



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 354 326**

② Número de solicitud: 200900613

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/55 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **04.03.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
14.03.2011

⑰ Solicitante/s: **Universidade da Coruña
O.T.R.I.- Campus de Elviña, s/n
15071 A Coruña, ES
Universidade de Vigo**

⑱ Inventor/es: **Fuciños González, Juan Pablo;
Rúa Rodríguez, María Luisa;
Cerdán Villanueva, María Esperanza;
López López, Olalla;
Pastrana Castro, Lorenzo M. y
González Siso, María Isabel**

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑳ Título: **Lipasa termófila.**

㉑ Resumen:
Lipasa termófila.

La presente invención se refiere a enzimas termófilas, en particular a lipasas termófilas, de *Thermus thermophilus* que pueden expresarse en organismos mesófilas y su empleo en la elaboración de una composición detergente, en la modificación de grasas y aceites y en la hidrólisis de las mismas.

ES 2 354 326 A1

DESCRIPCIÓN

Lipasa termófila.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a enzimas termófilas, en particular a lipasas 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 lipasa es un término general para denotar una enzima que hidroliza triglicéridos.

15 Las aplicaciones que tienen las lipasas en la industria actual son múltiples: fabricación de detergentes, en la industria de la leche y los quesos, en panaderías para mejoramiento de sabores, en la industria de bebidas, producción de productos químicos de interés por medio de enlaces éster, polimerización e incluso, se están realizando investigaciones para la producción de biodiésel. Las lipasas están entre las enzimas más útiles en tecnología de alimentos ya que son capaces de hidrolizar grasas, transesterificar e interesterificar grasas, etc. y de este modo permiten obtener ácidos grasos o grasas y aceites de alto valor nutricional y económico.

20 Sin embargo, las enzimas presentan también importantes limitaciones para su aplicación industrial. Por ejemplo, que son generalmente inestables y no pueden ser utilizadas en numerosos ciclos de reacción.

25 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. Actualmente, también se están empleando lipasas en la industria del papel para evitar los depósitos de brea sobre la pasta de papel. Las enzimas convencionales se inactivan a temperaturas superiores a los 70°C, por lo que la temperatura durante el proceso de la fabricación del papel tiene que limitarse y controlarse.

40 La disponibilidad de lipasas 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 (por ejemplo, reacciones de síntesis en medios con bajo contenido en agua).

45 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.

50 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.

55 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.

65 Las bacterias del género *Thermus* sp. 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* sp. tienen gran potencial de utilización como sistemas de obtención de enzimas termoestables mediante selección funcio-

nal 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* sp. 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.

La solicitud de patente japonesa JP6279782 describe una lipasa termoestable. La temperatura óptima de la enzima está en un rango de 60 a 70°C, sin embargo, la termoestabilidad de la misma no es suficiente ya que la actividad residual de la enzima tras el tratamiento a 70°C durante 15 minutos está por debajo del 10%. Por otra parte, el documento US2006/0024789 describe una lipasa termoestable de *Geobacillus*. Dicha lipasa se expresa en cepas de bacterias recombinantes, tales como en *E. coli*. El documento US5306636 describe una lipasa termoestable de *Pseudomonas* que se expresa en bacterias recombinantes, tales como *E. coli* y *Bacillus subtilis* o en levaduras. El documento JP08089244 describe la preparación de una lipasa mutada de *Rhizopus* expresada en *Saccharomyces cerevisiae* con termoestabilidad mejorada.

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 lipasas termófilas 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 lipasa 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 lipasa 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

La Figura 1 muestra unas curvas de actividad lipasa y biomasa en el medio de cultivo y en las células para el polipéptido de la invención expresado en la levadura *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140 junto con la señal de secreción del factor alfa-mating de *K. lactis* medida a intervalos de tiempo de 24 horas. En la Figura 1B se especifica la actividad lipasa en las distintas fracciones: medio extracelular, periplasma, intracelular, membranas y lavado.

La Figura 2 muestra unas curvas de actividad lipasa y biomasa en el medio de cultivo y en las células para el fragmento del polipéptido de la invención que carece de la metionina 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*.

La Figura 3 muestra una electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS del extracto crudo, del eluido de la cromatografía de afinidad (empleando Anti-Flag M2) realizada a partir de los cultivos de *S. cerevisiae* (izquierda) y *K. lactis* (derecha), y de los eluidos concentrados obtenidos a partir de dicha cromatografía de afinidad. La cepa de *S. cerevisiae* está transformada con un plásmido que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la lipasa termófila de *T. thermophilus* sin la metionina N-terminal, fusionada a una señal de secreción, a un péptido Flag por el extremo amino-terminal y expresada bajo un promotor que se reprime por glucosa. La cepa de *K. lactis* presenta integrado en su genoma la secuencia de nucleótidos que codifica la lipasa termófila de *T. thermophilus*, fusionada a una señal de secreción, a un péptido Flag por el extremo carboxilo-terminal y expresada bajo el promotor de la beta-galactosidasa. En el carril del gen que corresponde al eluido concentrado se aprecian varias bandas correspondientes a la lipasa de *T. thermophilus*. Carril (1): Marcador; (2) Extracto crudo; (3) Elución 2; (4) Concentrado; (5) Marcador; (6) Extrato; (7) Elución 2; (8) Concentrado; (9) Marcador.

La Figura 4 muestra un western blot empleando anticuerpos anti-Flag a partir de muestras procedentes del extracto crudo, del eluido de la cromatografía de afinidad (empleando Anti-Flag M2) realizada a partir de los cultivos de *S. cerevisiae* (izquierda) y *K. lactis* (derecha), y de los eluidos concentrados obtenidos a partir de dicha cromatografía de afinidad. Los carriles 1, 5 y 9 corresponden al marcador de pesos moleculares. En los carriles 4 y 8 pueden apreciarse varias bandas que corresponden a la lipasa de *T. thermophilus*. Carril (1): Marcador; (2) Extracto crudo; (3) elución; (4) Concentrado; (5) Marcador; (6) Extracto; (7) Elución 2; (8) Concentrado; (9) Marcador.

