acción de la acetato quinasa de *E. coli* y usando acetilfosfato como donador de fosfato. Este procedimiento de formación de enlaces C-C permite utilizar como producto de partida la DHA, que es un compuesto de bajo coste y alta estabilidad, y el ATP es utilizado únicamente en concentraciones catalíticas para cebar el sistema reduciendo también el coste del proceso.

La DHAP es producida en condiciones no oxidantes que podrían disminuir la estabilidad del aldehído aceptor y es utilizada, a medida que se produce, por la aldolasa lo que hace innecesario su purificación. Además, la nueva proteína quimérica descrita en esta invención reúne en una única cadena polipeptídica dos actividades enzimáticas: la quinasa capaz de producir DHAP a partir de DHA y la actividad aldolasa responsable de la reacción de condensación aldólica. Esto supone una reducción en el coste del biocatalizador ya que sólo hay que producir y purificar una única proteína. Además, la unión de las dos actividades puede promover un incremento de la "concentración efectiva" de la DHAP en las cercanías del centro activo de la aldolasa provocando un aumento de la eficacia catalítica del sistema.

## ES 2 335 951 A1

La Proteína quimérica bifuncional ha probado ya su eficacia en procesos sintéticos, más concretamente, ha sido demostrada con aldehídos representativos de un amplio rango estructural: i) acetaldehído (1) como aldehído alifático más simple; ii) benziloxiacetaldehído (2) como aldehído con un grupo cromóforo y iii) 3-(metiltio) propionaldehído (3) como aldehído con heteroátomo (Ejemplo 1, figura 3). Los resultados obtenidos muestran que el nuevo Proteína quimérica bifuncional se puede aplicar a la síntesis de enlaces C-C, siguiendo el procedimiento siguiente: la DHA, es fosforilada por la actividad quinasa del Proteína quimérica, con el consumo de ATP para obtener DHAP. A su vez la DHAP es utilizada por la actividad aldolasa de la Proteína quimérica, para dar lugar al producto de adición aldólica entre una cetona donadora y un aldehído aceptor. En la formación de los enlaces C-C se obtuvieron diferentes conversiones de aldol y concentraciones de DHAP dependiendo del aldehído aceptor de partida (Ejemplo 1.2):

- Utilizando acetaldehído se obtiene una conversión de aldol del 82%, que por <sup>1</sup>H-NMR corresponde a un único diastereoisómero, en 22 horas con una acumulación de DHAP del 17%.

- Para el benziloxiacetaldehído se obtiene una conversión del correspondiente aldol del 46% en 20 horas con una acumulación de DHAP del 6%.

- Con el 3-(metiltio) propionaldehído se obtiene una conversión de aldol del 64% en 20 horas con una acumulación de DHAP del 22%.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención lo constituye una Proteína quimérica con actividad dihidroxiacetona quinasa y aldolasa, en adelante Proteína quimérica DHAK-L-FDA de la invención, que comprende, al menos:

- iv) una secuencia de aminoácidos de una dihidroxiacetona quinasa,
- v) una secuencia de aminoácidos de una aldolasa monomérica, preferentemente de *Staphylococcus carnosus*, y
- vi) una secuencia conectora L de las secuencias de aminoácidos de i) y ii).

Un objeto particular de la invención lo constituye la Proteína quimérica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos de la aldolasa es la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa monomérica de la bacteria *Staphylococcus carnosus* y la *dihidroxiacetona quinasa* es la dihidroxiacetona quinasa de la bacteria *Citrobacter freundii* cepa CECT 4626 (véase la SEQ ID NO2).

Otro objeto particular de la invención lo constituye la Proteína quimérica de la invención en la que la región conectora L es Gln-Gly Gln-Gly Gln.

Una realización particular de la invención lo constituye la proteína quimérica de SEQ ID NO:2.

Otro objeto de la invención lo constituye el procedimiento de obtención de la proteína quimérica de la invención, en adelante procedimiento de la invención, y que comprende las siguientes etapas (ver ejemplo 1):

- diseño de oligonucleótidos específicos conteniendo una secuencia conectora, preferentemente, la secuencia conectora L (Gln-Gly-Gln-Gly-Gln),
- amplificación por PCR por separado del gen *dhak* (*dihidroxiacetona quinasa*) de *Citrobacter freundii* CECT 4626 y de un gen de una enzima con actividad fructosa 1-6 bisfosfato aldolasa, preferentemente el gen *fd* de *Staphylococcus carnosus*, incorporando dianas de corte para enzimas de restricción,
- introducción en los extremos 3' de la quinasa y 5' de la aldolasa de la secuencia conectora L. preferentemente la secuencia Gln-Gly-Gln-Gly-Gln, y purificación de los fragmentos,
- amplificación por PCR de la secuencia de nucleótidos de la Proteína quimérica de la invención, preferentemente la construcción DHAK-L-FDA (SEQ ID NO:1),
- introducción de la secuencia de nucleótidos de la Proteína quimérica en un vector de expresión, transformación de una célula, ya sea eucariota o procariota, y producción y purificación de la proteína resultante, preferentemente la proteína de SEQ ID NO:2.

Otro objeto de la invención lo constituye una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica DHAK-L-FDA de la invención, en adelante secuencia de nucleótidos de la invención, constituida por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- iv) una secuencia de nucleótidos codificante de una dihidroxiacetona quinasa,

## ES 2 335 951 A1

- v) una secuencia de nucleótidos codificante de una aldolasa monomérica, preferentemente de *Staphylococcus carnosus*, y
- vi) una secuencia de nucleótidos codificante de una secuencia conectora L intercalada entre las secuencias i) y ii).

5

Otro objeto particular de la invención lo constituye la secuencia de nucleótidos codificante de la Proteína quimérica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos de la aldolasa es la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa monomérica de la bacteria *Staphylococcus carnosus* y la *dihidroxiacetona quinasa* es la dihidroxiacetona quinasa de la bacteria *Citrobacter freundii* cepa CECT 4626 (véase los distintos genes en la SEQ ID NO:1).

10

Otro objeto particular de la invención corresponde a una secuencia de nucleótidos codificante de la proteína quimérica de la invención, o de un fragmento de dicha secuencia, o una secuencia de nucleótidos análoga, o una secuencia de nucleótidos que codifica para una variante, natural o artificial, o de un fragmento de la misma, donde la secuencia antes descrita procede de cualquier microorganismo, y que contiene secuencias de nucleótidos análogas de los dos genes, aldolasa y quinasa, descritos en la presente invención. Un experto en ingeniería genética y con la información aquí descrita puede fácilmente aislar y desarrollar nuevas formas análogas a la descrita en la presente invención por lo que parte de ésta.

15

20

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análogo” pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que pueda ser aislada o construida en base a las secuencias de nucleótidos mostradas en la presente invención, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que codifique para un péptido o proteína con actividad similar a la original, es decir, como la proteína quimérica DHAK-L-FDA de la invención.

