



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 347 398**

② Número de solicitud: 200801767

⑤ Int. Cl.:
C12N 9/18 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **11.06.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **28.10.2010**

Fecha de la concesión: **02.09.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **15.09.2011**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la patente:
15.09.2011

⑲ Titular/es: **Universidade da Coruña
O.T.R.I. - Campus de Elviña, s/n
15071 A Coruña, ES
Universidad de Vigo**

⑳ Inventor/es: **González Siso, María Isabel;
Cerdán Villanueva, María Esperanza;
López López, Olalla;
Rúa Rodríguez, María Luisa;
Pastrana Castro, Lorenzo y
Fuciños Gonzalez, Juan Pablo**

㉑ Agente: **Arias Sanz, Juan**

㉒ Título: **Esterasa termófila de *Thermus thermophilus*.**

㉓ Resumen:

Esterasa termófila de *Thermus thermophilus*.

La invención se relaciona con una proteína termófila con actividad esterasa. Dicha proteína, del organismo *Thermus thermophilus*, se expresa en bacterias y levaduras recombinantes, en particular en *E.coli*, *K.lactis* y *S.cerevisiae*. Dicha esterasa se expresa en forma de proteína de fusión con una secuencia señal que permite la secreción al medio de cultivo y, además, se encuentran operativamente ligadas a un promotor inducible. Las cepas recombinantes tienen las ventajas de que (i) su cultivo es mucho más fácil que el del organismo termófilo del que procede la enzima y (ii) permiten obtener un mayor número de unidades enzimáticas por litro de cultivo que las cepas termófilas originales.

ES 2 347 398 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Esterasa termófila de *Thermus thermophilus*.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a enzimas termófilas, en particular a esterases termófilas, de *Thermus thermophilus* que pueden expresarse en organismos mesófilos.

10 **Antecedentes de la invención**

Las enzimas son catalizadores muy potentes, selectivos y muy específicos. El término esterasa es un término general para denotar una enzima de tipo hidrolasa que hidroliza enlaces de tipo éster para producir alcoholes y ácidos carboxílicos.

15 Las aplicaciones que tienen las hidrolasas, y en particular las esterases, en la industria actual son múltiples, por ejemplo, el ibuprofeno, un agente antiinflamatorio no esteroideo se ha sintetizado mediante una hidrólisis estereoselectiva de su metil-éster mediante el empleo de una carboxiesterasa. La mayor aplicación industrial de las hidrolasas, en particular las esterases, incluyen la industria de detergentes donde se emplean para descomponer materia grasa en sustancias hidrofílicas fácilmente eliminables.

20 El mayor requisito para una enzima comercial es su estabilidad térmica porque la desnaturalización térmica es una causa común de la inactivación enzimática. Adicionalmente, mediante el incremento en la termoestabilidad enzimática se podrían llevar a cabo reacciones enzimáticas a mayor temperatura, lo que podría ayudar para aumentar los ratios de conversión, la solubilidad del sustrato y reducir la posibilidad de crecimiento microbiano y la viscosidad en el medio de reacción. En el procesado de los alimentos, desde un punto de vista de higiene, las reacciones enzimáticas a altas temperaturas son menos peligrosas para la contaminación por bacterias. En la descomposición de grasas y aceites, actualmente se emplean métodos en los que las grasas y aceites se ponen en contacto con vapor a temperaturas de aproximadamente 250°C y a presiones de aproximadamente 50 atmósferas, lo que implica la necesidad de disponer de instalaciones adecuadas para llevar a cabo tales reacciones. Grasas como el ácido palmítico o el ácido esteárico son sólidas a temperatura ambiente y tienen puntos de fusión de aproximadamente 65°C. Por ello, las reacciones de hidrólisis deben llevarse a cabo a temperaturas por encima de dicho punto de fusión.

35 La disponibilidad de esterases termofílicas permitiría operar a altas temperaturas, con el lógico incremento de la velocidad de reacción y una más fácil solubilización de los sustratos, aspecto que constituye con frecuencia un factor limitante en algunas aplicaciones de este tipo de enzimas (p.ej. reacciones de síntesis en medios con bajo contenido en agua).

40 Los microorganismos extremófilos han despertado un gran interés durante los últimos años, debido a la elevada estabilidad térmica, resistencia a desnaturalizantes químicos y pHs extremos de sus enzimas, que las hacen especialmente adecuadas para su uso en procesos de biotransformación en condiciones extremas de pH, salinidad y temperatura. Los microorganismos termófilos crecen a temperaturas superiores a 45°C, y en algunos casos (hipertermófilos) incluso por encima de 90°C.

45 Aunque los organismos termófilos pueden ser buenos candidatos en producir enzimas termoestables, muchas veces no resulta práctico debido al bajo rendimiento y al equipo de fermentación de alta temperatura que sería necesario emplear.

50 La producción de enzimas de interés biotecnológico procedentes de microorganismos termófilos extremos suele efectuarse mediante su clonado y expresión a alto nivel en una bacteria o levadura modelo fácilmente manipulable, tal como *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, existen una gran cantidad de enzimas termófilas cuya complejidad de síntesis hace imposible su obtención en forma activa en estos organismos modelo (Hidalgo, A. y cols., 2004. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 70 (7): 3839-3844). Este es el caso frecuente de enzimas hetero-oligoméricas o el de aquellas enzimas que requieren la incorporación de un cofactor en el proceso de síntesis, que suele requerir la ayuda de chaperonas específicas que mantienen la estructura de la enzima en posición abierta para la entrada del mencionado cofactor. En tales casos, que pueden llegar a constituir hasta el 50% de las enzimas codificadas en cualquier termófilo, la alternativa evidente es la de utilizar en la producción un microorganismo termófilo relacionado evolutivamente con aquel del que procede la enzima de interés.

60 Las bacterias del género *Thermus* spp. se caracterizan por su capacidad para crecer a altas temperaturas y por su facilidad de manipulación genética, única entre organismos termófilos extremos. Las bacterias del género *Thermus* spp. tienen gran potencial de utilización como sistemas de obtención de enzimas termoestables mediante selección funcional a elevadas temperaturas, existiendo algunos ejemplos de ello en la literatura científica (Fridjonsson y cols., 2002. J Bacteriol. Vol. 184:3385-3391; Brouns y cols., 2005. J Biol Chem. Vol. 280:11422-31). No obstante, la aplicación de estos métodos depende de la generación de una cepa de *Thermus* spp. mutante que requiera de la actividad funcional de la enzima a termoestabilizar para su crecimiento, siendo muy limitadas en la actualidad las metodologías existentes para la obtención de dichos mutantes.

ES 2 347 398 B1

La solicitud de patente internacional WO9725058 describe el aislamiento, caracterización y purificación de esterases de *Thermus* sp. T351 (ATCC 31674). Dichas enzimas pueden expresarse en organismos mesófilos tales como *Escherichia coli* a partir de la infección de dichas células con vector de expresión que codifica para dicha enzima, tal como el fago lambda. Por otro lado, el documento WO2006082059 describe la expresión de una enzima con actividad esterasa de *Alicyclobacillus acidocaldarius* en vectores de expresión que comprenden la secuencia de nucleótidos que codifican dicha enzima en forma de proteína de fusión. Dicha esterasa es particularmente útil como marcador de actividad proteica en sistemas de síntesis de proteínas libres de células (cell-free translation system) o en sistemas *in vivo*, tales como *E. coli* o células de levadura.

Por otra parte, Fuciños P., *et al* (J Biotechnology, (2005) 117; 233-241) describen la identificación de enzimas extracelulares con actividad lipasa/esterasa producidas en cultivos de *Thermus thermophilus* HB27. Dichos autores describen la purificación parcial y caracterización bioquímica preliminar de las mismas a nivel de actividad y estabilidad a altas temperaturas (80-90°C). Sin embargo, el grado de purificación de dichas enzimas es muy bajo (factor de purificación de 4 con respecto al homogeneizado celular) y por otra parte, dichos autores no describen la secuencia aminoacídica de dichas proteínas.

Por tanto, existe la necesidad de encontrar nuevas enzimas termófilas con actividad esterasa que presenten estabilidad a elevadas temperaturas y que puedan expresarse en organismos mesófilos.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado con actividad esterasa que comprende la secuencia de aminoácidos identificada en la SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una proteína de fusión que comprende

i) un polipéptido según la invención; y

ii) un péptido heterólogo.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido o una proteína de fusión según la invención.