La Figura 5 muestra una electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS PAGE al 12%, en donde las bandas corresponden a la lipasa purificada producida por la cepa de *S. cerevisiae* tras su tratamiento con la enzima enterokinasa durante 0, 2, 5 y 8. La leve proteólisis que se observa a tiempo cero se debe a la actividad residual de la enteroquinasa a 4°C (temperatura de almacenamiento de las muestras hasta que son cargadas en el gel SDS-PAGE).

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 lipasa que comprende la secuencia de aminoácidos identificada en la SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

El término “lipasa”, tal como aquí se emplea, se refiere a una enzima de tipo hidrolasa que cataliza la hidrólisis de enlaces de tipo éster en sustratos lipídicos.

En el contexto de la presente invención, 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, es decir, tiene actividad lipasa.

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 lipasa. La actividad lipasa 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 lipasa 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.* (*J. Biotechnol.*, 2005, 117:233-241) o el ensayo descrito en el Ejemplo 12 de la solicitud de patente WO2006/096834.

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 actividad lipasa.

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 lipasa. En una realización particular de la invención, dicha lipasa es una lipasa termófila. En una realización concreta, dicho fragmento comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 en la que se ha eliminado la metionina del extremo N-terminal.

5 El término “termófilo” tal como aquí se emplea se refiere a una enzima, en particular, una lipasa 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
10 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 cebador polipéptido que comprende el polipéptido de la invención unido a una región B que comprende un segundo péptido.
15 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
20 obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión en células hospedadoras apropiadas.

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

25 i) un polipéptido según la invención; y

ii) un péptido heterólogo.

30 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 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
35 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*,
40 *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*, 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
45 nativas de *E. coli*, tal y como han sido descritas por Kaiser, C. *et al.* (Science, 1987, 235:312-317) y secuencias señal que pueden ser identificadas usando los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo por Gallioti, 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
50 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.

55 El polipéptido de la invención o la proteína de fusión de la invención puede incluir, además, una secuencia aminoácídica 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
60 fusión de la invención. A modo ilustrativo, no limitativo, dicha secuencia aminoácídica útil para aislar o purificar una 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
65 selecciona entre un péptido Flag o una cola de polihistidinas.

ES 2 354 326 A1

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.

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 invención.

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 la transcripción y traducción.

Preferentemente, la invención contempla el uso de vectores que puedan ser propagados tanto en procariotas, por ejemplo, una bacteria, como en levaduras. 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, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, 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. En una realización particular, cuando la célula es una bacteria, dicho vector es el plásmido pET21d.

Adicionalmente, ejemplos ilustrativos de vectores adecuados para la presente invención cuando la 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 (YIPs 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 gliceraldehído 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 metalotioneína (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, GAL5 que se

ES 2 354 326 A1

activan en presencia de galactosa, el promotor VP16-ER, inducible por estrógenos, y el promotor de la fosfatasa (PHO5) 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.

- 5 - 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 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *S. cerevisiae* y el promotor de la galactocinasa (GAL1). Preferiblemente, el promotor que es reprimible por glucosa es el promotor del gen ADH2.

15 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).

20 En una realización 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.

25 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.

40 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 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

45 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 Protocole in Molecular Biology, Section II, Unit 13.4, 1994) son útiles en el contexto de la presente invención.

50 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.

55 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 reductase que confiere resistencia a metrotexato, el gen de la puomicina-N-acetil transferasa, que confiere resistencia a puomicina, 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, el gen de la 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.

65 En el caso de los marcadores autotróficos, se pueden usar 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 procariontas o eucariotas. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende un vector de la invención, para lo cual

ES 2 354 326 A1

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.

5 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 sp.* (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
10 *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* (por ejemplo, *P. pastoris*, *P. finlandica*, *P. trehalophila*, *P. koclamae*, *P. membranaefaciens*, *P. minuta*, *P. opuntiae*, *P. thermotolerans*, *P. salictaria*, *P. guercuum*,
15 *P. pijperi*, *P. stiptis*, *P. methanolica*), *Saccharomyces (S. cerevisiae)*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. wickeramii*, *K. waltii*, *K. drosophilum*, *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*, *K. yarrowia*), *Trichoderma reesia*, *Neurospora crassa*, *Schwanniomyces*, *Schwanniomyces occidentalis*,
20 *Penicillium*, *Totypocladium*, *Aspergillus* (por ejemplo, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*), *Hansenula polymorpha*, *Candida*, *Kloeckera*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Kluyveromyces sp.* (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*), *Candida albicans*, *Aspergillus sp* (por ejemplo, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillum niger*, *Aspergillus oryzae*), *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium luchiwowense*, *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 una realización preferida de la
25 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 de nucleótidos o vector de la invención puede ser utilizado para producir el polipéptido o la proteína de fusión de la
30 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.

35 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de un polipéptido con actividad lipasa 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.

40 Prácticamente cualquier método conocido en la técnica puede ser utilizado para la recuperación de la proteína de interés, ya sea a partir de extractos celulares (a partir del citoplasma o del periplasma del interior celular) o del medio de cultivo.

45 En una realización particular, cuando la proteína de interés (polipéptido con actividad lipasa) comprende la secuencia de aminoácidos de un péptido de secreción extracelular, la recuperación de dicho polipéptido se realiza a partir del medio de cultivo.

50 En otra realización particular, la recuperación de dicho polipéptido con actividad lipasa se realiza a partir de los extractos celulares.

Como entiende el experto en la materia, si la proteína se produce en el citoplasma de la célula, es necesario lisar las células para liberar las proteínas de interés.

55 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 que se quiera lisar, 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
60 lisis hipotónica de esferoplastos formados previamente mediante tratamiento con glucanasas, mediante sonicación o mediante agitación en presencia de bolas de vidrio.

Por otro lado, si la proteína de interés se produce en el espacio periplasmático, entonces la recuperación de la proteína de interés puede hacerse, por ejemplo, mediante ciclos repetidos de congelación-descongelación, mediante
65 shock osmótico y sonicación breve, etc.