25

En general, una secuencia de nucleótidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 40%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

30

Otro objeto particular de la invención lo constituye la secuencia de nucleótidos que codifica la región conectora L de la Proteína quimérica de la invención (Gln-Gly-Gln-Gly-Gln).

35

Una realización particular de la invención lo constituye la secuencia de nucleótidos de la proteína quimérica de la invención de SEQ ID NO:1.

Otro objeto particular de la invención es un vector de expresión génica, en adelante vector de expresión DHAK-L-FDA, que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención, preferentemente la SEQ ID NO:1, que permite la expresión de dicha construcción en el citoplasma del microorganismo de la invención, preferentemente, el vector plasmídico pET-dhak-l-fda de la invención (ver Ejemplo).

40

En general, un vector de expresión comprende, además de la secuencia de nucleótidos de de interés, al menos, un promotor que dirige su transcripción (*pT7*, *plac*, *ptrc*, *ptac*, *pBAD*, *ptet*, etc), al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan la transcripción del gen y, en su caso, la traducción del producto de interés, por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción (*tlh2*, etc.), señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas (RBS), secuencias codificantes de reguladores transcripcionales, (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), represores, etc. Además, pueden incluir otras secuencias que faciliten una mejor purificación, por ejemplo, una cola de 6 histidinas que facilite su purificación. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión de microorganismos que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora y del tipo de uso que se quiera realizar. Por tanto, según un modo de realización particular de la presente invención dicho vector es un plásmido. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia al igual que para la transformación de microorganismos se pueden utilizar diferentes métodos - transformación química, electroporación, microinyección, etc. - descritos en diversos manuales [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.]. Además de plásmidos, pueden utilizarse otros vectores como bacteriófagos, en fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales o integrando en cualquier punto del cromosoma o cromosomas.

50

55

60

Otra realización particular de la invención lo constituye un vector de expresión dhak-l-fda en el que el vector corresponde a un plásmido que comprende como secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1, preferentemente los, plásmidos pET-dhak-l-fda y pRdkfa (ver Ejemplo 1 y 2).

65

Otro objeto particular de la invención es una célula o microorganismo transformado que comprende la secuencia de nucleótidos o el vector de la invención.

## ES 2 335 951 A1

Tal como se utiliza en la presente invención el término “microorganismo” se refiere a cualquier microorganismo natural, incluyendo formas atenuadas, comensales, probióticas, ambientales, etc. aisladas en la naturaleza o a cualquier cepa o especie con cualquier tipo de modificación genética, y ya sean estas modificaciones aisladas mediante selecciones naturales, procesos de mutagénesis al azar o dirigida, o por técnicas de DNA recombinante, preferentemente bacterias, hongos, levaduras, algas, plantas y células de insecto.

Una realización particular de la invención lo constituye un cepa de *Escherichia coli*, o de cualquier otra cepa o especie bacteriana, que comprenda la secuencia de nucleótidos de la proteína quimérica de la invención.

Los aldehídos y la dihidroacetona pueden formar parte de estructuras químicas que interesen modificar o complementar. Ejemplos destacados de estas familias de compuestos son los iminoclitoles que actúan como inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas y por lo tanto pueden tener aplicaciones como antibióticos, antimetastásicos, antihiperoglucémicos, o agentes inmunoestimulantes. Otros compuestos importantes son: Piperidinas polihidroxiladas; fagomina; análogos de Epsilon, etc.

Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye el uso del enzima de la invención, en adelante uso de la invención, en la formación de enlaces de C-C partiendo de dihidroxiacetona y diferentes aldehídos, naturales o no naturales, con el objeto de obtener nuevos compuestos químicos.

Otra realización particular de la invención lo constituye el uso de la invención en el que la enzima utilizado es el enzima de SEQ ID NO:2.

### Descripción de las figuras

Figura 1.- Esquema de las reacciones catalizadas por las cuatro aldolasas dependientes de DHAP: 1) Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; 2) Tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa; 3) L-Rhamnulosa-1-fosfato aldolasa; 4) L-Fuculosa-1-fosfato aldolasa.

Figura 2.- Esquema del procedimiento para la formación de enlaces C-C utilizando la Proteína quimérica aldolasa/quinasa. 1) Dihidroxiacetona quinasa de la Proteína quimérica fosforila la DHA con el consumo de ATP para obtener DHAP; 2) Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de la Proteína quimérica utiliza la DHAP para dar lugar al producto de adición aldólica con el aldehído aceptor; 3) Acetato quinasa de *E. coli* regenera *in situ* ATP mediante la acción y usando acetilfosfato como donador de fosfato.

Figura 3. - Estructura de los aldehídos utilizados para comprobar la aplicabilidad sintética de la Proteína quimérica aldolasa/quinasa. (1) Acetaldehído; (2) benziloxiacetaldehído y (3) 3-(metiltio) propionaldehído.

### Ejemplos de realización

Ejemplo 1

*Obtención y aplicación de la Proteína quimérica DHAK-L-FDA de la invención*

1.1.- *Obtención de la enzima quimérica aldolasa-DHAK de la invención utilizando la enzima fructosa 1-6 bifosfato aldolasa de Staphylococcus carnosus*

*Construcción del gen quimérico DHAK-L-FDA*

La Proteína quimérica se construyó utilizando el método de los cuatro primers o “gene splicing by overlap extensión” (Horton, R. M., Cai, Z. L., Ho, S. N., Pease, L. R. 1990, Biotechniques, 8, 528-535) para el cual se diseñaron primers específicos conteniendo la secuencia conectora L. La aldolasa de *Staphylococcus carnosus* es una proteína monomérica mientras que la quinasa de *C. freundii* es un dímero. En una primera PCR se amplificaron por separado los genes *dhak* de *Citrobacter freundii* CECT 4626 y *fda* (fructosa 1-6 bisfosfato quinasa) de *Staphylococcus carnosus* incorporando dianas de corte para los de restricción *NdeI* (en el extremo 5' de *dhak*) y *XhoI* (en el extremo 3' de *fda*). En los extremos 3' de *dhak* y 5' de *fda* se introdujeron las secuencias correspondientes a la secuencia conectora L. El conector L es un pequeño fragmento de cinco aminoácidos (Gln-Gly-Gln-Gly-Gln) y se diseñó con el programa LINKER (Crauto, C. J. and Feng, J.-A., 2001, Prot. Eng. 13, 309-312).