En otro aspecto, la invención también se relaciona con una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos según la invención.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos o una construcción génica según la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula que comprende una secuencia de nucleótidos, una construcción génica o un vector de expresión según la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido según la invención o una proteína de fusión según la invención.

En otro aspecto, la invención también se refiere a un procedimiento para la obtención de un polipéptido con actividad esterasa que comprende cultivar una célula según la invención bajo condiciones que permiten la producción de dicho polipéptido y, si se desea, recuperar dicho polipéptido.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con el uso de un polipéptido según la invención o una proteína de fusión según la invención en la elaboración de una composición detergente.

Finalmente, la invención se refiere a un método para la modificación de grasas o aceites que comprende poner en contacto un polipéptido o una proteína de fusión según la invención con una grasa o aceite en condiciones donde dicho polipéptido o proteína de fusión pueda hidrolizar dicha grasa o aceite.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra unas curvas de actividad esterasa y biomasa en el medio de cultivo para el fragmento del polipéptido de la invención que carece de los aminoácidos 1-16 del extremo N-terminal (Figura 1 A) y del fragmento del polipéptido de la invención que carece de los aminoácidos 1-26 del extremo N-terminal (Figura 1B), ambos expresados en la levadura *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140 junto con la señal de secreción alfa-mating factor de *K. lactis*.

La Figura 2 muestra unas curvas de actividad esterasa y biomasa en el medio de cultivo para el fragmento del polipéptido de la invención que carece de los aminoácidos 1-16 del extremo N-terminal expresado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 junto con la secuencia de la señal de secreción del alfa-mating factor de *S. cerevisiae*.

En la Figura 3 se muestra una electroforesis en gel SDS-PAGE del medio de cultivo postincubado (carril 2), concentrado por ultrafiltración (carril 3) y el eluido de la cromatografía de afinidad (carril 4). El carril 1 es el marcador de Pm (Da). El tratamiento con la glicosidasa EndoH resulta en una única banda (carril 5).

5 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido aislado, de aquí en adelante polipéptido de la invención, con actividad esterasa que comprende la secuencia de aminoácidos identificada en la SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

El término “esterasa”, tal como aquí se emplea se refiere a una enzima de tipo hidrolasa que hidroliza enlaces de tipo éster.

Tal como aquí se utiliza, la expresión “variante funcionalmente equivalente” de una secuencia de aminoácidos se refiere a una secuencia de aminoácidos que (i) es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de aminoácidos y (ii) ejerce la misma función (e.g. que tiene actividad esterasa).

Una secuencia de aminoácidos es sustancialmente homóloga a una secuencia de aminoácidos determinada cuando presenta un grado de identidad de, al menos, un 70%, ventajosamente de, al menos, un 75%, típicamente de, al menos, un 80%, preferentemente de, al menos, un 85%, más preferentemente de, al menos, un 90%, aún más preferentemente de, al menos, un 95%, 97%, 98% ó 99%, respecto a dicha secuencia de aminoácidos determinada. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc. Así, la expresión “variante funcionalmente equivalente”, tal como aquí se utiliza, significa que el polipéptido o proteína en cuestión mantiene, al menos, una de las funciones del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, preferentemente, al menos, una función relacionada con la hidrólisis, en particular, que mantiene la actividad esterasa. La actividad esterasa del polipéptido de la invención puede ser determinada mediante el empleo de métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, a modo simplemente ilustrativo, la actividad esterasa de dicho polipéptido se puede determinar mediante métodos tales como los ensayos descritos en los Ejemplos 1-3 donde se describe que para la medida de actividad lipolítica, se emplea el método descrito por Fuciños *et al* (2005) (J. Biotechnol. 117:233-241).

En una realización particular, el polipéptido de la invención es una variante que presenta una o más inserciones, deleciones y/o modificaciones de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y mantiene la capacidad esterasa.

En otra realización particular, dicha variante es un fragmento del polipéptido de la invención. El término “fragmento” tal como se utiliza en la presente descripción se refiere a un polipéptido que comprende una porción de dicho polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, es decir, una secuencia de aminoácidos contiguos comprendida dentro de dicha SEQ ID NO: 1. Para su empleo en la presente invención dicho fragmento debe ser funcionalmente equivalente a dicho polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, es decir, debe tener actividad esterasa. En una realización particular de la invención, dicha esterasa es una esterasa termófila. En una realización concreta, dicho fragmento comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 en la que se han eliminado los 16 ó 26 aminoácidos del extremo N-terminal, es decir, las putativas señal de secreción (aminoácidos 1-16) y hélice transmembrana (aminoácidos 6-26), respecto a la secuencia aminoacídica previamente mencionada.

El término “termófilo” tal como aquí se emplea se refiere a una enzima, en particular, una esterasa que puede soportar condiciones de temperatura relativamente altas, es decir, que es estable y es capaz de realizar su actividad en condiciones de temperatura elevadas, en particular a una temperatura igual o superior a 50°C, más preferiblemente a una temperatura comprendida entre 60 y 90°C. En una realización particular, dicha enzima proviene de un organismo termófilo, en particular de *Thermus thermophilus* HB27.

Adicionalmente, el polipéptido de la invención puede formar parte de una proteína de fusión. En este sentido, a modo ilustrativo, no limitativo, dicha proteína de fusión puede contener una región A constituida por un primer polipéptido que comprende el polipéptido de la invención unido a una región B que comprende un segundo péptido. Dicho segundo péptido puede ser cualquier péptido apropiado, por ejemplo, un péptido señal de secreción extracelular.

Dicha región B puede estar unida a la región amino-terminal de dicha región A, o bien, alternativamente, dicha región B puede estar unida a la región carboxilo-terminal de dicha región A. Ambas regiones A y B pueden estar unidas directamente o a través de un péptido espaciador (linker) entre dichas regiones A y B. La proteína de fusión puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión en células hospedadoras apropiadas.

ES 2 347 398 B1

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una proteína de fusión que comprende

i) un polipéptido según la invención; y

5 ii) un péptido heterólogo.

En una realización particular de la invención, dicho péptido heterólogo es un péptido señal de secreción extracelular, es decir, una secuencia que permita la secreción de dicha proteína de fusión al medio extracelular. Por péptido señal de secreción extracelular, según se usa en el contexto de la presente invención, se entiende todo péptido que
10 comprende o que consiste en una secuencia señal que se encuentra de forma natural asociada a una proteína distinta al polipéptido según la invención que se desea expresar. Así, la presente invención contempla el uso de secuencias señal derivadas de cualquier péptido secretado, incluyendo tanto aquellas secuencias señal pertenecientes al mismo organismo cuyo polipéptido queremos expresar pero cuya función es promover la secreción al medio de proteínas distintas al polipéptido de la invención, así como de secuencias señal que derivan de otros microorganismos y que se encargan de promover la secreción al medio de cualquier enzima. Así, ejemplos ilustrativos pero no limitativos de secuencias señal que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen polipéptidos que contienen o que consisten en la secuencia señal del preprofactor α de *S. cerevisiae* y de otras especies de los géneros *Kluyveromyces*, *Pichia*, y *Hansenula*, la secuencia señal de la toxina *killer* de *K. lactis*, la secuencia señal de la glucoamilasa II de *S. diastaticus*, la secuencia señal de la glucoamilasa de *C. albicans*, la secuencia señal de la fosfatasa de *S. cerevisiae*,
20 la secuencia señal de la toxina *killer* de 128 kDa de *S. cerevisiae*, la secuencia señal de la invertasa de *S. cerevisiae*, así como secuencias aleatorias que son conocidas por su capacidad por reemplazar funcionalmente secuencias señales nativas de *E. coli*, tal y como han sido descritas por Kaiser, C. *et al.* (Science, 1987, 235:312-317). Así, ejemplos ilustrativos, no limitativos de secuencias señal de *E. coli*, incluyen la proteína MBP (maltose-binding protein), la proteína de unión a ribosa RBP (ribose-binding protein), la fosfatasa alcalina y el péptido señal OmpA así como otras secuencias señal que pueden ser identificadas usando los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo por Gallicioti, G. *et al.* J. Membrane Biology, 183:175-182). En una forma de realización preferida, cuando la célula a transformar es *S. cerevisiae*, la proteína de fusión de la invención comprende una secuencia que codifica para la secuencia señal alfa-mating factor de *S. cerevisiae* fusionado a través de su extremo 3' y en el mismo marco de lectura con la secuencia que codifica para el polipéptido de la invención. En otra realización preferida, cuando la célula a transformar es *K. lactis*, la proteína de fusión de la invención comprende una secuencia que codifica para la secuencia señal alfa-mating factor domain de *K. lactis* fusionado a través de su extremo 3' y en el mismo marco de lectura con la secuencia que codifica para el polipéptido de la invención.
30