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 convenciona-

ES 2 354 326 A1

les 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 lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces de tipo éster en sustratos lipídicos. 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 lipasa 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 lipasa (secuencia completa que codifica una proteína de 161 aminoácidos) se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de *T. thermophilus* HB27 con los siguientes cebadores que comprenden los sitios BamHI (F) y HindIII (R)

PURLIP-F =CGGGATCCGAatgctcttccccgggaggt (SEQ ID NO: 2)

PURLIP-R=CCCAAGCTTtctcgtcacaccctcg (SEQ ID NO: 3)

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

La bacteria *Escherichia coli* BL21 (DE3) 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).

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 añadiendo al medio de cultivo IPTG.

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

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 la secuencia de la proteína heteróloga fusionada a una señal de secreción, al péptido Flag por el extremo C-terminal, y expresándose bajo el promotor de la beta-galactosidasa. De esta forma, la enzima se secreta al medio de cultivo cuando las levaduras crecen en presencia de un inductor como galactosa o lactosa.

ES 2 354 326 A1

La secuencia se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de *T. thermophilus* HB27 con los siguientes cebadores para clonarla entre los sitios BglII y KpnI del plásmido pKLAC1 (New England Biolabs) en pauta de lectura con la señal de secreción alfa-mating factor de *K. lactis*.

5 **LIP1K-F (BglII): TTTAGATCTatgctcttccccgggaggtc (SEQ ID NO: 4)**

10 **LIP1K-R(KpnI):**
TTTGGTACCTTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAGTCtctcgtcacaccctcgagg
15 **(SEQ ID NO: 5)**

En negrita se señala la secuencia de nucleótidos correspondiente al péptido Flag.

20 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).

25 Las cepas transformadas se cultivaron en matraces de 500 mL con 100 mL de medio YPga1 (Extracto de levadura: 10 g/L, Bacto-peptona: 20 g/L, Lactosa: 20 g/L) a 30°C en agitación orbital (250 rpm). Cada 24 horas se tomó una muestra de 10 mL del cultivo y se midió la actividad lipolítica en el medio de cultivo y en las células, alcanzando valores de actividad enzimática total de unas 200 U/L con una distribución mayoritaria en el periplasma celular, según se muestra en la Figura 1. El método de fraccionamiento celular empleado es el descrito según Becerra *et al* (2001) (Prot. Eng. 14: 379-386).

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

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

40 Se transformó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 con la secuencia de nucleótidos de la proteína heteróloga clonada en yEpFlag1 (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. El plásmido yEpFlag1 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.

45 Para ello, se amplificó por PCR la secuencia de la enzima a partir de DNA genómico de *T. thermophilus* HB27 con los siguientes cebadores que tienen colas homologas al vector MCS (del inglés, múltiple cloning site):

PFLAG-LIP

50 **F: AAAAGAGACTACAAGGATGACGATGACAAGctcttccccgggaggtcctc (SEQ ID NO: 6)**

55 **R: TGGGACGCTCGACGGATCAGCGGCCGCTTAtctcgtcacaccctcgagg (SEQ ID NO: 7)**

60 Con el producto de PCR y el vector linearizado por digestión en el sitio de clonación múltiple MSC con EcoRI y Sall, se transformó la levadura *S. cerevisiae* BJ3505 seleccionando los transformantes (que contienen el plásmido recombinante que se ha 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).

65 Las cepas transformadas con el plásmido recombinante se cultivaron en un medio que contiene 1% glucosa, 3% glicerol, 1% extracto de levadura y 8% de peptona. Se realizó un cultivo de 100 ml en un matraz de 500 ml, a 30°C con

agitación orbital continua (250 rpm). Cada 24 horas se tomó una muestra de 10 mL del cultivo y se midió la actividad lipolítica en el medio de cultivo y en las células, alcanzando valores de actividad enzimática total de unas 130 U/L con una distribución mayoritaria en el periplasma celular, según se muestra en las Figuras 2A y 2B. Se empleó el método de fraccionamiento celular descrito según Becerra *et al.* (2001) (Prot. Eng. 14: 379-386).

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

4. Purificación de la lipasa termófila de *T. thermophilus*

La purificación de la lipasa termófila se realizó a partir de cultivos de las cepas de *S. cerevisiae* y *K. lactis* que presentan en un plásmido o integrado en su genoma la secuencia de nucleótidos que codifica la lipasa termófila de *T. thermophilus*, fusionada a una señal de secreción, a un péptido Flag por el extremo amino- o carboxilo-terminal y expresada bajo el promotor ADH2 o de la beta-galactosidasa, respectivamente.

Purificación de la lipasa termófila recombinante producida por la cepa de *K. lactis*

Se partió de 1 litro de cultivo en medio YPgal inoculado a una DO₆₀₀ de 0,1 e incubado durante 60 horas, las células se recogieron por centrifugación y se realizó un extracto crudo rompiendo las células por procedimientos mecánicos según se describe en Tarrío *et al.* (2004) Biochim. Biophys. Acta 1678: 170-175, y añadiendo el detergente CHAPS al 1%. Partiendo de este extracto crudo se realizó la purificación por cromatografía de afinidad con AntiFlag M2 agarosa (Sigma) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las eluciones de mayor actividad se concentraron por ultrafiltración (corte 3000 Da). La actividad específica aumentó desde 0,03 U/mg en el extracto crudo hasta 1,66 U/mg en el eluido-concentrado de la cromatografía de afinidad (Factor de purificación = 50,5).

Purificación de la lipasa termófila recombinante producida por la cepa de *S. cerevisiae*

Se partió de 1 litro de cultivo en medio YPHSM modificado (sin CaCl₂) inoculado a una DO₆₀₀ de 0,1 e incubado durante 60 horas, las células se recogieron por centrifugación y se realizó un extracto crudo rompiendo las células por procedimientos mecánicos según se describe en Tarrío *et al.* (2004) Biochim. Biophys. Acta 1678: 170-175, y añadiendo el detergente CHAPS al 1%. Partiendo de este extracto crudo se realizó la purificación por cromatografía de afinidad con AntiFlag M2 agarosa (Sigma) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las eluciones de mayor actividad se concentraron por ultrafiltración (corte 3000 Da). La actividad específica aumentó desde 0,06 U/mg en el extracto crudo hasta 0,19 U/mg en el eluido-concentrado de la cromatografía de afinidad (Factor de purificación = 3,3).