Las condiciones para esta PCR fueron: a) para el gen *dhak-L* tampón 10x 1  $\mu$ L;  $MgCl_2$  (50 mM) 0.6  $\mu$ L; dNTPs (10 mM) 1  $\mu$ L; aditivo 5x 2  $\mu$ L; template (plásmido purificado de *E. coli* pRSET-dhak disponible en nuestro laboratorio) 0.15  $\mu$ L;  $H_2O$  4.5  $\mu$ L; primer NtNdhak (100  $\mu$ M) 0.15  $\mu$ L; primer CtFdhak (100  $\mu$ M) 0.15  $\mu$ L; EcotaqPlus (4 U/ $\mu$ L) 0.45  $\mu$ L; b) para el gen *L-fda* tampón 10x 1  $\mu$ L;  $MgCl_2$  (50 mM) 0.5  $\mu$ L; dNTPs (10 mM) 0.8  $\mu$ L; aditivo 5x 2  $\mu$ L; template (dilución del DNA genómico de *Staphylococcus carnosus* extraído por tratamiento de un cultivo de *S. carnosus* CECT 4491 con lisozima y lisostaphina) 0.5  $\mu$ L;  $H_2O$  4.45  $\mu$ L; primer NtFScfda (100  $\mu$ M) 0.15  $\mu$ L; primer CtScXfda (100  $\mu$ M) 0.15  $\mu$ L; EcotaqPlus (4 U/ $\mu$ L) 0.45  $\mu$ L. En ambos casos, la mezcla de reacción se sometió a 25 ciclos de amplificación con las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, anillamiento a 55°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos.

## ES 2 335 951 A1

Una vez purificados los fragmentos, se procedió a realizar la segunda reacción de PCR en la que se consiguieron fusionar ambas secuencias gracias a la complementariedad del conector.

5 En una segunda PCR donde se utilizaron como molde de DNA los fragmentos amplificados anteriormente, se amplificó la construcción DHAK-L-FDA (2562 pb). Las condiciones para esta PCR fueron: tampón 10x 1  $\mu\text{L}$ ;  $\text{MgCl}_2$  (50 mM) 0.8  $\mu\text{L}$ ; dNTPs (10 mM) 1  $\mu\text{L}$ ; aditivo 5x 2  $\mu\text{L}$ ; template (una disolución mezcla de *dhak-L* y *L-fda* obtenida en las dos amplificaciones de la PCR anterior en relación 1:1) 0.4  $\mu\text{L}$ ;  $\text{H}_2\text{O}$  4.05  $\mu\text{L}$ ; NtNdhak (100  $\mu\text{L}$ ) 0.15  $\mu\text{L}$ ; CtScXf da (100  $\mu\text{L}$ ) 0.15  $\mu\text{L}$ ; EcotaqPlus (4 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.45  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción se sometió a 25 ciclos de amplificación. Las condiciones de los ciclos fueron: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, anillamiento a 50°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 3 minutos.

### Subclonaje del gen DHAK-L-FDA en el plásmido pET-dhak-l-fda

15 El producto de esta segunda PCR (denominado DHAK-L-FDA (SEQ ID NO:1) se clonó en el vector de expresión pET-28b (+) (5.3 kb). Para ello el producto de PCR se sometió a digestión con los enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI* y a ligación de extremos cohesivos en pET-28b(+) doblemente digerido con los mismos enzimas. El plásmido pET-dhak-l-fda (7931 pb) así obtenido se transformó en la cepa BL21(D3E) de *E. coli*. Una ventaja adicional del vector pET-28b (+) es que la proteína se unió a un pequeño péptido en el extremo N-terminal conteniendo seis histidinas que presentan alta afinidad por cationes divalentes ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , etc.), lo cual facilitó la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a iones inmovilizados (IMAC).

### Sobreexpresión y purificación del enzima DHAK-L-FDA

25 Para la sobreexpresión de la proteína quimérica de la invención se crecieron cultivos de una cepa de *Escherichia coli* BL21(D3E) transformada con el plásmido pET-dhak-l-fda en medio LB conteniendo 26.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de kanamicina. La expresión de las proteínas se encontraba bajo control del promotor T7, reconocido de manera específica por la T7-RNA-polimerasa presente en la propia cepa de *E. coli*, siendo ésta inducible con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Los cultivos se dejaron toda la noche en agitación a 30°C. El extracto celular resultante se trató con lisozima para romper las células. La expresión de proteínas se estudió analizando el extracto crudo proteico por SDS-PAGE, que reveló la existencia de una banda de sobreexpresión debida a la adición de IPTG en la fracción correspondiente a la proteína soluble.

30 La purificación del enzima bifuncional DHAK-L-FDA se realizó mediante cromatografía de afinidad con resinas de  $\text{Ni}^{2+}$ -agarosa utilizando imidazol 0.5 M como eluyente. Los eluidos se dializaron frente a agua para eliminar el imidazol y minimizar el contenido en sales para la posterior liofilización de la proteína. Se comprobó que el proceso de dialización y liofilización de la proteína no afectó a su actividad y permitió de esa manera su concentración. La proteína podría presentarse liofilizada, semi-precipitada en una suspensión de sulfato amónico al 3,2% e incluso inmovilizada en resinas de  $\text{Ni}^{2+}$ -agarosa a través de la cola de 6 histidinas.

### 40 Caracterización físico-química del Proteína quimérica DHAK-L-FDA

Es importante destacar que la Proteína quimérica mantuvo la actividad de las dos funciones, obteniéndose 180 U de actividad aldolasa (medida en sentido de reacción retroaldólica) y 125 U de actividad quinasa (medida en sentido de fosforilación) por litro de cultivo.

45 La Proteína quimérica presentó una  $K_M$  para la fructosa 1,6-bifosfato de 1,686 x 10<sup>-2</sup> mM y para la DHA de 2,185x10<sup>-3</sup> mM. La  $k_{cat}$  para cada uno de estos sustratos es 6,5x10<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> y 4,7x10<sup>2</sup> min<sup>-1</sup> respectivamente. Por lo tanto la eficacia catalítica de la Proteína quimérica se situó en el orden de 10<sup>5</sup> mM<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>.

50 La Proteína quimérica obtenida de la presente invención se comportó en estudios de ultracentrifugación como un dímero de masa molecular 199.853 Da. El coeficiente de extinción molar a 280 nm ( $\epsilon^{280}$ ) calculado para la proteína quimérica fue de 37.610 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

### 55 1.2.- Aplicación sintética de la Proteína quimérica aldolasa/quinasa a la formación de enlaces C-C

La Proteína quimérica aldolasa/quinasa de la invención se utilizó para la formación de enlaces C-C siguiendo el esquema general que se representa en la Figura 2.

60 La aplicación sintética de la Proteína quimérica se probó con los aldehídos (1) acetaldehído; (2) benziloxiacetaldehído y (3) 3-(metiltio)propionaldehído (Figura 3).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 1,5 mL que contenía: DHA 50  $\mu\text{mol}$ ; aldehído 150  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{MgSO}_4$  12.5  $\mu\text{mol}$ ; ATP 3.4  $\mu\text{mol}$ ; acetilfosfato 100  $\mu\text{mol}$ ; fosfato sódico 60 mM pH 7.5 500  $\mu\text{L}$ ; acetato quinasa 2.5 U; Proteína quimérica DHAK-L-FDA (0.5-1 U actividad aldolasa y 0.25-0.5 U quinasa).