El polipéptido de la invención o la proteína de fusión de la invención puede incluir, además, una secuencia aminoacídica útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión de la invención. Dicha secuencia estará situada en una región de la proteína de fusión de la invención que no afecte adversamente a la funcionalidad del polipéptido de la invención. Prácticamente cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser utilizada para aislar o purificar una proteína de fusión (denominadas genéricamente péptidos etiqueta o "tag") puede estar presente en dicha proteína de fusión de la invención. A modo ilustrativo, no limitativo, dicha secuencia aminoacídica útil para aislar o purificar una
40 proteína de fusión puede ser, por ejemplo, una cola de argininas (Arg-tag), una cola de histidinas (His-tag), FLAG-tag, Strep-tag, un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag, SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, etc. (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2003), 60:523-525), β -galactosidasa, VSV-glicoproteína, etc. En una realización preferida de la invención, dicho péptido de purificación se selecciona entre un péptido Flag o una cola de polihistidinas.
45

En otro aspecto, la invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos, de aquí en adelante secuencia de nucleótidos de la invención, que codifica un polipéptido o una proteína de fusión según la invención. Por razones de simplicidad, bajo la denominación "secuencia de nucleótidos de la invención" se incluyen la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención, es decir, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, así como una secuencia de nucleótidos que codifica una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.
50

En otro aspecto, la invención se refiere a una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos según la invención. En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos o una construcción génica según la reivindicación.
55

El término "vector de expresión" se refiere a una construcción de ADN replicativo utilizado para expresar ADN que codifica el polipéptido de la invención o la proteína de fusión de la invención y que incluye una unidad transcripcional que comprende un ensamblaje de (1) elemento/s genético/s que tienen un papel regulatorio en la expresión génica, por ejemplo, promotores, operadores o "enhancers" (aumentadores), operativamente unidos a (2) una secuencia de ADN que codifica el polipéptido o la proteína de fusión de la invención que es transcrito a ARN mensajero y traducido a proteína y (3) secuencias apropiadas de iniciación y terminación de latranscripción y traducción.
60

Preferentemente, la invención contempla el uso de vectores que puedan ser propagados tanto en bacteria como en levadura.
65

ES 2 347 398 B1

En una realización particular de la invención, cuando la célula es una célula procariota, tal como una bacteria, vectores adecuados según la invención son, por ejemplo, los vectores pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 (Messing, 1983. Meth. in Enzymology 101:20-77; Vieira y Messing, 1982. Gene 19:259-268), Bluescript (Stratagene, La Jolla, California) y sus derivados, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, CoIE1, pCRI, RP4, pNH8A, pNH16a, pNH18a. En una realización particular de la invención, cuando dicha bacteria es *E. coli*, dicho vector es el plásmido pET, en particular, el plásmido pET21d. Los genes clonados en dicho plásmido se transcriben bajo el control del promotor del bacteriófago T7, cuando se activa la T7 RNA polimerasa en la célula huésped. La expresión se induce con IPTG, el cual remueve al represor del operador para que se lleve a cabo la transcripción y se promueva la expresión de la proteína de interés.

Adicionalmente, ejemplos ilustrativos de vectores adecuados para la presente invención cuando dicha célula a transformar es una célula de levadura son los siguientes:

- Plásmidos autónomos multicopia: Estos plásmidos contienen secuencias que permiten la generación de múltiples copias de dichos vectores. Estas secuencias pueden ser las denominadas 2μ , como la que aparece en los plásmidos episomales (YE_p o “yeast episomal plasmids”) o secuencias tipo ARS, como las que aparecen en los plásmidos de replicación (YR_ps o “yeast replication plasmids”). Ejemplos de vectores basados en este tipo de plásmidos son p426GPD, p416GPD, p426TEF, p423GPD, p425GPD, p424GPD o p426GAL, YE_p24 y YE_plac.
- Plásmidos autónomos de una única copia: Plásmidos que contienen la secuencia autónoma de replicación ARS1 y una secuencia centromérica (CEN4). Este tipo de plásmidos incluye los plásmidos centroméricos (YC_ps o “yeast centromere plasmids”).
- Plásmidos de integración: Plásmidos que son capaces de integrarse en el genoma de la célula que los hospeda. Este tipo de plásmidos incluye plásmidos de integración (YI_ps o “yeast integrating plasmids”). Ejemplos de vectores basados en este tipo de plásmidos son pRS303, pRS304, pRS305 o pRS306 y similares.

En una realización particular de la invención, cuando la célula transformada es una célula de levadura, en particular *Kluyveromyces lactis*, el vector de expresión es el plásmido pKLAC1.

La elección de un promotor y otro/s elemento/s regulatorios generalmente varía en función de la célula huésped utilizada. Promotores adecuados en el contexto de la presente invención incluyen promotores constitutivos que promueven la expresión de las secuencias asociadas a ellas de forma constante y promotores inducibles, que requieren de un estímulo externo para promover la transcripción de las secuencias asociadas a ellos.

Promotores útiles para la realización de la presente invención incluyen:

- Promotores constitutivos como por ejemplo, el promotor de la alcohol deshidrogenasa (ADH1), el promotor del factor de elongación 1 alfa (TEF) y el promotor del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa (TPI), el promotor de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa (GPK), el promotor MRP7 y el promotor de la alcohol oxidasa (AOX1).
- Promotores inducibles como por ejemplo el promotor de la metalotioneina (CUP1) cuya expresión se regula mediante adición de cobre al medio de cultivo, el promotor del gen que codifica el gen FUS1 o el gen FUS2, cuya expresión se activa en presencia de feromonas (el factor α) según se describen en US5063154, el promotor TET cuya expresión se regula en presencia de tetraciclinas, los promotores GAL1- 10, GALL, GALS que se activan en presencia de galactosa, el promotor VP16-ER, inducible por estrógenos, y el promotor de la fosfatasa (PH05) cuya expresión se activa en presencia de fosfato y el promotor de la proteína de choque térmico HSP150, cuya expresión se activa a elevada temperatura.
- Promotores reprimibles como por ejemplo el promotor del gen de la enolasa (ENO-1) de *S. cerevisiae* cuya expresión se puede reprimir cuando se hace crecer el microorganismo en una fuente de carbono no fermentable así como promotores cuya expresión está sujeta a represión por glucosa, de forma que la expresión se verá reprimida cuando parte de la lactosa se ha hidrolizado y comienza a aumentar la concentración de glucosa en el medio, el promotor de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *S. cerevisiae* y el promotor de la galactoquinasa (GAL1). Preferiblemente, el promotor que es reprimible por glucosa es el promotor del gen ADH2.

En una realización particular, cuando la célula a transformar con dicho vector o construcción de la invención es una bacteria, dicho promotor es el sistema promotor beta-lactamasa y lactosa (Chang *et al.*, Nature 275:615, 1978), el promotor T7 RNA polimerasa (Studier *et al.*, Meth. Enzymol. 185:60-89, 1990), el promotor lambda (Elvin *et al.*, Gene 87:123-126, 1990), el promotor trp (Nichols and Yanofsky, Meth. in Enzymology 101:155, 1983) y el promotor tac (Russell *et al.*, Gene 20:231, 1982).

En una realización más particular de la invención, dicho promotor es un promotor inducible. En una realización más particular, dicho promotor es un promotor inducible por galactosa, lactosa o por IPTG. En una realización preferida, dicho promotor es el promotor de la beta-galactosidasa de forma que las enzimas se secretan al medio de cultivo cuando las células transformadas crecen en presencia de un inductor como galactosa o lactosa. En otra realización particular de la invención, dicho promotor es un promotor que se reprime en presencia de glucosa.