En la Figura 3 se muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS del extracto crudo y del eluido de la cromatografía de afinidad y los eluidos concentrados de dicha cromatografía de afinidad de ambas purificaciones (*S. cerevisiae* al lado izquierdo y *K. lactis* al lado derecho). En los carriles que corresponden al eluido concentrado se pueden apreciar varias bandas que corresponden a la lipasa termófila de *T. thermophilus*. En la Figura 4 se muestra el western blot con anticuerpos anti-Flag de un gel realizado en paralelo con las mismas muestras que las empleadas en la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de la Figura 3.

Como puede apreciarse de en la Figuras 3 y 4, la aparición de varias bandas mayoritarias se atribuye al procesamiento deficiente del extremo amino terminal ya que la purificación de la lipasa termófila se realiza a partir de extracto crudos intracelulares. El procesamiento de la lipasa recombinante comprende la eliminación del péptido señal en el retículo endoplasmático rugoso y el procesamiento proteolítico en el aparato de Golgi (Caplan, S., Green, R., Rocco, J., Kuijan, J. (1991). J Bacteriol. 173(2): 627-635). El procesamiento incompleto de la lipasa termófila daría lugar a las bandas que aparecen en los geles de las Figuras 3 y 4 (Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A. (2000). J. Mol. Cat. B: Enzymatic 10 (1-3): 233-240). Por este motivo, y para reducir el número de bandas, previo a la realización del gel se procedió a tratar los eluidos de las muestras obtenidas a partir de la expresión con *S. cerevisiae* con la enzima enterokinasa que corta en el extremo carboxilo terminal del péptido FLAG que se encuentra en el extremo amino terminal de la proteína, eliminando así la señal de secreción si estuviera presente. Tras un tratamiento de 12 horas a temperatura ambiente, se obtuvieron dos únicas bandas de un peso molecular de, aproximadamente, 1 KDa menor que las bandas anteriores (Figura 5).

A continuación, para confirmar que ambas bandas corresponden a la lipasa purificada producida por *S. cerevisiae*, se procedió a secuenciar el extremo amino terminal de ambas bandas. El resultado fue la identificación inequívoca de ambas bandas como la lipasa recombinante producida por la cepa *S. cerevisiae*, pues en la secuenciación se obtuvo la secuencia aminoacídica de la lipasa a continuación del optapéptido FLAG. Por tanto, la existencia de dos bandas mayoritarias de distinto peso molecular se atribuye a un procesamiento proteolítico del extremo carboxilo terminal de la lipasa recombinante. La obtención de proteína recombinante de menor tamaño que el esperado por rotura de parte del extremo carboxilo terminal, es un fenómeno que ha sido documentado con el sistema de expresión YEpFLAG1 en *S. cerevisiae* [Mersich, C., *et al.* (2007). Biotechnol. J. 2007, 2, 672-677; and Schuster, M., *et al.* (2000). J. Biotechnol. 84: 237-248].

ES 2 354 326 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado con actividad lipasa 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 lipasa es una lipasa termófila.
3. Polipéptido según la reivindicación 2, donde dicha lipasa termófila es estable a una temperatura comprendida entre 60 y 90°C.
- 10 4. Una proteína de fusión que comprende
- i) un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
- 15 ii) al menos un péptido heterólogo.
5. Proteína de fusión según la reivindicación 4, donde dicho péptido heterólogo se selecciona del grupo de un péptido señal de secreción extracelular, un péptido de purificación o una combinación de ambos.
- 20 6. Proteína de fusión según la reivindicación 5, donde dicho péptido de purificación se selecciona entre un péptido Flag o una cola de polihistidinas.
7. 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 6.
- 25 8. Una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7.
9. Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7 o una construcción génica según la reivindicación 8.
- 30 10. Vector de expresión según la reivindicación 9, que comprende, además, la secuencia de nucleótidos de un promotor.
- 35 11. Vector de expresión según la reivindicación 10, donde dicho promotor es un promotor inducible o reprimible.
12. Vector de expresión según la reivindicación 11, donde dicho promotor es un promotor inducible por galactosa o lactosa.
- 40 13. Vector de expresión según la reivindicación 11, donde dicho promotor es un promotor inducible por IPTG.
14. Vector de expresión según la reivindicación 11, donde dicho promotor es un promotor que se reprime en presencia de glucosa.
- 45 15. Una célula que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7 o una construcción génica según la reivindicación 8 o un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14.
16. Célula según la reivindicación 15, donde dicha célula se selecciona entre una bacteria y una levadura.
- 50 17. Célula según la reivindicación 16, donde dicha bacteria es *Escherichia coli*.
18. Célula según la reivindicación 16, donde dicha levadura se selecciona entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*.
- 55 19. 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 6.
20. Un procedimiento para la obtención de un polipéptido con actividad lipasa o una variante funcionalmente equivalente del mismo que comprende cultivar una célula según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 bajo condiciones que permiten la producción de dicho polipéptido y, si se desea, recuperar dicho polipéptido.
- 60 21. Procedimiento según la reivindicación 20, donde cuando dicho polipéptido con actividad lipasa comprende la secuencia de aminoácidos de un péptido de secreción extracelular, la recuperación de dicho polipéptido se realiza a partir del medio de cultivo.
- 65 22. Procedimiento según la reivindicación 20, en donde la recuperación de dicho polipéptido con actividad lipasa se realiza a partir de los extractos celulares.

ES 2 354 326 A1

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 6 en la elaboración de una composición detergente.