Utilizando acetaldehído se obtuvo una conversión de aldol del 82%, que por <sup>1</sup>H-NMR se observó que era un único diastereoisómero, en 22 horas con una acumulación de DHAP del 17%. Para el benziloxiacetaldehído se obtuvo una

## ES 2 335 951 A1

conversión del correspondiente aldol del 46% en 20 horas con una acumulación de DHAP del 6%. Con el 3-(metiltio) propionaldehído se obtuvo una conversión de aldol del 64% en 20 horas con una acumulación de DHAP del 22%.

5 El transcurso de la reacción se siguió espectrofotométricamente mediante valoración de alícuotas de reacción. Así, la acumulación de DHAP se pudo medir mediante un ensayo enzimático basado en la reducción de la DHAP catalizada por la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenada ( $\alpha$ -GDH) con oxidación concomitante de NADH a NAD<sup>+</sup>, monitorizando la bajada de absorbancia a 340 nm (Bergmeyer, H. U., (1984) *Methods of Enzymatic Analysis* vol. 2, 3rd ed.; Verlag Chemie: Deerfield, FL). Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente midiendo la absorbancia a 340 nm durante 15 minutos en una mezcla de reacción de 1 mL que contiene: la alícuota de reacción; Tris-HCl 40 mM, pH 8.0; NADH 10 0.2  $\mu$ mol y  $\alpha$ -GDH/TIM (2 U). Para medir el consumo de DHA es necesario añadir DHAK 0.375 U; ATP 5  $\mu$ mol y MgSO<sub>4</sub> 3.75  $\mu$ mol a la mezcla de valoración. Por otro lado, la acumulación de aldol se midió usando la actividad retroaldólica de la aldolasa. En este caso, fue necesario añadir a la mezcla de valoración 0.05 U de aldolasa.

### 15 Ejemplo 2

*Obtención de la Proteína quimérica aldolasa-DHAK, utilizando la enzima Fuculosa 1-fosfato aldolasa de E. coli*

#### 20 *Construcción del gen de quimérico dkfa*

Para la construcción de la enzima bifuncional aldolasa-DHAK se eligieron para la actividad aldolasa la enzima Fuculosa 1-fosfato aldolasa de *E. coli* y para la actividad quinasa la enzima DHAK de *Citrobacter freundii*. La aldolasa de *E. coli* es un tetrámero, mientras que la quinasa de *C. freundii* es un dímero. Para conseguir la proteína quimérica se siguió el método de los cuatro primers. Con la primera reacción de PCR se construyeron los fragmentos correspondientes a los dos genes con el conector fusionado en los extremos 3' (carboxilo-terminal) en el caso de la Fuc-IPA y en el extremo 5' (amino-terminal) de la DHAK. El conector es un pequeño fragmento de cinco aminoácidos (Gln-Gly-Gln-Gly-Gln) y se diseñó con el programa LINKER. Una vez purificados los fragmentos, se procedió a realizar la segunda reacción de PCR en la que se consiguió fusionar ambos dominios gracias a la complementariedad del conector. Este fragmento de 2346 pb se denominó *dkfa*. El fragmento se purificó y clonó en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy (3,0 kb) para su secuenciación. Se obtuvieron los plásmidos pGdkfa (5,3 kb) y se transformó con ellos la cepa XL1-Blus MRF<sup>+</sup> de *Escherichia coli*.

#### 30 *Subclonaje del gen dkfa en pRSET-A*

35 El gen *dkfa* se subclonó en el vector pRSET-A (2,9 kb). Mediante digestión del plásmido pGdkfa02 con *XhoI* y *HindIII* se liberó el gen *dkfa*, que se ligó con el vector previamente digerido con los mismos enzimas, obteniéndose el plásmido pRdkfa (5,2 kb), con el que se transformó la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. Una ventaja adicional de este vector es que la proteína se produjo fusionada a un pequeño péptido en el extremo N-terminal que contenía seis histidinas presentando una alta afinidad por cationes divalentes (Ni<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, etc.), facilitando de esa forma, la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a iones inmovilizados (IMAC).

40 Para la sobreexpresión de la proteína quimérica se crecieron cultivos de varios clones BL/pRdkfa en medio LB conteniendo 250  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de ampicilina (LBA). La expresión de las proteínas se encontraba bajo control del promotor T7, reconocido de manera específica por la T7-RNA-polimerasa presente en la propia cepa de *E. coli*, siendo esta inducible con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

50 Los cultivos se dejaron toda la noche en agitación a 30°C. Posteriormente se realizaron lisis de los cultivos anteriores con ánimo de separar las proteínas solubles de los cuerpos de inclusión. El análisis por SDS-PAGE reveló la existencia de una banda de sobreexpresión debida a la adición de IPTG en las fracciones correspondientes a los cuerpos de inclusión (agregados insolubles e inactivos de proteína).

#### *Intento de replegamiento de los cuerpos de inclusión*

55 Para intentar replegar los cuerpos de inclusión se procedió a su desnaturalización/renaturalización con diferentes métodos *in vitro*. Primero, el clon que mayor proporción de proteína recombinante expresaba, se creció en medio LBA, los pellets que se obtuvieron se separaron de la fracción de proteínas solubles y se lavaron con una disolución de Tris-HCl 25 mM, pH 7.7, urea 2 M (50 mL g<sup>-1</sup> células) y se agitaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Se centrifugaron a 12000 g durante 30 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en una disolución de Tris-HCl 25 mM, pH 7.7; urea 2 M; Tritón X-100 al 0,5% (50 mL g<sup>-1</sup> células). Se dejó en agitación a TA durante 20 min y se centrifugó a 12000 g durante 15 min. El sobrenadante se decantó y los cuerpos de inclusión se resuspendieron en una disolución del agente desnaturalizante: Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; cloruro de guanidinio (GdmCl) 6 M o Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; urea 8 M. Se dejaron agitando a temperatura ambiente hasta que se disolvieron y se centrifugaron a 4000 g durante 30 min. Una vez purificados y solubilizados los cuerpos de inclusión, se procedió a su replegamiento mediante la eliminación progresiva del agente desnaturalizante a través de diálisis. A continuación se mezclaron 5 mL de cuerpos de inclusión solubles con 5 mL de diferentes tampones, dependiendo de las condiciones de replegamiento de los mismos: A (Tris-HCl 20 mM pH 7.5), B (Tris-HCl 20 mM pH 7.5; Tritón X-100, 20, C (Tris-HCl 20 mM pH 7.5; Brij 58, 10%) y D (Tris-HCl 20 mM pH 7.5; Tritón X-100, 0,2%; glicerol, 40%). La mezcla de 10 mL se introdujo en una tripa de diálisis y se lavó en 1 L de tampón durante 2 h agitando suavemente. Una vez pasado el tiempo, se

## ES 2 335 951 A1

recambió el tampón y se dejó 2 h en agitando suave. Después de las dos horas, el contenido de la tripa se centrifugó a 12000 g durante 30 min y se reservaron los sobrenadantes, que contendrían las proteínas solubles y plegadas.