La invención también contempla el uso de aumentadores de la expresión. En una realización particular, dichos aumentadores de la expresión son aumentadores específicos de levaduras (los denominados UAS o “upstream activating sequences”) con el fin de regular la expresión del polipéptido o proteína de fusión de la invención. Alternativamente, se pueden utilizar promotores sintéticos híbridos que resultan de la unión de un UAS con la región de activación de la transcripción de otro promotor. Ejemplos de promotores híbridos incluyen la región reguladora del gen ADH unido a la región de activación del promotor del gen GAP, así como promotores que comprenden las secuencias reguladoras de los promotores de los genes ADH2, GAL4, GAL10, y PHO5 combinadas con las regiones de activación de la transcripción de genes que codifican enzimas glicolíticas, tales como GAP o piruvato quinasa. Adicionalmente, cuando la célula a transformar es una célula de levadura, los promotores de levadura pueden contener promotores de otros orígenes que tienen la habilidad de unirse al RNA de levadura y de iniciar la transcripción.

En otra forma de realización, el vector de expresión de la invención incorpora un terminador transcripcional en dirección 3' de la secuencia que codifica para el polipéptido o la proteína de fusión de la invención. Terminadores transcripcionales preferidos que pueden ser incorporados incluyen los terminadores que se encuentran en el gen de la enolasa de *S.cerevisiae*, en el gen CYC1 de *S.cerevisiae* y en el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

En general, todos los vectores mencionados en Sikorski (“Extrachromosomal cloning vectors of *Saccharomyces cerevisiae*”, in Plasmid, A Practical Approach, Ed. K. G. Hardy, IRL Press, 1993) y en Ausubel *et al.* (“Yeast Cloning Vectors and Genes” Current Protocols in Molecular Biology, Section II, Unit 13.4, 1994) son útiles en el contexto de la presente invención.

Los vectores que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, típicamente, un origen de replicación, un gen de resistencia a antibióticos, un origen de replicación en bacterias (necesario para la propagación en bacterias), sitios múltiples de clonaje, y un marcador genético. El marcador genético es, habitualmente, un gen que confiere resistencia a un antibiótico o, alternativamente, un marcador autotrófico. Así, genes marcadores útiles en el contexto de la presente invención incluyen por ejemplo el gen de resistencia a la neomicina, que confiere resistencia al aminoglucósido G418, el gen de la higromicina fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina, el gen ODC, que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa (2-(difluorometil)-DL-ornitina (DFMO), el gen de la dihidrofolato reductasa que confiere resistencia a metrotexato, el gen de la puromicina-N-acetil transferasa, que confiere resistencia a puromicina, el gen ble que confiere resistencia a zeocina, el gen de la adenosina deaminasa que confiere resistencia a 9-beta-D- xilofuranosil adenina, el gen de la citosina deaminasa, que permite a las células crecer en presencia de N-(fosfonacetil)-L-aspartato, timidina kinasa, que permite a las células crecer en presencia de aminopterina o el gen de Xantina-guanina fosforibosiltransferasa, que permite a las células crecer en presencia de xantina y ausencia de guanina. Otros marcadores autotróficos que se pueden usar según la presente invención, son los genes TRP1, URA3, LEU2, HIS3 o LYS2, que complementan defectos genéticos en las células que los portan, lo que permite a dichas células crecer en ausencia de triptófano, uracilo, leucina, histidina y lisina, respectivamente.

El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende un vector de la invención, para lo cual dicha célula ha podido ser transformada, transfectada o infectada con un vector proporcionado por esta invención. Células huéspedes adecuadas incluyen: células procariotas o células eucariotas. Las células huésped preferidas son células de procariotas, en particular, de bacteria, o células eucariotas, en particular, de levadura.

Así, ejemplos ilustrativos, no limitativos de bacterias según la presente invención, incluyen bacterias Gram negativas, por ejemplo, una cepa de *Escherichia spp.* (e.g., *E. coli*, etc.), una cepa de *Salmonella spp.* (e.g., *S. typhimurium*, etc.), una cepa de *Pseudomonas spp.* (e.g., *P. aeruginosa*, *P. putida*, etc.), etc., que puede ser transformada con una construcción génica de la invención o con un vector de la invención, tal como un vector de expresión proporcionado por esta invención. En una realización preferida, dicha bacteria es *Escherichia coli*. Ejemplos ilustrativos de cepas de *E. coli* que pueden ser empleadas según la invención son las cepas BL21 (DE3), DH10B y DH5 α .

Por levadura se entiende cualquier organismo eucariota perteneciente al tipo de los ascomicetes que incluye los organismos conocidos de forma general como levaduras así como los conocidos de forma general como hongos filamentosos. Las levaduras y los hongos filamentosos incluyen *Pichia sp.* (*P. pastoris*, *P. finlandica*, *P. trehalophila*, *P. koclamae*, *P. membranaefaciens*, *P. minuta*, *P. opuntiae*, *P. thermotolerans*, *P. salictaria*, *P. guercuum*, *P. pijperi*, *P. stiptis*, *P. methanolica*), *Saccharomyces (S. cerevisiae)*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces (K. lactis, K. fragilis, K. bulgaricus, K. wickeramii, K. waltii, K. drosophilorum, K. thermotolerans, and K. marxianus; K. yarrowia)*, *Trichoderma reesei*, *Neurospora crassa*, *Schwanniomyces, Schwanniomyces occidentalis, Penicillium, Totyocladium, Aspergillus (A.nidulans, A.niger, A.oryzae), Hansenula polymorpha, Candida, Kloeckera, Torulopsis, and Rhodotorula, Hansenula, Kluyveromyces sp. (for example, Kluyveromyces lactis), Candida albicans, Aspergillus sp (for example, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae), Trichoderma reesei, Chryso sporium luchiwense, Fusarium sp. (por ejemplo, Fusarium gramineum, Fusarium venenatum), Physcomitrella patens*. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una célula que comprende una secuencia de nucleótidos o una construcción génica o un vector de expresión según la invención. En otra realización preferida de la invención, dicha levadura se selecciona entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*.

El polipéptido o la proteína de fusión de la invención se puede obtener mediante diversos métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, mediante el empleo de técnicas de ADN recombinante. De hecho, la secuencia

ES 2 347 398 B1

de nucleótidos o vector de la invención puede ser utilizado para producir el polipéptido o la proteína de fusión de la invención. Por tanto, a modo ilustrativo, no limitativo, un método para producir dicho polipéptido o dicha proteína de fusión de la invención comprende crecer una célula proporcionada por esta invención bajo condiciones que permiten la producción de dicho polipéptido o proteína de fusión. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicha célula dependerán de la célula utilizada. Si se desea, el polipéptido o la proteína de fusión de la invención puede ser aislado y, opcionalmente, purificada, por métodos convencionales.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de un polipéptido con actividad esterasa que comprende cultivar una célula según la invención bajo condiciones que permiten la producción de dicho polipéptido y, si se desea, recuperar dicho polipéptido. Así, el polipéptido de la invención, si se desea, es aislado y, opcionalmente, purificado.

Prácticamente cualquier método conocido en la técnica puede ser utilizado para la recuperación de la proteína de interés del interior celular o del medio de cultivo. Si la proteína se produce en el interior de la célula, es necesario lisar las células para liberar las proteínas de interés.

Así, en el caso de que dicha célula sea una bacteria, dichas células se pueden lisar por diferentes métodos que incluyen tratamiento con álcalis o calor, detergentes iónicos o no iónicos y disolventes orgánicos. La elección del método de extracción dependerá de la especie bacteriana de que se trate de forma que el tratamiento debe modificarse según la cepa hospedadora (especie bacteriana o estirpe, debido a la diferente composición de la pared celular de distintos microorganismos).

Convencionalmente, cuando la célula es una célula de levadura, éstas se lisan mediante lisis hipotónica de esferoplastos formados previamente mediante tratamiento con glucanasas, mediante sonicación o mediante agitación en presencia de bolas de vidrio.