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 6 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

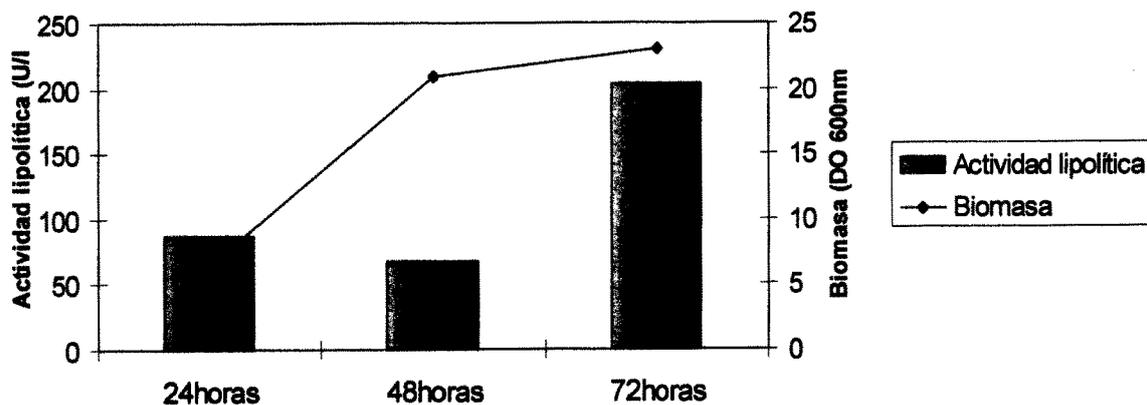
50

55

60

65

A



B

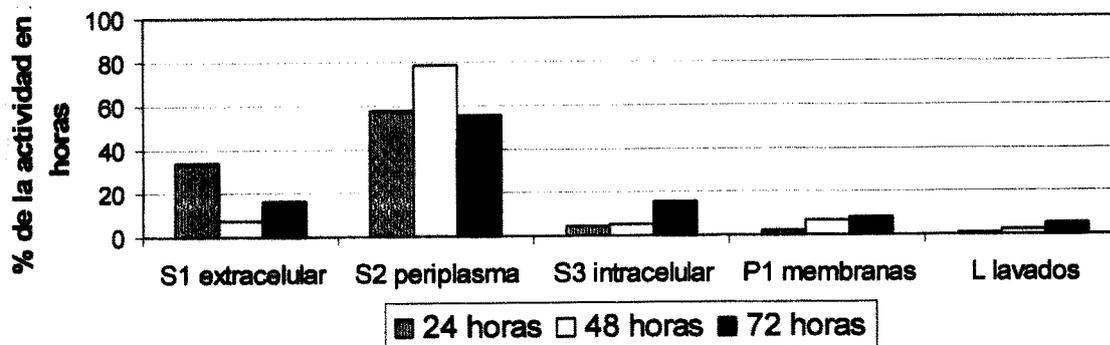
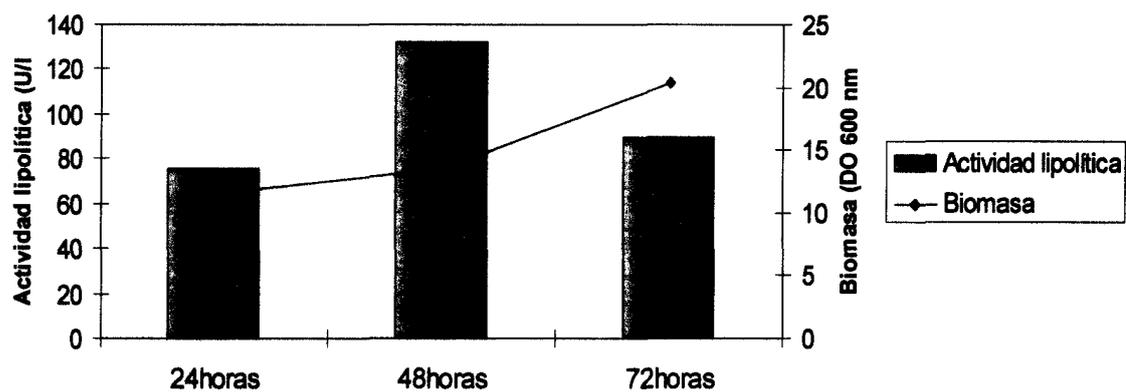