5 En algunos casos se comprobó que la proteína había replegado. En el resto se observó la aparición de agregados de proteína, consecuencia de un incorrecto plegamiento. Para comprobar si el plegamiento era o no correcto y ambos dominios poseían actividad enzimática se procedió a detectar ambas actividades mediante un ensayo espectrofotométrico donde fueron ensayadas las actividades Fuc-1P aldolasa y DHAK, pero no se detectó ninguna de las dos. Esto podría deberse a que la construcción no resultó funcional o a que el plegamiento *in vitro* no correspondía al plegamiento que  
10 pudiese darse *in vivo*.

15 Para comprobar esto último se decidió utilizar chaperonas moleculares para facilitar el plegamiento de la proteína de fusión. Se ha descrito, en muchos casos, que el empleo de estas proteínas favorece el plegamiento *in vivo* de las proteínas recombinantes. Con ánimo de ensayarlo, se procedió a la transformación de la cepa BL/pRdkfa06.2 con dos plásmidos, pAG y pAKJ que codifican para los sistemas de chaperonas GroEL/GroES y DnaK/DnaJ, respectivamente. Para ambos plásmidos se obtuvieron colonias BLpRdkfa/pAG y BLpRdkfs/pAKJ. Se crecieron cultivos de los diferentes clones positivos en medio LB con 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina y 34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cloranfenicol. La expresión de las chaperonas se indujo con L-arabinosa (L-ara), y posteriormente se indujo la expresión de la Proteína quimérica mediante adición de IPTG. En ambos casos las chaperonas resultaron inefectivas para producir el correcto plegamiento de la proteína quimérica.  
20

25 Con estos resultados se concluyó que debido a que las dos proteínas implicadas en fusión de proteínas para la formación de la proteína quimérica eran proteínas multiméricas, se forman agregados macromoleculares que resultan insolubles e inactivos.  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

REIVINDICACIONES

1. Proteína quimérica útil para la formación de enlaces C-C **caracterizado** porque comprende, al menos:

- i) una secuencia de aminoácidos de una dihidroxiacetona quinasa,
- ii) una secuencia de aminoácidos de una aldolasa monomérica, preferentemente de *Staphylococcus carnosus*, y
- iii) una secuencia conectora L de las secuencias de aminoácidos de i) y ii).

2. Proteína quimérica según la reivindicación 1 **caracterizada** porque la secuencia de aminoácidos codificante de la aldolasa es la de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa monomérica de la bacteria *Staphylococcus carnosus* o de un fragmento de dicha secuencia, o una secuencia de aminoácidos análoga, o una secuencia de aminoácidos que codifica para una variante, natural o artificial o de un fragmento de la misma.

3. Proteína quimérica según las reivindicación 1 **caracterizada** porque la secuencia de aminoácidos codificante de la dihidroxiacetona quinasa es la de la dihidroxiacetona quinasa de la bacteria *Citrobacter freundii* cepa CECT 4626 o procedente de cualquier microorganismo, o de un fragmento de dicha secuencia, o una secuencia de aminoácidos análoga, o una secuencia de aminoácidos que codifica para una variante, natural o artificial o de un fragmento de la misma.

4. Proteína quimérica según las reivindicación 1 **caracterizada** porque la secuencia conectora L de aminoácidos entre las secuencias de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa monomérica y dihidroxiacetona quinasa, es la secuencia Gln-Gly-Gln-Gly-Gln.

5. Proteína quimérica según la reivindicación 1 **caracterizada** por presentar la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

6. Procedimiento de obtención de la proteína quimérica según las reivindicaciones 1 a la 5, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- diseño de oligonucleótidos específicos conteniendo una secuencia conectora, preferentemente la secuencia Gln-Gly-Gln-Gly-Gln,
- amplificación por PCR por separado del gen *dhak*, dihidroxiacetona quinasa, de *Citrobacter freundii* CECT 4626 y de un gen de un enzima con actividad fructosa 1-6 bisfosfato aldolasa, preferentemente, el gen *fd* de *Staphylococcus carnosus*,
- introducción en los extremos 3' de la quinasa y 5' de la aldolasa de la secuencia conectora, preferentemente la secuencia Gln-Gly-Gln-Gly-Gln, y purificación de los fragmentos,
- amplificación por PCR de la secuencia de nucleótidos del Proteína quimérica de la invención, preferentemente la construcción DHAK-L-FDA, SEQ ID NO:1,
- introducción de la secuencia de nucleótidos del Proteína quimérica en un vector de expresión, transformación de una célula, ya sea eucariota o procariota, y producción y purificación de la proteína resultante, preferentemente la proteína de SEQ ID NO:2.

7. Secuencia de nucleótidos codificante de la proteína quimérica según las reivindicaciones 1 a la 5 **caracterizada** porque comprende:

- i) una secuencia de nucleótidos codificante de una dihidroxiacetona quinasa,
- ii) una secuencia de nucleótidos codificante de una aldolasa monomérica, preferentemente de *Staphylococcus carnosus*, y
- iii) una secuencia de nucleótidos codificante de una secuencia conectora L intercalada entre las secuencias i) y ii).

8. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7 **caracterizada** porque la secuencia de nucleótidos de la aldolasa es la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa monomérica de la bacteria *Staphylococcus carnosus* y la dihidroxiacetona quinasa es la dihidroxiacetona quinasa de la bacteria *Citrobacter freundii* cepa CECT 4626.

## ES 2 335 951 A1

9. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7 **caracterizada** porque la secuencia de nucleótidos de la aldolasa y de la quinasa pueden contener la secuencia completa o de un fragmento de dicha secuencia, o una secuencia de nucleótidos análoga, o una secuencia de nucleótidos que codifica para una variante, natural o artificial, o de un fragmento de la misma, procede de cualquier microorganismo.
- 5
10. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7 **caracterizada** porque la secuencia de nucleótidos de la quinasa procede de cualquier microorganismo.
11. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7 **caracterizada** porque la región conectora L es la secuencia
- 10 Gln-Gly-Gln-Gly-Gln.
12. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7 **caracterizada** por presentar la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1.
- 15
13. Vector de expresión **caracterizado** porque comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 12, preferentemente un plásmido.
14. Vector de expresión según la reivindicación 13 **caracterizado** porque comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1.
- 20
15. Célula o microorganismo transformado **caracterizado** porque comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 12 o un vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14.
16. Célula o microorganismo transformado según la reivindicación 15 **caracterizado** porque comprende la secuencia SEQ ID NO:1.
- 25
17. Uso de la proteína quimérica según las reivindicaciones 1 a la 5 en una reacción de adición aldólica a partir de una dihidroxiacetona donadora y un aldehído aceptor, para la obtención de nuevos compuestos químicos.
- 30
18. Uso de la proteína quimérica según la reivindicación 17 **caracterizado** porque el enzima presenta la secuencia SEQ ID NO:2.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