Una vez que la proteína de interés se encuentra en el medio, bien mediante liberación del interior celular bien porque la proteína es secretada por la propia maquinaria de secreción de la célula, se emplean métodos convencionales para la purificación de dicha proteína, incluyendo, sin estar limitado, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, de interacción hidrofóbica, de filtración en gel, HPLC), métodos electroforéticos (isoelectroenfoque preparativo, electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida-SDS), solubilidad diferencial (precipitación con sulfato amónico), ultracentrifugación preparativa en gradiente de sacarosa. Una vez que se ha alcanzado el grado deseado de pureza, lo que puede requerir más de un paso cromatográfico, es frecuente que sea necesario concentrar la proteína o eliminar sales e iones que puedan ser perjudiciales para su posterior uso. En ese caso, se recurre a técnicas conocidas, tales como liofilización o ultrafiltración.

La determinación del grado de pureza de dicho polipéptido se puede estimar mediante el valor de la actividad enzimática específica que se calcula dividiendo el número de unidades de actividad enzimática entre la cantidad de mg de proteína en un volumen determinado. Preferiblemente, la actividad enzimática se determina mediante el método de medida de actividad lipolítica descrito según Fuciños *et al* (2005) (J. Biotechnol. 117:233-241).

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido o una proteína de fusión según la invención.

Las esterasas son enzimas capaces de hidrolizar enlaces tipo éster de las grasas. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polipéptido o una proteína de fusión según la invención en la elaboración de una composición detergente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la modificación de grasas o aceites que comprende poner en contacto un polipéptido o una proteína de fusión según la invención con una grasa o aceite en condiciones donde dicho polipéptido o proteína de fusión pueda hidrolizar dicha grasa o aceite.

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos que deben ser considerados como meramente ilustrativos y no limitativos de la misma.

Ejemplo 1

Cepas mesófilas de bacterias y levaduras modificadas para producir una esterasa termófila de origen heterólogo

1. *Clonación de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima heteróloga y producción de cepas recombinantes de Escherichia coli*

La secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima heteróloga con actividad esterasa (secuencia completa que codifica una proteína de 329 aminoácidos) de *T. thermophilus* HB27 (DE3) se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de *T. thermophilus* con los siguientes primers que comprenden sitios BamHI (F) y HindIII (R):

ES 2 347 398 B1

PUREST-F: CGGGATCCGAatgaagcggcttatcgcgct (SEQ ID NO: 2)

PUREST-R: CCCAAGCTTtagccgcacccggggggcg (SEQ ID NO: 3)

5 El producto de amplificación se clonó en los correspondientes sitios de restricción del vector pET21d (NOVAGEN).

La bacteria *Escherichia coli* BL21 (DE3) (NOVAGEN) se transformó con la secuencia clonada en el plásmido pET21d de forma que la proteína se sintetiza fusionada a una cola C-terminal de 6 histidinas tras inducción con IPTG (Isopropil β -D-tiogalactopiranosido).

10 Las bacterias transformadas con el plásmido recombinante, se cultivaron en medio líquido LBA (1% Bacto-Triptona, 0,5% Bacto-Yeast-Extract, 0,5% Cloruro Sódico, 0,1% Glucosa, Ampicilina 40 mg/mL) a 37°C en agitación orbital y al alcanzar una DO a 600 nm de 0,6 se llevó a cabo la inducción con IPTG.

15 La medida de actividad lipolítica y definición de unidad enzimática de la enzima recombinante se realizó según Fuciños *et al* (2005) (J. Biotechnol. 117:233-241).

20 *2. Clonación de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima heteróloga y producción de cepas recombinantes de Kluyveromyces lactis*

Por otro lado, se transformaron cepas de la levadura *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140 con variantes de la secuencia integradas en multicopia en el genoma fusionadas a una señal de secreción y expresándose bajo el promotor de la beta-galactosidasa. De esta forma, las enzimas se secretan al medio de cultivo cuando las levaduras crecen en presencia de un inductor como galactosa o lactosa.

25 Las variantes de la secuencia utilizadas consisten en eliminar 16 ó 26 aminoácidos del extremo N-terminal, es decir, las putativas señales de secreción (aminoácidos 1-16) y hélice transmembrana (aminoácidos 6-26) de la proteína nativa y se corresponden con las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente.

30 Las secuencias se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de *T. thermophilus* HB27 con los siguientes primers para clonarlas entre los sitios XhoI y KpnI del plásmido pKLAC1 (New England Biolabs) en pauta de lectura con la señal de secreción (*K. lactis* alfa-mating factor domain).

35 Empezando en el aminoácido 27

EST1KF (XhoI) TTTCTCGAGAAAAGAgaggtgcccggtgggtctgc (SEQ ID NO: 6)

40 EST1KR (KpnI) TTTGGTACCtcaagccgcacccggggggcg (SEQ ID NO: 7)

Empezando en el aminoácido 17

45 EST1KF2 (XhoI) TTTCTCGAGAAAAGAcagggcctcgagcctctgg (SEQ ID NO: 8)

EST1KR (KpnI) TTTGGTACCtcaagccgcacccggggggcg (SEQ ID NO: 7)

50 Con los plásmidos linearizados por digestión enzimática con SacII se transformó la levadura *K. lactis* NRRL-Y1140 y se seleccionaron los transformantes por crecimiento en medio sólido con 5 mM de acetamida como fuente de nitrógeno, y se comprobó que la construcción se había integrado en multicopia en el genoma. Las levaduras se transformaron según el método del acetato de litio descrito en Ito *et al.* (1983) (J. Bacteriol, 153: 163-168.).

55 Las cepas transformadas se cultivaron en matraces de 1L con 200 mL de medio YPgal (Extracto de levadura: 10 g/L, Bacto-peptona: 20 g/L, Lactosa: 20 g/L) a 30°C en agitación orbital (100 rpm), obteniendo una actividad esterasa aproximada en el medio de cultivo a las 49 horas de 500 U/L en el caso de la variante más larga y de 200 U/L en el caso de la variante más corta, como puede verse en las gráficas de la Figura 1. La actividad específica (U/mg prot) en los postincubados libres de células fue de 0,09 y 0,04 U/mg proteína, respectivamente. El método de medida de actividad lipolítica empleado es el descrito según Fuciños *et al* (2005) (J. Biotechnol. 117:233-241).

60 *3. Clonación de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima heteróloga y producción de cepas recombinantes de Saccharomyces cerevisiae*

65 Se transformó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 (Eastman Kodak Company) con la variante de la secuencia de nucleótidos de la proteína heteróloga sin la región correspondiente a los 16 aminoácidos N-terminales clonada en yEpFlagI (Eastman Kodak Company) en pauta de lectura con la secuencia de la señal de secreción (del alfa-mating factor de *S. cerevisiae*) y del péptido Flag.

ES 2 347 398 B1

El plásmido lleva un promotor que se reprime por glucosa. Las enzimas se secretan al medio de cultivo, cuando se ha agotado la glucosa, fusionadas al péptido Flag por el extremo N-terminal.

5 La secuencia se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de *T. thermophilus* HB27 con los siguientes primers que tienen colas homologas al vector MCS (del inglés, múltiple cloning site).

PFLAG-EST

10 F: AAAAGAGACTACAAGGATGACGATGACAAGcagggcctcgaggccttctgg (SEQ ID NO: 9)

R: TGGGACGCTCGACGGATCAGCGGCCGCTTAaggccgcacccggggggcgt (SEQ ID NO: 10)

15 Con el producto de PCR y el vector linearizado por digestión en el sitio de clonación múltiple con EcoRI y SallI, se transformó la levadura *S. cerevisiae* BJ3505 seleccionando los transformantes (que contienen el plásmido recombinante que se ha 1 recircularizado por recombinación) por crecimiento en medio CM-trp. El medio CM sin el correspondiente aminoácido (triptófano) empleado como marcador auxotrófico se preparó según (Zitomer y Hall, 1976, J. Biol. Chem., 251: 6320-6326). Las levaduras se transformaron según el método del acetato de litio de Ito *et al.* (1983) (J. Bacteriol., 153: 163-168).

20 Las cepas transformadas se cultivaron en un medio que contiene 1% glucosa, 3% glicerol, 1% extracto de levadura y 8% de peptona. Se realiza un cultivo de 100 ml en un matraz de 500 ml, se pone en marcha el cultivo con un inóculo inicial a 0,1 de DO₆₀₀ y se incuba a 30° con agitación orbital continua (250 rpm), obteniendo una actividad lipasa aproximada a las 72 horas en el medio de cultivo de 1000 UE/L como puede verse en la gráfica a modo de ejemplo. La actividad específica en ese momento fue de 3,79 U mg⁻¹. El método de medida de actividad lipolítica y definición de unidad enzimática según Fuciños *et al* (2005) J. Biotechnol. 117:233-241.