FIGURA 1

A



B

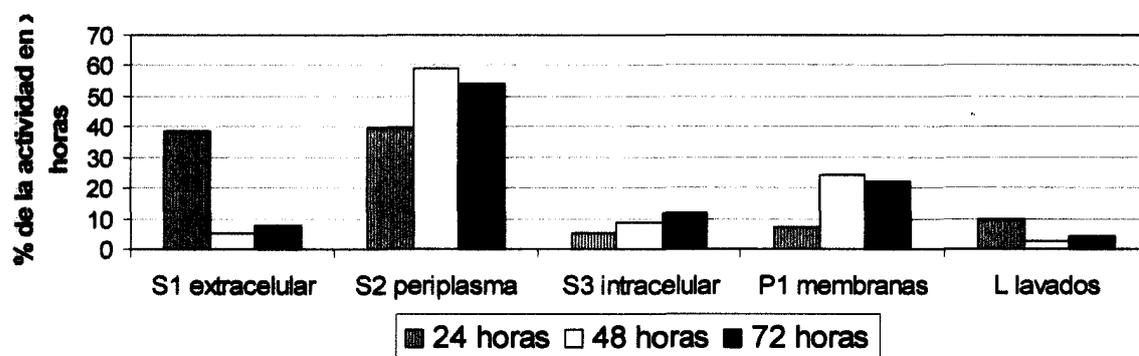


FIGURA 2

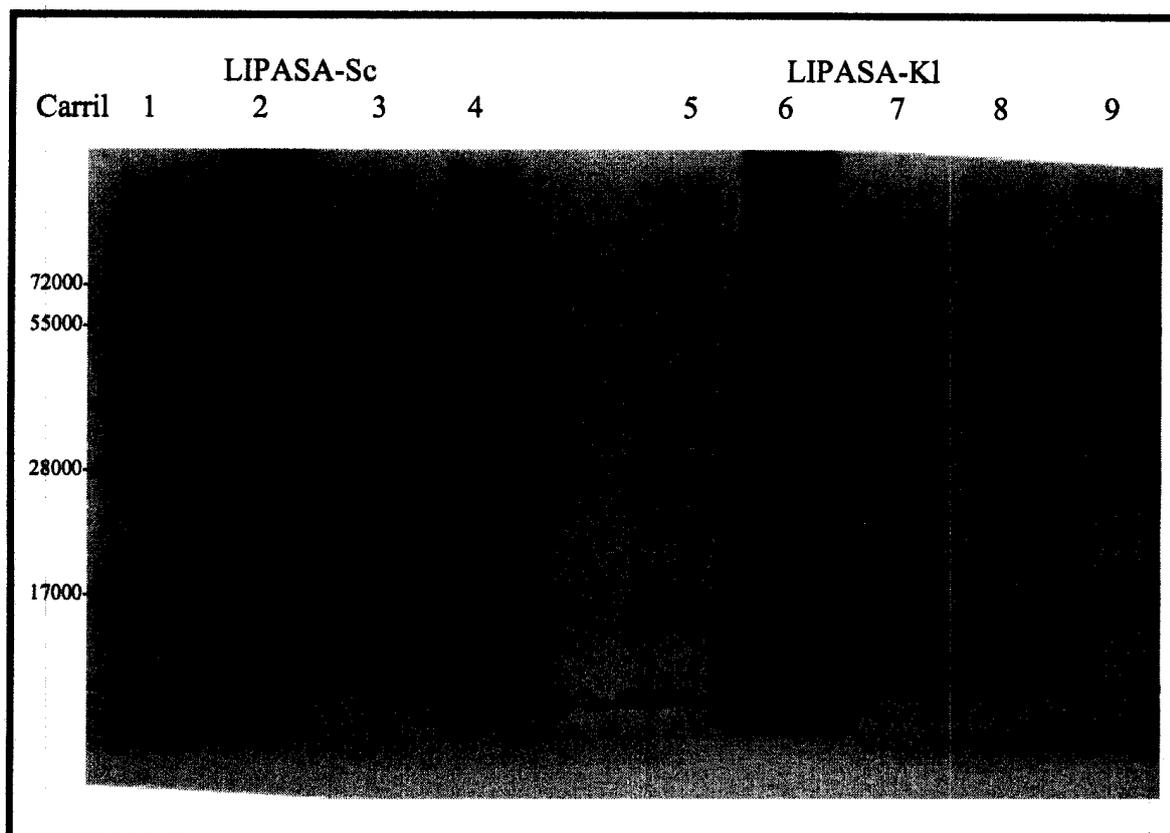


FIGURA 3

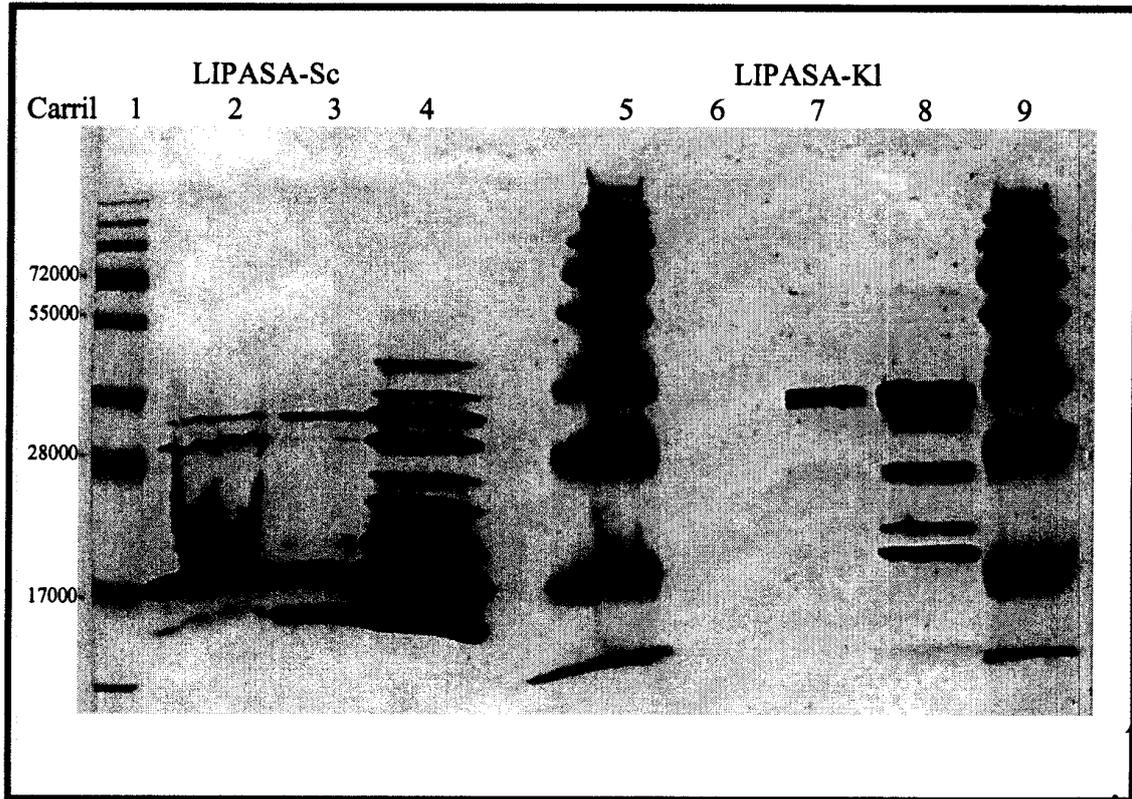


FIGURA 4

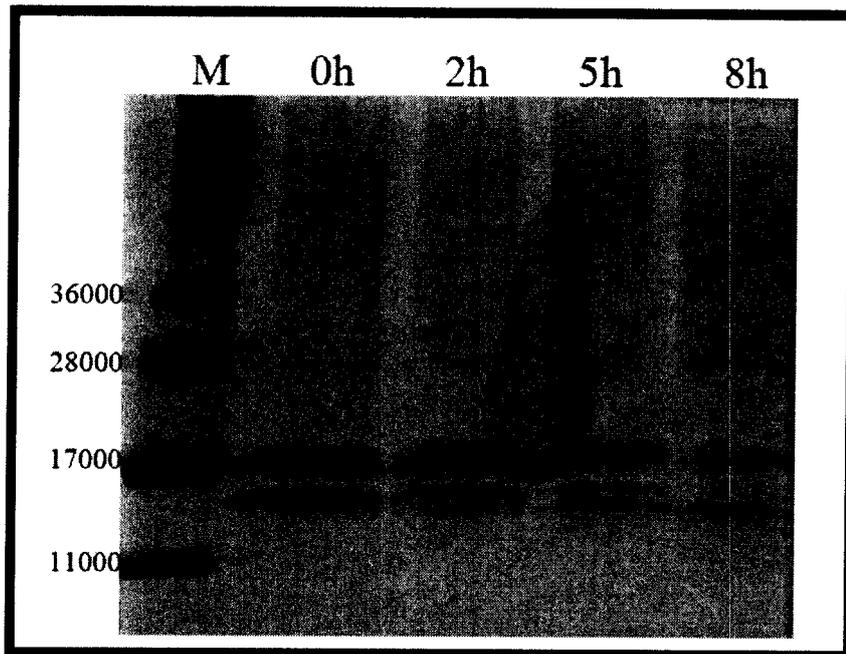


FIGURA 5

ES 2 354 326 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDADE DA CORUÑA y UNIVERSIDAD DE VIGO

5 <120> Lipasa termófila

<130> P3669ES00

10 <160> 7

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 161

<212> PRT

20 <213> *Thermus thermophilus*

<220>

<221> source

25 <222> (1)..(161)

<223> /organism="Thermus thermophilus"

/mol_type="PRT"

/strain="HB27"

30 <400> 1

Met Leu Phe Pro Arg Glu Val Leu Pro Ser Leu Leu His Leu Thr Pro
1 5 10 15

35 Ala Trp Leu Lys Ala Arg Gly Leu Lys Gly Val Ile Leu Asp Leu Asp
20 25 30

40 Asn Thr Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Gly Asp Leu Pro Glu Ala Tyr Arg
35 40 45

45 Ala Trp Leu Ser Asp Leu Lys Gly Ala Val Pro Val Tyr Leu Leu Ser
50 55 60

50 Asn Ala Leu Pro Glu Arg Phe Ala Arg Val Gln Arg Leu Leu Asp Leu
65 70 75 80

55 Pro Gly His Ala Pro Ala Leu Lys Pro Trp Phe Gly Phe Arg Lys Ala
85 90 95

60 Leu Lys Ala Leu Gly Leu Pro Ala Arg Glu Val Ala Ala Val Gly Asp
100 105 110

65 Gln Val Phe Thr Asp Val Leu Gly Gly Asn Leu Val Gly Ala Tyr Thr
115 120 125

Val Leu Val Pro Pro Leu Arg Glu Gln Glu Phe Phe Tyr Thr Arg Phe
130 135 140

ES 2 354 326 A1

Ile Arg Met Leu Glu Ala Pro Phe Arg Arg Pro Arg Gly Gly Val Thr
145 150 155 160

- 5 Arg
- <210> 2
10 <211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>
<223> Cebador PURLIP directo empleado para amplificar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima heteróloga con actividad lipasa
- 20 <400> 2
cgggatccga atgctcttcc cccgggaggt 30
- 25 <210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Cebador PURLIP inverso empleado para amplificar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima heteróloga con actividad lipasa
- 35 <400> 3
cccaagcttt ctgctcacac ccctcg 27
- 40 <210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> Cebador LIP1K directo empleado para amplificar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima heteróloga con actividad lipasa
- 50 <400> 4
ttagatcta tgctcttccc cccgggaggtc 30
- 55 <210> 5
<211> 57
60 <212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>
<223> Cebador LIP1K inverso empleado para amplificar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima heteróloga con actividad lipasa

ES 2 354 326 A1

<400> 5

tttggtaacct tacttgatcat cgtcatcctt gtagtctctc gtcacacccc ctcgagg

57

5

<210> 6

<211> 51

<212> DNA

10 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador PFLAG-LIP directo empleado para amplificar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima heteróloga con actividad lipasa