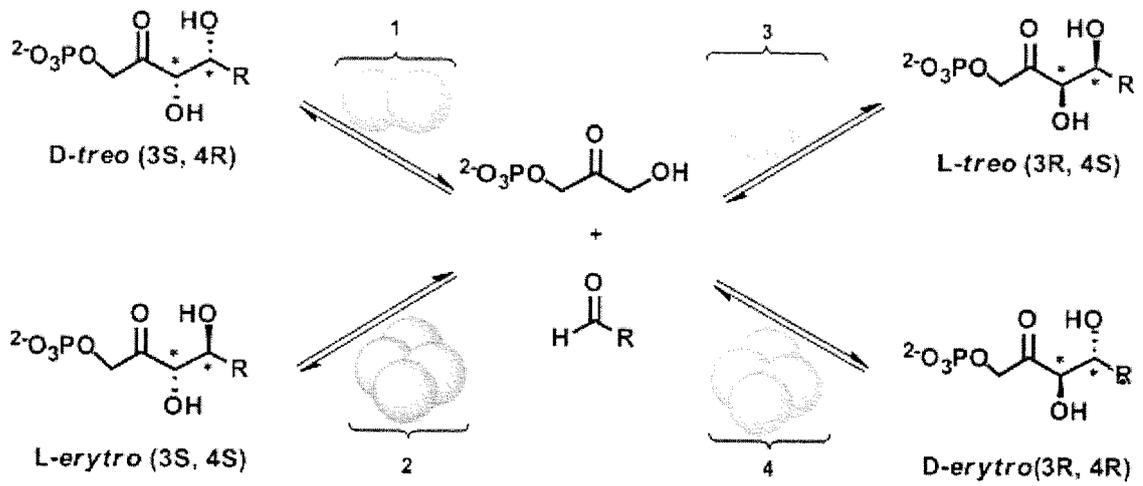


Figura 1

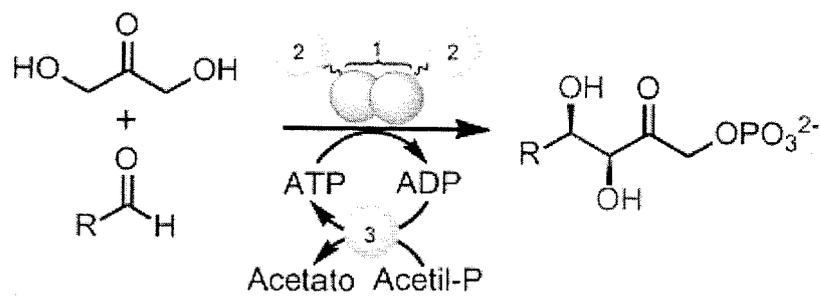


Figura 2

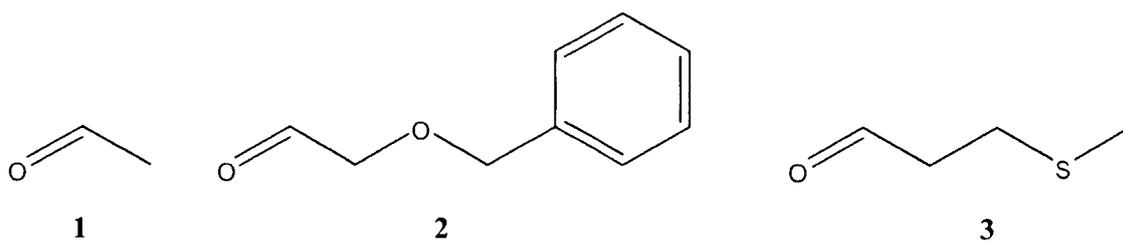


Figura 3

# ES 2 335 951 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> PROTEÍNA QUIMÉRICA ALDOLASA/QUINASA, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES

10 <130> P200701589

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 851

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Proteína de fusión aldolasa-DHAK

<220>

<221> CDS

30 <222> (1)..(851)

<220>

<221> misc\_feature

35 <222> (1)..(551)

<223> Fragmento del gen dihidroxiacetona quinasa de *Citrobacter freundii*

<220>

40 <221> misc\_feature

<222> (552)..(556)

<223> Región conectora

<220>

45 <221> misc\_feature

<222> (557)..(851)

50 <223> Fragmento del gen fructosa 1-6 bifosfato aldolasa de *Stafilococcus carnosus*

<400> 1

55 Ser Gln Phe Phe Phe Asn Gln Arg Thr His Leu Val Ser Asp Val Ile  
1 5 10 15

Asp Gly Thr Ile Ile Ala Ser Pro Trp Asn Asn Leu Ala Arg Leu Glu  
20 25 30

60 Ser Asp Pro Ala Ile Arg Ile Val Val Arg Arg Asp Leu Asn Lys Asn  
35 40 45

65 Asn Val Ala Val Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gly His Glu Pro Ala His  
50 55 60

# ES 2 335 951 A1

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

# ES 2 335 951 A1

	385	390	395	400
5	Leu Leu His Arg	Gln Gln Leu Pro Leu Asp	Asn Leu Ala Thr Leu Phe	
		405	410	415
	Ala Leu Ile Gly	Glu Arg Leu Thr Val Val Met	Gly Gly Ser Ser Gly	
		420	425	430
10	Val Leu Met Ser	Ile Phe Phe Thr Ala Ala Gly	Gln Lys Leu Glu Gln	
		435	440	445
15	Gly Ala Ser Val	Ala Glu Ser Leu Asn Thr	Gly Leu Ala Gln Met Lys	
		450	455	460
	Phe Tyr Gly Gly	Ala Asp Glu Gly Asp Arg	Thr Met Ile Asp Ala Leu	
		465	470	475
20	Gln Pro Ala Leu	Thr Ser Leu Leu Thr	Gln Pro Gln Asn Leu Gln Ala	
		485	490	495
25	Ala Phe Asp Ala	Ala Gln Ala Gly Ala Glu Arg	Thr Cys Leu Ser Ser	
		500	505	510
	Lys Ala Asn Ala	Gly Arg Ala Ser Tyr Leu Ser	Ser Ser Glu Ser Leu Leu	
		515	520	525
30	Gly Asn Met Asp	Pro Gly Ala His Ala Val Ala	Met Val Phe Lys Ala	
		530	535	540
35	Leu Ala Glu Ser	Glu Leu Gly Gln Gly Gln Gly	Gln Asn Gln Glu Gln	
		545	550	555
	Phe Asp Lys Ile	Lys Asn Gly Lys Gly Phe Ile	Ala Ala Leu Asp Gln	
		565	570	575
40	Ser Gly Gly Ser	Thr Pro Lys Ala Leu Lys Asp	Tyr Gly Val Glu Glu	
		580	585	590
45	Asn Glu Tyr Ser	Asn Asp Glu Glu Met Phe Asn	Leu Val His Asp Met	
		595	600	605
50	Arg Thr Arg Ile	Ile Thr Ser Pro Ala Phe Asn	Gly Glu Lys Ile Leu	
		610	615	620
	Gly Ala Ile Leu	Phe Glu Gln Thr Met Asp Arg	Glu Val Glu Gly Lys	
		625	630	635
55	Tyr Thr Gly Ser	Tyr Leu Ala Asp Lys Gly Ile	Val Pro Phe Leu Lys	
		645	650	655
60	Val Asp Lys Gly	Leu Ala Glu Glu Ala Asp	Gly Val Gln Leu Met Lys	
		660	665	670
	Pro Ile Pro Asp	Leu Asp Lys Leu Leu Asp Arg	Ala Asn Glu Arg Gly	
		675	680	685
65	Ile Phe Gly Thr	Lys Met Arg Ser Asn Ile Leu	Glu Asn Asn Lys Glu	
		690	695	700
	Ala Ile Glu Lys	Val Val Lys Gln Gln Phe	Glu Val Ala Lys Glu Ile	
		705	710	715
				720