4. Purificación de la proteína heteróloga

30 Se purificó la proteína producida extracelularmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 transformada con la variante de la secuencia sin la región correspondiente a los 16 aminoácidos N-terminales clonada en yEpFlagI en pauta de lectura con la secuencia de la señal de secreción (del alfa-mating factor de *S. cerevisiae*) y del péptido Flag.

35 El medio postincubado libre de células (72 horas de cultivo) se concentró por ultrafiltración tangencial (corte 10.000 Da) y a partir del concentrado se purificó la esterasa por cromatografía de afinidad con AntiFlag M2 agarosa (Sigma) siguiendo las instrucciones del proveedor. La actividad específica (media de tres experimentos) aumentó desde 7,30 U/mg en el postincubado concentrado hasta 220,6 U/mg en el eluido de la cromatografía de afinidad (Factor Purificación= 30,2).

40 En la Figura 2 se muestra una electroforesis en gel SDS-PAGE del medio de cultivo postincubado (carril 2), concentrado por ultrafiltración (carril 3) y el eluido de la cromatografía de afinidad (carril 4). El carril 1 es el marcador de Pm (Da). Tras la cromatografía de afinidad se obtienen tres bandas mayoritarias que corresponden a la esterasa (las tres se revelan en el western blot con anticuerpos antiFlag) pero en diferentes formas de glicosilación pues el tratamiento con la glicosidasa EndoH resulta en una única banda (carril 5).

50

55

60

65

ES 2 347 398 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado con actividad esterasa que comprende la secuencia de aminoácidos identificada en la SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, donde dicha esterasa es una esterasa termófila.
3. Polipéptido según la reivindicación 2, donde dicha esterasa termófila es estable a una temperatura comprendida entre 60 y 90°C.
- 10 4. Una proteína de fusión que comprende
 - 15 i) un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
 - ii) un péptido heterólogo.
5. Proteína de fusión según la reivindicación 4, donde dicho péptido heterólogo es un péptido señal de secreción extracelular.
- 20 6. Polipéptido o proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha proteína de fusión comprende, además, un péptido de purificación.
- 25 7. Polipéptido o proteína de fusión según la reivindicación 6, donde dicho péptido de purificación se selecciona entre un péptido Flag o una cola de polihistidinas.
8. Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
- 30 9. Una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 8.
10. Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 8 o una construcción génica según la reivindicación 9.
- 35 11. Vector de expresión según la reivindicación 10, que comprende, además, la secuencia de nucleótidos de un promotor.
12. Vector de expresión según la reivindicación 11, donde dicho promotor es un promotor inducible o reprimible.
- 40 13. Vector de expresión según la reivindicación 12, donde dicho promotor es un promotor inducible por galactosa o lactosa.
14. Vector de expresión según la reivindicación 12, donde dicho promotor es un promotor inducible por IPTG.
- 45 15. Vector de expresión según la reivindicación 12, donde dicho promotor es un promotor que se reprime en presencia de glucosa.
16. Una célula que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 8 o una construcción génica según la reivindicación 9 o un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15.
- 50 17. Célula según la reivindicación 16, donde dicha célula se selecciona entre una bacteria y una levadura.
18. Célula según la reivindicación 17, donde dicha bacteria es *Escherichia coli*.
- 55 19. Célula según la reivindicación 17, donde dicha levadura se selecciona entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*.
20. Una composición que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
- 60 21. Un procedimiento para la obtención de un polipéptido con actividad esterasa o una variante funcionalmente equivalente del mismo que comprende cultivar una célula según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 bajo condiciones que permiten la producción de dicho polipéptido y, si se desea, recuperar dicho polipéptido.
- 65 22. Procedimiento según la reivindicación 21, donde cuando dicho polipéptido con actividad esterasa comprende la secuencia de aminoácidos de un péptido de secreción extracelular, la recuperación de dicho polipéptido se realiza a partir del medio de cultivo.

ES 2 347 398 B1

23. Uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 en la elaboración de una composición detergente.

5 24. Método para la modificación de grasas o aceites que comprende poner en contacto un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 con una grasa o aceite en condiciones donde dicho polipéptido o proteína de fusión pueda hidrolizar dicha grasa o aceite.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