<400> 6

20 aaaagagact acaaggatga cgatgacaag ctcttcccc gggaggtcct c

51

<210> 7

<211> 51

25 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Cebador PFLAG-LIP inverso empleado para amplificar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima heteróloga con actividad lipasa

<400> 7

35 tgggacgctc gacggatcag cggccgctta tctcgtcaca ccccctcgag g

51

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200900613

②² Fecha de presentación de la solicitud: 04.03.2009

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12N15/55** (01.01.2006)
C12R1/01 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Base de datos UniProt. Número de acceso Q5SLD0_THET8, Versión 17. [en línea] 14.10.2008 [recuperado el 15.02.2011] Recuperado de Internet: <URL:http://www.uniprot.org/uniprot/Q5SLD0.txt?version=17>	1-24
A	HENNE, A., BRÜGGEMANN, H., RAASCH, C. et al. The genome sequence of the extreme thermophile <i>Thermus thermophilus</i> . Nature Biotechnology. Mayo 2004, Vol. 22, Nº 5, páginas 547-553. ISSN 1087-0156. <Doi:10.1038/nbt956> & Base de datos UniProt. Número de acceso Q72H72_THET2, Versión 22. [en línea] 14.10.2008 [recuperado el 15.02.2011] Recuperado de Internet: <URL:http://www.uniprot.org/uniprot/Q72H72.txt?version=22>	1-24
A	FUCIÑOS, P., ABADÍN, C. M., SANROMÁN, A. et al. Identification of extracellular lipases/esterases produced by <i>Thermus thermophilus</i> HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterisation. Journal of Biotechnology. Mayo 2005, Vol. 117, Nº 3, páginas 233-241. ISSN 0168-1656. <Doi:10.1016/j.jbiotec.2005.01.019>	1-24
A	FUCIÑOS, P., DOMÍNGUEZ, A., SANROMAN, M. A. et al. Production of thermostable lipolytic activity by <i>Thermus</i> species. Biotechnology Progress. Julio 2005, Vol. 21, Nº 4, páginas 1198-1205. ISSN 8756-7938. <Doi:10.1021/bp050080g>	1-24
A	FUKATSU, M., ARAKAWA, I., NEGISHI, Y. et al. Purification and properties of lipase derived from the extreme thermophile, <i>Thermus thermophilus</i> 111. Yukagaku.1993, Vol. 42, Nº 3, páginas 179-183. ISSN 0513-398X. (resumen). Base de datos Refdoc.fr. [en línea] [recuperado el 16.02.2011] Recuperado de Internet: <URL: http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4832394>	1-24
A	FUCIÑOS, J. P. Un estudio integrado das lipasas de <i>Thermus thermophilus</i> HB27: condicions de produccion, localicion celular, purificación e caracterizacion. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo, 19.03.2007. (resumen) Base de datos Teseo. [en línea] [recuperado el 21.02.2011] Recuperado de Internet: <URL: https://www.educacion.es/teseo/createpdf?origen=3&idFicha=149063>	1-24