# ES 2 335 951 A1

Ile Ala Ala Gly Leu Val Pro Ile Ile Glu Pro Glu Val Asn Ile Asn  
 725 730 735  
 5 Ala Lys Asp Lys Glu Ala Ile Glu Ala Asn Leu Ala Glu Ala Ile Lys  
 740 745 750  
 Ala Glu Leu Asp Asn Leu Lys Lys Asp Gln Tyr Val Met Leu Lys Leu  
 755 760 765  
 10 Thr Ile Pro Thr Lys Val Asn Ala Tyr Ser Glu Leu Ile Glu His Pro  
 770 775 780  
 15 Gln Val Ile Arg Val Val Ala Leu Ser Gly Gly Tyr Ser Arg Asp Glu  
 785 790 795 800  
 Ala Asn Lys Ile Leu Lys Gln Asn Asp Gly Leu Ile Ala Ser Phe Ser  
 805 810 815  
 20 Arg Ala Leu Val Ser Asp Leu Asn Ala Gln Gln Ser Asp Ala Glu Phe  
 820 825 830  
 25 Asn Glu Lys Leu Gln Glu Ala Ile Asp Thr Ile Phe Asp Ala Ser Val  
 835 840 845  
 Asn Lys Ala  
 850  
 30 <210> 2  
 <211> 851  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 40 <400> 2  
 Ser Gln Phe Phe Phe Asn Gln Arg Thr His Leu Val Ser Asp Val Ile  
 45 1 5 10 15  
 Asp Gly Thr Ile Ile Ala Ser Pro Trp Asn Asn Leu Ala Arg Leu Glu  
 20 25 30  
 50 Ser Asp Pro Ala Ile Arg Ile Val Val Arg Arg Asp Leu Asn Lys Asn  
 35 40 45  
 Asn Val Ala Val Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gly His Glu Pro Ala His  
 55 50 55 60  
 Val Gly Phe Ile Gly Lys Gly Met Leu Thr Ala Ala Val Cys Gly Asp  
 65 70 75 80  
 60 Val Phe Ala Ser Pro Ser Val Asp Ala Val Leu Thr Ala Ile Gln Ala  
 85 90 95  
 Val Thr Gly Glu Ala Gly Cys Leu Leu Ile Val Lys Asn Tyr Thr Gly  
 100 105 110  
 65 Asp Arg Leu Asn Phe Gly Leu Ala Ala Glu Lys Ala Arg Arg Leu Gly



# ES 2 335 951 A1

	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Glu	Ser	Leu	Asn	Thr	Gly	Leu	Ala	Gln	Met	Lys	
	450						455					460					
5	Phe	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Glu	Gly	Asp	Arg	Thr	Met	Ile	Asp	Ala	Leu	
	465					470					475					480	
	Gln	Pro	Ala	Leu	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Gln	Pro	Gln	Asn	Leu	Gln	Ala	
10					485					490					495		
	Ala	Phe	Asp	Ala	Ala	Gln	Ala	Gly	Ala	Glu	Arg	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	
				500					505					510			
15	Lys	Ala	Asn	Ala	Gly	Arg	Ala	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ser	Glu	Ser	Leu	Leu	
			515					520					525				
	Gly	Asn	Met	Asp	Pro	Gly	Ala	His	Ala	Val	Ala	Met	Val	Phe	Lys	Ala	
20		530					535					540					
	Leu	Ala	Glu	Ser	Glu	Leu	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Glu	Gln	
	545					550					555					560	
25	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Gly	Lys	Gly	Phe	Ile	Ala	Ala	Leu	Asp	Gln	
					565					570					575		
	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Pro	Lys	Ala	Leu	Lys	Asp	Tyr	Gly	Val	Glu	Glu	
30				580					585					590			
	Asn	Glu	Tyr	Ser	Asn	Asp	Glu	Glu	Met	Phe	Asn	Leu	Val	His	Asp	Met	
			595					600					605				
35	Arg	Thr	Arg	Ile	Ile	Thr	Ser	Pro	Ala	Phe	Asn	Gly	Glu	Lys	Ile	Leu	
	610						615					620					
	Gly	Ala	Ile	Leu	Phe	Glu	Gln	Thr	Met	Asp	Arg	Glu	Val	Glu	Gly	Lys	
40					630					635					640		
	Tyr	Thr	Gly	Ser	Tyr	Leu	Ala	Asp	Lys	Gly	Ile	Val	Pro	Phe	Leu	Lys	
					645					650					655		
45	Val	Asp	Lys	Gly	Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Asp	Gly	Val	Gln	Leu	Met	Lys	
				660					665					670			
	Pro	Ile	Pro	Asp	Leu	Asp	Lys	Leu	Leu	Asp	Arg	Ala	Asn	Glu	Arg	Gly	
			675					680					685				
50	Ile	Phe	Gly	Thr	Lys	Met	Arg	Ser	Asn	Ile	Leu	Glu	Asn	Asn	Lys	Glu	
	690						695					700					
	Ala	Ile	Glu	Lys	Val	Val	Lys	Gln	Gln	Phe	Glu	Val	Ala	Lys	Glu	Ile	
55						710					715					720	
	Ile	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Pro	Ile	Ile	Glu	Pro	Glu	Val	Asn	Ile	Asn	
					725					730					735		
60	Ala	Lys	Asp	Lys	Glu	Ala	Ile	Glu	Ala	Asn	Leu	Ala	Glu	Ala	Ile	Lys	
				740					745					750			
	Ala	Glu	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	Lys	Asp	Gln	Tyr	Val	Met	Leu	Lys	Leu	
65			755					760					765				

# ES 2 335 951 A1

	Thr	Ile	Pro	Thr	Lys	Val	Asn	Ala	Tyr	Ser	Glu	Leu	Ile	Glu	His	Pro
	770						775					780				
5	Gln	Val	Ile	Arg	Val	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Gly	Tyr	Ser	Arg	Asp	Glu
	785					790					795					800
10	Ala	Asn	Lys	Ile	Leu	Lys	Gln	Asn	Asp	Gly	Leu	Ile	Ala	Ser	Phe	Ser
					805					810					815	
15	Arg	Ala	Leu	Val	Ser	Asp	Leu	Asn	Ala	Gln	Gln	Ser	Asp	Ala	Glu	Phe
				820					825					830		
20	Asn	Glu	Lys	Leu	Gln	Glu	Ala	Ile	Asp	Thr	Ile	Phe	Asp	Ala	Ser	Val
			835					840					845			
25	Asn	Lys	Ala													
			850													
30																
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 335 951

② Nº de solicitud: 200701589

③ Fecha de presentación de la solicitud: 08.06.2007

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SANCHEZ-MORENO I et al. Multienzyme system for dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolasa catalyzed C-C bond formation from dihydroxyacetone. Chemical Communications. 2004, páginas 1634-1635, todo el documento.	1-16
A	TAKASAKI Y et al. Studies on chimeric fusion proteins od humo aldolase isozymes A and B. Protein Engineering. 1992, Vol. 5(1), páginas 101-104, todo el documento.	1-16
A	BREUER M and HAUER B. Carbon-carbon coupling in biotransformation. Current Opinion in Biotechnology. 2003, Vol 14, páginas 570-576, todo el documento.	1-16
A	FESSNER WD and HELAINE V. Biocatalytic synthesis of hydroxylated natural products using aldolases and related enzymes. Current Opinion in Biotechnology. 2001, Vol 12, páginas 574-586, todo el documento.	1-16
A	US 5683897 A1 (WOLF-DIETER FESSNER). 04.11.1997, página 1, columna 1, línea 1 - columna 2, línea 63; reivindicación 1.	1-16

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

17.03.2010

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**A61K 31/711** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

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

C07K, A61K, C07H, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.03.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	1-16	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones		<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	1-16	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones		<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**Consideraciones:**

En la realización del IET, no se ha tenido en cuenta que en la lista de secuencias aportada, la SEQ ID NO: 1, que según el solicitante se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína quimérica de la invención, es en realidad la secuencia de los aminoácidos que forman dicha proteína y de hecho es igual a la SEQ ID NO: 2. Debido a que el objeto técnico de la invención lo constituye una proteína quimérica, se ha considerado que la SEQ ID NO: 1 estaría formada por la secuencia de nucleótidos que codificaría para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SANCHEZ-MORENO I et al. Chemical Communications. 2004, páginas 1634-1635.	2004
D02	TAKASAKI Y et al. Protein Engineering. 1992, Vol. 5(1), páginas 101-104.	1992
D03	BREUER M and HAUER B. Current Opinion in Biotechnology. 2003, Vol 14, páginas 570-576.	2003
D04	FESSNER WD and HELAINE V. Current Opinion in Biotechnology. 2001, Vol 12, páginas 574-586.	2001
D05	US 5683897	04-11-1997

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga una proteína quimérica, que es igual o contiene la secuencia de aminoácidos definida como SEQ ID NO: 2; y, que reúne en una cadena polipeptídica dos enzimas, una aldolasa y una quinasa, unidas por una secuencia conectora L (reivindicaciones 1-5). Se refiere también al procedimiento de obtención de dicha proteína, mediante el diseño de los oligonucleótidos específicos que codifican para la secuencia conectora L, introduciéndolos entre los extremos 3' del gen de la quinasa, preferentemente de *Citrobacter freundii* CECT 4626, y 5' del gen de la aldolasa, preferentemente de *Staphylococcus carnosus*; así como a la secuencia de nucleótidos (ver consideraciones sobre la Base de la Opinión) que codifica para la proteína quimérica de la invención definida como SEQ ID NO: 1 (reivindicaciones 6-16), y al uso de esta proteína para obtener nuevos compuestos químicos (reivindicaciones 17-18)

El documento D01 divulga un sistema multienzimático, para obtención de aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato, compuesto por una dihidroxiacetona-quinasa recombinante, proveniente de *Citrobacter freundii*, fuculosa-1-fosfato-aldolasa y una acetato-quinasa para rentabilizar la formación de enlaces C - C, en un proceso de biotransformación catalizado por una aldolasa dependiente de dihidroxiacetona-fosfato y un aldehído (ver todo el documento)

El documento D02 divulga la construcción, por tecnología de ADN recombinante, de proteínas quiméricas de fusión, compuestas por aldolasas humanas A y B (ver todo el documento)

El documento D03 divulga una revisión de estudios realizados sobre el acoplamiento de los enlaces C - C en procesos de biotransformación, resaltando el potencial industrial de las enzimas que catalizan estas reacciones, especialmente aldolasas (incluyendo aldolasas DHAP) y quetolasas. Se refiere también a la obtención, por técnicas de biotecnología, de estas enzimas y otras similares mejorando su rendimiento (ver todo el documento)

El documento D04 se refiere a moléculas, obtenidas por síntesis, que contienen centros quirales hidroxilados y a su estudio como importantes dianas para biocatálisis; especialmente, a enzimas que catalizan la formación de enlaces C - C, como las aldolasas DHAP (fructosa 1,6 bifosfato aldolasa), que son de gran utilidad en biotransformaciones para preparación de intermediarios para la síntesis de compuestos biológicos de interés como serían nuevos fármacos (ver todo el documento)

El documento D05 divulga un procedimiento para la preparación enzimática de dihidroxiacetona fosfato, de alta pureza química y rendimiento a partir de sustancias asequibles y catálisis enzimática bajo condiciones moderadas, empleando una enzima glicerín-fosfato-oxidasa y otra enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (ver página 1, columna 1, línea 1 - columna 2, línea 63; reivindicación 1)

Hoja adicional

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

1.1. REIVINDICACIONES 1-16

El objeto técnico de la presente solicitud es una proteína quimérica que reúne en una cadena polipeptídica dos enzimas, una aldolasa y una quinasa, unidas por una secuencia conectora; un procedimiento para su obtención por técnicas de ADN recombinante y su uso para obtener nuevos compuestos químicos.

El documento D01 se considera el mas cercano al estado de la técnica, ya que anticipa un sistema multienzimático, para obtención de aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato, compuesto, entre otras enzimas, por una dihidroxiacetona-quinasa recombinante proveniente de *Citrobacter freundii*. Por otra parte, el documento D02 anticipa una proteína quimérica de fusión, compuesta por aldolasas humanas A y B, preparadas por tecnología de ADN recombinante (ver todo el documento),

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica una proteína que reúna una aldolasa y una quinasa, unidas por una secuencia conectora y que corresponda a la SEQ ID NO: 2.

En consecuencia, según lo expuesto en los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-16 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Los documentos D03-D05, se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.