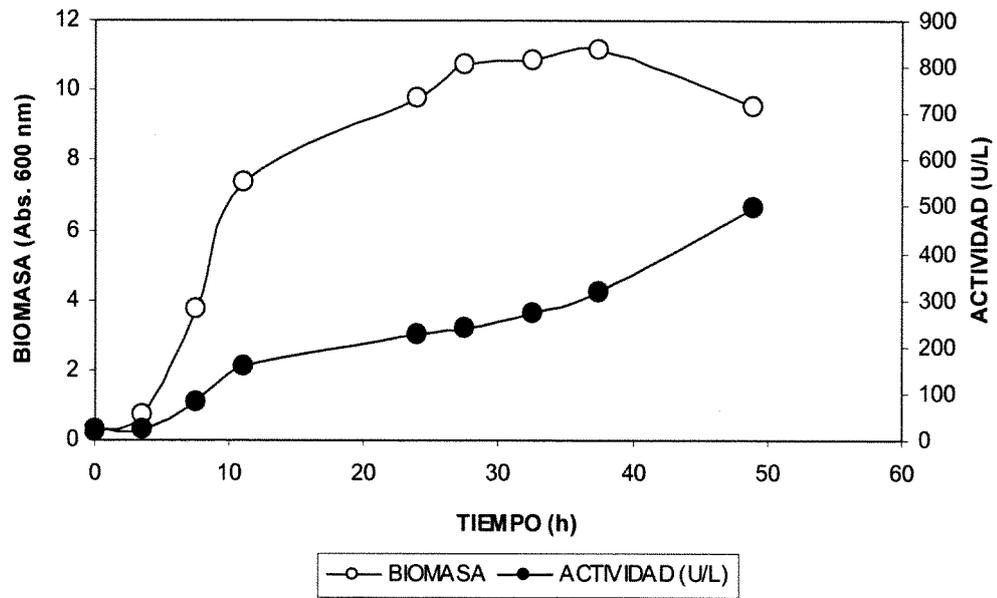
55

60

65

FIGURA 1

A



B

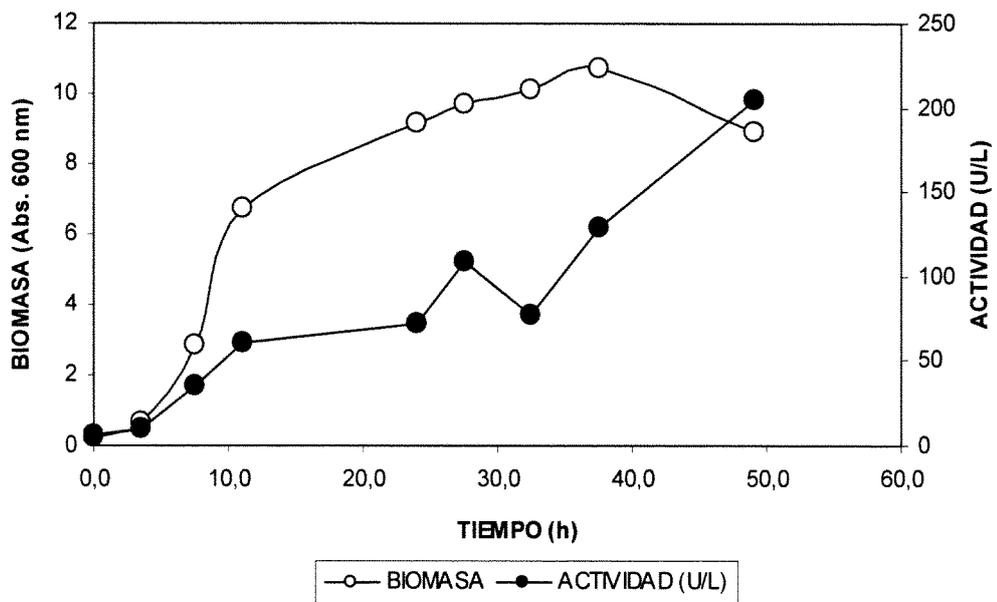


FIGURA 2

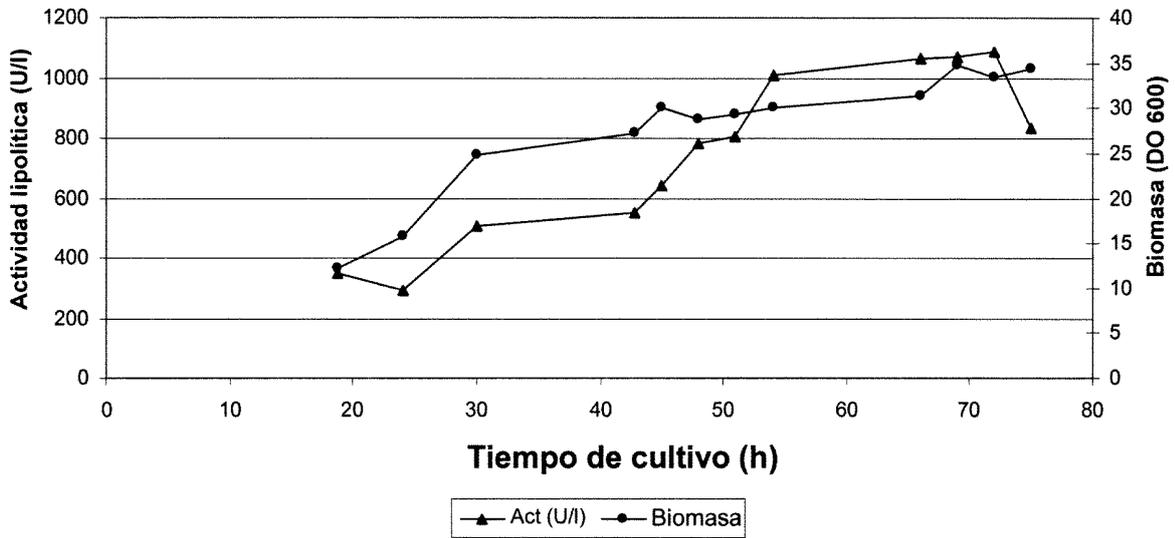
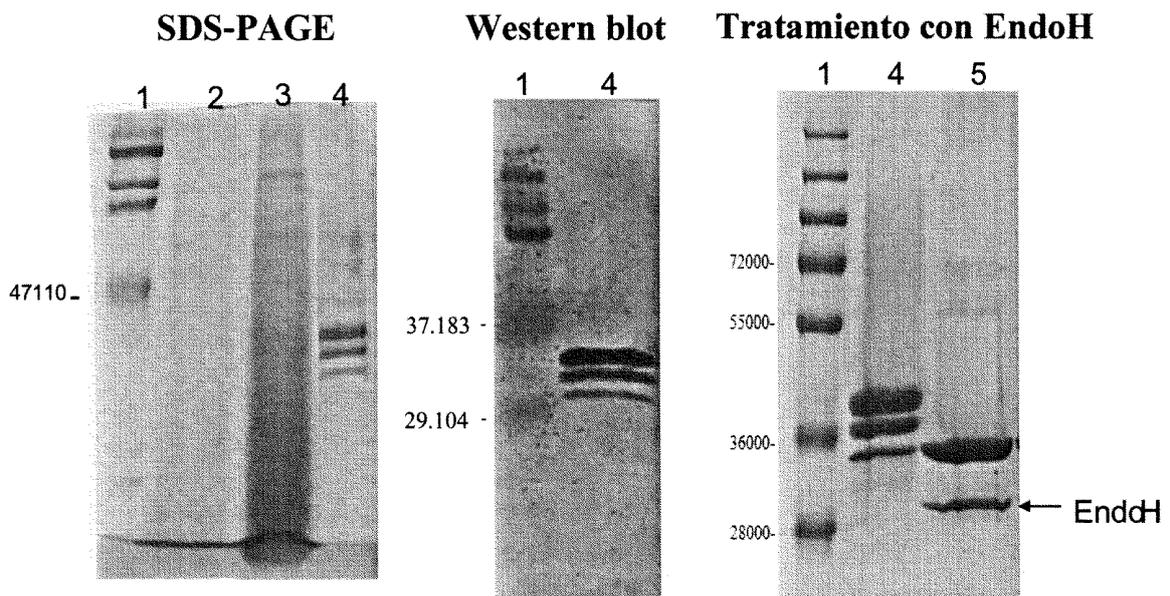


FIGURA 3



ES 2 347 398 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DA CORUÑA

<110> UNIVERSIDAD DE VIGO

5

<120> ESTERASA TERMÓFILA DE *Thermus thermophilus*

<130> P3837ES

10

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

15

<210> 1

<211> 329

<212> PRT

20

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 1

25

Met Lys Arg Leu Ile Ala Leu Val Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

30

Gln Gly Leu Glu Ala Phe Trp Lys Ala Val Glu Val Pro Gly Gly Val
20 25 30

35

Cys Ala Asp Gly Ser Pro Tyr Arg Phe Tyr Val Ser Pro Gly Asp Pro
35 40 45

40

Arg Lys Val Val Val Asp Phe Gln Gly Gly Gly Ala Cys Trp Asp Gln
50 55 60

45

Ala Thr Cys Gly Pro Glu Ser Arg Thr Tyr Arg Lys Arg Val Asp Val
65 70 75 80

50

Gln Glu Leu Tyr Leu Ala Gln Gly Ile Tyr Asn Arg Met Ser Val Ala
85 90 95

55

Asn Pro Phe Phe Gly Trp Thr His Val Phe Val Pro Tyr Cys Thr Gly
100 105 110

60

Asp Leu His Val Gly Arg Ala Thr Val Asp Tyr Gly Gly Phe Lys Val
115 120 125

65

His His Gln Gly Ala Arg Asn Ala Gln Ala Ala Leu Glu Tyr Val Phe
130 135 140

Arg Asn His Thr Asn Pro Glu Arg Val Phe Val Thr Gly Cys Ser Ala
145 150 155 160

ES 2 347 398 B1

Gly Ala Tyr Gly Ala Val Leu Trp Ala Asp Lys Ile Leu Ala Thr Tyr
165 170 175

5 Lys Asn Ala Gln Ile Ala Val Cys Gly Asp Ala Gly Val Gly Val Val
180 185 190

10 Thr Glu Asp Phe Pro Gly Phe Thr Ala Trp Asn Pro Arg Leu Pro Glu
195 200 205

15 Leu Pro Gly Leu Ser Ser Pro Pro Lys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Ala
210 215 220

20 Leu Ala Gln Ala Tyr Pro Lys Ala Val Leu Ala Gln Tyr Thr Thr Leu
225 230 235 240

25 Leu Asp Gly Thr Gln Ile Tyr Phe Tyr Ala Leu Met Lys Lys Glu Ala
245 250 255

30 Ala Pro Ser Glu Ala Thr Ala Arg Glu Trp Ala Val Ala Ala Glu Arg
260 265 270

35 Ala Val Gly Phe Pro Ala Ser Glu Ala Asn Tyr Thr Tyr Tyr Leu Ala
275 280 285

40 Pro Gly Ser Gln His Cys Ile Leu Pro Arg Pro Glu Leu Tyr Thr Leu
290 295 300

45 Lys Val Gly Glu Val Ser Phe Leu Asp Trp Leu Arg Ala Leu Ala Glu
305 310 315 320

45 Gly Arg Thr Pro Pro Arg Val Arg Pro
325

<210> 2

50 <211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

55 <220>

<223> Oligonucleótido cebador PUREST-F para amplificar por PCR la secuencia de nucleótidos de la esterasa de *T. thermophilus*

60 <400> 2

cgggatccga atgaagcggc ttatcgcgct
30

65 <210> 3

<211> 29

ES 2 347 398 B1

<212> DNA

<213> Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido cebador PUREST-R para amplificar por PCR la secuencia de nucleótidos de la esterasa de *T. thermophilus*

10 <400> 3

cccaagctta ggccgcaccc gggggggcg
29

<210> 4

15 <211> 16

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

20

<400> 4

Met Lys Arg Leu Ile Ala Leu Val Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

25

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

30 <213> *Thermus thermophilus*

<400> 5

35

Ala Leu Val Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Ala Gln Gly Leu Glu Ala
1 5 10 15

40

Phe Trp Lys Ala Val
20

<210> 6

45 <211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

50 <220>

<223> Oligonucleótido EST1KF para amplificación por PCR de la variante 1 de la esterasa de *T. thermophilus*

<400> 6

55 tttctcgaga aaagagaggt gcccggtggg gtctgc
36

<210> 7

60 <211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

65

<223> Oligonucleótido EST1KR para amplificar por PCR la secuencia de la variante 1 y 2 de *T. thermophilus*

ES 2 347 398 B1

<400> 7

tttggtacct caaggccgca cccggggggg cgt
33

5

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

15 <223> Oligonucleótido EST1KF2 para amplificar por PCR la secuencia de la variante 2 de la esterasa de *T. thermophilus*

<400> 8

tttctcgaga aaagacaggg cctcgaggcc ttctgg
36

20

<210> 9

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

25

<220>

30 <223> Oligonucleótido PFLAG-EST-F para amplificar por PCR la secuencia de nucleótidos de la esterasa de *T. thermophilus*

30

<400> 9

aaaagagact acaaggatga cgatgacaag cagggcctcg aggccttctg g
51

35

40

<210> 10

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

45

<220>

50 <223> Oligonucleótido PFLAG-EST-R para amplificar por PCR la secuencia de nucleótidos de la esterasa de *T. thermophilus*

50

<400> 10

tgggacgctc gacggatcag cggccgctta aggccgcacc cgggggggctg t
51

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 347 398

② Nº de solicitud: 200801767

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.06.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 9/18 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Base de Datos UNIPROT [on line]; 05.07.2004 [recuperado el 16.11.2009], "putative esterase", Recuperado de EMBL-EBI Databases: Código de acceso (AC): Q72J75 & HENNE, A. et al., "The genome sequence of the extreme thermophile Thermus thermophilus.", NATURE BIOTECHNOLOGY, 2004, Vol. 22, No. 5, páginas 547-553, Resultados, página 551: 'Esterases'.	1-24
A	FUCIÑOS, P. et al., "Identification of extracellular lipases/esterases produced by Thermus thermophilus HB27: partial purification and preliminary biochemical characterisation.", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, 2005, Vol. 117, No. 3, páginas 233-241, Materiales y Métodos; Resultados y Discusión.	1-3,20-24
A	FUCIÑOS, P. et al., "Production of thermostable lipolytic activity by thermus species.", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, 2005, Vol. 21, No. 4, páginas 1198-1205, todo el documento.	1-3,20-24
A	WO 9725058 A1 (THERMOGEN INC) 17.07.1997, todo el documento.	1-3,8-19
A	TERPE, K., "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 2003, Vol. 60, No. 5, páginas 523-533, todo el documento.	4-21
A	FORD, C.F., et al., "Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins.", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, 1991, Vol. 2, No. 2-3, páginas 95-107, todo el documento.	4-21

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

14.10.2010

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 347 398

② Nº de solicitud: 200801767

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.06.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 9/18 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RHEE, J.K. et al., "New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2005, Vol. 71, No. 2, páginas 817-825, todo el documento.	1-21
A	US 20050106698 A1 (BOLEN et al.) 19.05.2005, todo el documento.	1-21
A	JAEGER, K.E. et al., "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology.", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, 1998 Vol. 16, No. 9, páginas 396-403, todo el documento.	1-21

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

14.10.2010

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

2/6

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

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, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.10.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4, 5, (6-22) (parcialmente), 23 y 24	SÍ
	Reivindicaciones	1-3, (8-22) (parcialmente)	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	4, 5, (6-22) (parcialmente), 23 y 24	NO

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.

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	Henne, A. et al., Nat. Biotechnol., (2004), 22(5): 547-53.	2004
D02	Fuciños, P. et al., J. Biotechnol., (2005), 117(3): 233-41.	2005
D03	Fuciños, P. et al., Biotechnol. Prog., (2005), 21(4): 1198-205.	2005
D04	WO 97/25058 A1	17-07-1997
D05	Terpe, K., Appl. Microbiol. Biotechnol., (2003), 60(5): 523-33.	2003
D06	Ford, C.F., et al., Protein Exp.Purif., (1991), 2(2-3): 95-107.	1991
D07	Rhee, J.K. et al., Appl. Environ. Microbiol., (2005), 71(2): 817-25.	2005
D08	US 2005/0106698 A1	19-05-2005
D09	Jaeger, K.E. et al., Trends Biotechnol., (1998), 16(9): 396-403.	1998

Observaciones sobre documentos:

En D1 se identifican secuencias codificadoras de esterasas potenciales en el genoma de *Thermus thermophilus* HB27.

En D2 y D3 se describe la producción de lipasas/esterasas extracelulares producidas por *Thermus thermophilus* HB27 y su purificación parcial y caracterización preliminar.

En D4 y D5 se describe el aislamiento de esterasas termoestables.

En D6-D8 se describen procedimientos de obtención de proteínas de fusión y su purificación.

En D9 se describe la aplicación de lipasas microbianas en el campo de la biotecnología.

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

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicaciones independientes 1, (8, 20 y 21) (parcialmente).

1.1.1. En el documento D1 se divulga la secuencia del genoma de *Thermus thermophilus* HB27 y se identifican varias secuencias que codificarían diferentes esterasas potenciales (cf. D1: Resultados: 'Metabolic features with biotechnological potential', página 551). En particular, la secuencia TTC904 codifica una proteína de 329 aa, con actividad esterasa, cuya secuencia es idéntica a la secuencia SEQ ID No 1 del polipéptido de la invención (cf. Base de Datos UNIPROT de EMBL-EBI: Código de acceso (AC), Q72J75).

Por consiguiente, el objeto de protección de las reivindicaciones independientes 1, (8, 20 y 22) (parcialmente) y el de las reivindicaciones dependientes 2, 3, (9-19) (parcialmente) se considera que no es nuevo sobre la base del documento D1.

1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-3, (8-22) (parcialmente) no es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicaciones independientes 4 y 8 (parcialmente).

2.1.1. Se considera que el documento D1 constituye el estado de la técnica más próximo. En él se describe una proteína con actividad esterasa cuya secuencia de 329 aa es idéntica a SEQ ID No 1 (cf. Base de Datos UNIPROT de EMBL-EBI: Código de acceso (AC), Q72J75).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de las reivindicaciones independientes 4 y 8 (parcialmente) puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevas proteínas de fusión con actividad esterasa.

Hoja adicional

2.1.3. La solución propuesta es la proteína de fusión de la reivindicación 4 y la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 8. Dicha solución se caracteriza porque la proteína de fusión comprende el polipéptido SEQ ID No 1 y un péptido heterólogo. Para valorar adecuadamente la actividad inventiva de esta solución es necesario considerar si, a la fecha de prioridad de la solicitud internacional, partiendo del estado de la técnica más próximo, el experto en la materia intentaría aplicar dicha solución con una expectativa razonable de éxito. Además, es preciso considerar si se plantearon dificultades técnicas no previsibles durante la puesta en práctica de dicho procedimiento.

Sobre la base del estado de la técnica más próximo, representado por D1, junto con los conocimientos de uso y aplicación habitual en este campo de la biotecnología recogidos en D4-D8 se concluye que la solución propuesta por la solicitud internacional al problema técnico planteado sería evidente para el experto en la materia. Por esta razón, el objeto de las reivindicaciones 4 y 8 se considera que no es inventivo. Así mismo, se considera que el objeto de las reivindicaciones dependientes 5-7, (9-22) (parcialmente) tampoco es inventivo.

2.2. Reivindicaciones independientes 23 y 24.

2.2.1. El objeto de las reivindicaciones 23 y 24 es el uso del polipéptido SEQ ID No 1 con actividad esterasa en la elaboración de una composición detergente, en la obtención de un producto enantiómero puro y en la modificación de grasas o aceites. Sobre la base del documento D1 más la aportación de los documentos D2-D4 y D9 se considera que el objeto de las reivindicaciones independientes 23 y 24 no es inventivo.

2.3. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 4, 5, (6-22) (parcialmente), 23 y 24 no tiene actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.