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
21.02.2011

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/5

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

C12N, C12R

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

EPODOC, INVENES, WPI, MEDILINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, COMPENDX, INSPEC, XPESP, aaGeneSeq, UniProt, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents, PDB

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-24	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-24	SI
	Reivindicaciones	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 se publica.

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	Base de datos UniProt. Número de acceso Q5SLD0_THET8.	14.10.2008
D02	HENNE, A. et al. Nature Biotechnology. Mayo 2004, Vol. 22, Nº 5, páginas 547-553.	05.2004
D03	FUCINOS, P. et al. Journal of Biotechnology. Mayo 2005, Vol. 117, Nº 3, páginas 233-241.	05.2005
D04	FUCINOS, P. et al. Biotechnology Progress. Julio 2005, Vol. 21, Nº 4, páginas 1198-1205.	07.2005
D05	FUKATSU, M. et al. Yukagaku. 1993, Vol. 42, Nº 3, páginas 179-183.	1993
D06	FUCINOS, J. P. Un estudio integrado das lipasas de <i>Thermus thermophilus</i> HB27: condicions de produccion, localicion celular, purificación e caracterizacion. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo.	19.03.2007

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, tiene por objeto una lipasa termófila estable a una temperatura entre 60-90°C, que comprende la secuencia SEQ. ID. NO. 1, o una variable funcionalmente equivalente de la misma (reivindicaciones de la 1 a la 3). Esta lipasa se ha aislado de *Thermus thermophilus* HB27. Así mismo, se contempla una proteína de fusión que comprende dicha proteína, junto con un péptido señal de secreción celular y/o un péptido de purificación (reivindicaciones de la 4 a 6). En consecuencia, también son objeto de la invención: la secuencia nucleotídica que codifica para la lipasa o la proteína de fusión (reivindicación 7); la construcción génica que la comprenda (reivindicación 8); un vector de expresión que comprenda cualquiera de las secuencias (reivindicaciones de la 9 a la 14); la célula que comprenda la secuencia, construcción génica o vector (reivindicaciones de la 15 a la 18); y la composición que comprenda o la lipasa, o la proteína de fusión (reivindicación 19). Además, se incluyen un procedimiento de obtención de la lipasa (reivindicaciones de la 20 a la 22) y un método de modificación de grasas o aceites que comprende poner en contacto o la lipasa o la proteína de fusión, con la grasa o aceite (reivindicación 24). Por último, tanto la lipasa, como la proteína de fusión, se pueden utilizar en la elaboración de detergentes (reivindicación 23).

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

El objeto de la presente solicitud, según la reivindicación 1, es una lipasa que comprende la secuencia SEQ. ID. NO. 1, o una variante funcionalmente equivalente.

D01 y D02 divulgan sendas secuencias de *Thermus thermophilus* HB8 y HB27, que presentan un 100% de identidad con la SEQ. ID. NO. 1. Sin embargo, en ninguno de los dos documentos, se afirma que esta proteína pueda tener actividad lipasa: en D01 se apunta una posible actividad hidrolasa; y en D02 no le asignan ninguna función, hipotetizándose que son otras secuencias de *T. thermophilus* las que tienen actividad esterasa.

En D03 se aíslan dos lipasas/esterasas de *T. thermophilus* HB27. Dichas enzimas tienen un peso molecular de 34 y 62 kDa y su temperatura óptima es de 80°C, siendo estables incluso a 85°C.

D04 anticipa la existencia de dos lipasas/esterasas de 34 y 62 kDa en *T. thermophilus* HB27, *T. thermophilus* HB8, *T. aquaticus* YT1 y *Thermus* sp.

En D05 se caracteriza una lipasa termoestable incluso a 100°C procedente de *T. thermophilus* 111, pero no se anticipa su secuencia.

D06 es un resumen de una tesis doctoral en la que se purifican y caracterizan las enzimas lipolíticas de *T. thermophilus* HB27.

Cabe destacar, que en ninguno de los documentos D03, D04, D05 ó D06, se divulga ninguna secuencia las enzimas estudiadas.

Dado que no hay ningún dato que muestre una posible relación entre las secuencias anticipadas en D01 ó D02, y las lipasas cuyas características se describen en D03, D04, D05 y D06, se considera que la reivindicación 1 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva.

2.REIVINDICACIONES DE LA 2 A LA 24

Las reivindicaciones de la 2 a la 19, son dependientes de la reivindicación 1, por lo que, al igual que ésta, son nuevas y presentan actividad inventiva.

Así mismo, al tener novedad y actividad inventiva tanto la lipasa de SEQ. ID. NO. 1 como su proteína de fusión, el procedimiento de obtención de estas proteínas (reivindicaciones de la 20 a la 22); el uso de las mismas en la elaboración de un detergente (reivindicación 23); y el método de modificación de grasas o aceites, que comprenda la puesta en contacto de éstos con dichas enzimas (reivindicación 24), también cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva.