



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 370 216**

② Número de solicitud: 201030723

⑤ Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **17.05.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**13.12.2011**

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Maté Mate, Diana;**  
**Valdivieso Ugarte, Malena;**  
**Fernández Torres, Layla y**  
**Alcalde Galeote, Miguel**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Lacasa de alto potencial redox.**

⑤ Resumen:

Lacasa de alto potencial redox.

La presente invención describe la evolución dirigida de una lacasa de alto potencial redox expresada funcionalmente en *S. cerevisiae* que presenta una alta tasa de producción, una elevada actividad y una gran termoestabilidad. La presente invención se refiere a la secuencia aminoacídica de dicha lacasa y a la secuencia nucleotídica que codifica para dicha lacasa. La lacasa de la invención presenta aplicaciones en diversos sectores: nano-biotecnología, industria papelera, biorremediación, industria textil, industria alimentaria, industria farmacéutica, industria química, etc.

## DESCRIPCIÓN

Lacasa de alto potencial redox.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular, la tecnología del ADN recombinante y la biotecnología. Específicamente, se refiere a una enzima oxidasa de tipo lacasa mejorada en su expresión funcional, su actividad catalítica y su termoestabilidad. La expresión funcional, mejora de actividad catalítica y termoestabilidad de la lacasa se lleva a cabo en células eucariotas de *Saccharomyces cerevisiae* a través de un proceso de evolución molecular dirigida. Dicha enzima pueden emplearse como catalizador en procesos industriales relacionados con la transformación de la biomasa lignocelulósica para la obtención de biocombustibles o la elaboración de productos de madera y papel con nuevas propiedades, para el sector alimentario, la producción textil y el sector químico, así como para la biorremediación de efluentes y contaminantes ambientales, y para el diseño de bionanodispositivos.

15 **Estado de la técnica anterior**

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son un grupo de oxidasas ampliamente distribuido en plantas superiores y en hongos, aunque también se han descrito en algunas bacterias e incluso en cutículas de insectos (Alcalde, 2007. Industrial enzymes. Structure, function and applications. Ed. Polaina, J. y MacCabe, A.P. Springer, Heidelberg (Alemania), pp. 459-474). Pertenecen a la familia de las oxidasas multicobre azul (junto con las ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina), y se presentan generalmente como glicoproteínas monoméricas extracelulares.

Las lacasas, individualmente, catalizan la oxidación de un amplio espectro de sustancias orgánicas aromáticas. Entre estas sustancias se encuentran los orto y para-difenoles, los fenoles metoxi-sustituídos, los bencenotioles, los hidroxindoles, el 1-naftol y la siringaldazina (Gianfreda *et al.*, 1999. Bioremediation Journal 3:1-25). Los radicales libres resultantes sufren diferentes reacciones dependiendo de su estructura y de las condiciones de reacción. El acoplamiento de radicales libres generando productos diméricos o poliméricos y las descarboxilaciones oxidativas son las reacciones más frecuentes. También son sustratos de lacasas los compuestos metálicos inorgánicos/orgánicos. El  $Mn^{2+}$  es oxidado a  $Mn^{3+}$  y también el Fe (EDTA)<sup>2-</sup> es aceptado por la enzima (Thurston, 1994. Microbiology-UK 140:19-26).

La oxidación de todos estos sustratos va acoplada a la reducción del oxígeno molecular a dos moléculas de agua. Esto significa que por cada molécula de oxígeno reducida, se oxidan 4 moléculas de sustrato sin producir peróxido de hidrógeno. Por estos motivos, las lacasas se consideran como los catalizadores “verdes” ideales ya que emplean  $O_2$  como co-sustrato generando únicamente  $H_2O$  como subproducto.

Las lacasas contienen un cobre de tipo 1 (T1) donde tiene lugar la oxidación del sustrato reductor, y un centro o *cluster* trinuclear con tres cobres, un T2 y dos T3, donde tiene lugar la reducción del  $O_2$ . El mecanismo de reacción debe funcionar como una batería, almacenando electrones de las reacciones de oxidación individuales para reducir el oxígeno molecular y producir agua (Davies, 2002. Laccase. En: Handbook of Metallproteins. (ed A. Messerschmidt *et al.*), pp. 1359-1368. John Wiley and Sons, LTD, New York).

El potencial redox formal ( $E^\circ$ ) de las lacasas tiene una relación directa con la energía requerida para arrancar un electrón al sustrato reductor, constituyendo una de las características fundamentales de estas enzimas. De hecho, el comportamiento catalítico de las lacasas sobre la mayoría de los sustratos reductores depende del  $E^\circ$  en el Cu T1 (aceptor de electrones). De este modo, las lacasas con un mayor  $E^\circ$ T1 son de especial interés en biotecnología debido a que son capaces de oxidar sustratos con mayor  $E^\circ$  como ciertos hidrocarburos aromáticos policíclicos o diversos colorantes orgánicos sintéticos. El  $E^\circ$  de diferentes lacasas ha sido ampliamente estudiado mediante técnicas espectroelectroquímicas (principalmente voltamperometría cíclica y valoraciones redox) haciendo uso de diferentes tipos de electrodos y mediadores redox (Xu, F. *et al.*, 1998. Biochem. J. 334:63-70; Shleev, S.V. *et al.* 2004. Biochimie 86:693-703).

El  $E^\circ$  del Cu T1 de algunas lacasas fúngicas es mayor ( $E^\circ$ T1 cercano a +800 mV) que el de las lacasas de plantas o bacterianas (por ejemplo la lacasa de *Rhus vernicifera* tiene un  $E^\circ$ T1= +400 mV) y otras oxidasas multicobre azul (ascorbato oxidasa  $E^\circ$ T1= +340 mV). Sin embargo, es importante señalar que también existen marcadas diferencias en los  $E^\circ$ T1 de las diferentes lacasas fúngicas, desde +465 mV de la lacasa del ascomiceto *Myceliophthora thermophila* hasta +790 mV de la lacasa del basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus*. En este sentido, se ha realizado un enorme esfuerzo con la intención de dilucidar qué factores determinan estas diferencias en los  $E^\circ$ T1, sobre todo si se tienen en cuenta las geometrías de coordinación de los sitios de Cu, prácticamente conservadas. La mayor parte de estos estudios físico-químicos se ha servido del conocimiento aportado por los modelos cristalográficos disponibles. En concreto se han resuelto a fecha de hoy las estructuras en 3D de 8 lacasas de *Coprinus cinereus*, *Melanocarpus albomyces*, *Bacillus subtilis*, *Trametes versicolor*, *Rigidoporus lignosus*, *Lentinus tigrinus*, *Trametes trogii* y *Pycnoporus cinnabarinus*.

Las llamadas “lacasas de alto potencial redox” -procedentes de hongos basidiomicetos de podredumbre blanca- poseen un enorme potencial biotecnológico debido a su amplia especificidad de sustrato (oxidan fenoles, aminas, tioles, antraceno, etc.) y a sus bajos requerimientos de aplicación (sólo requieren oxígeno, que es transformado en agua durante la reacción). Cuando actúan sobre el polímero de lignina (o compuestos de tipo fenólico) pueden catalizar tanto actividades de degradación como de polimerización. Además, su rango de sustratos puede ser ampliado a compuestos no fenólicos más difíciles de degradar utilizando mediadores redox, de origen natural o sintético, en los denominados sistemas lacasa-mediador (Camarero *et al.*, 2005. Appl. Environ. Microb. 71:1775-1784).

## ES 2 370 216 A1

La tecnología de las lacasas de alto potencial redox puede ser empleada en prácticamente la totalidad de la cadena de producción de productos papeleros: la elaboración de la pasta de papel, el blanqueo libre de cloro de las pastas, la eliminación del *pitch* o el tratamiento de efluentes.

5 En la industria de productos forestales dos áreas más de investigación emergentes son a) el diseño de materiales lignocelulósicos con nuevas propiedades de resistencia y estabilidad mediante el injerto de compuestos fenólicos catalizado por lacasa, en la denominada “funcionalización de las fibras de celulosa”; y b) el uso de lacasas para la mejora en la adhesión de tableros de madera (mediante el acoplamiento enzimático *in situ* de la lignina), sin necesidad de utilizar adhesivos tóxicos a base de formaldehído. Además, las lacasas encuentran aplicaciones en los siguientes  
10 sectores (Xu, 2005. *Industrial Biotechnology* 1:38-50):

- i) La industria alimentaria: procesamiento de bebidas o de productos de panadería.
- 15 ii) La industria textil: degradación (detoxificación) de los colorantes de los efluentes o blanqueo de tejidos (lavado a la piedra de *jeans*).
- 20 iii) Nanobiotecnología: a) como detectores de fenoles, oxígeno, azidas, morfina, codeína, catecolaminas o flavonoides en la elaboración de biosensores para análisis clínicos y medioambientales; y b) elaboración de biopilas de combustible que ofrecen energía eléctrica limpia (sin utilizar combustibles fósiles) mediante la inmovilización de lacasas en el cátodo.
- iv) Biorremediación: degradación de PAHs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos), compuestos AOX (Halógenos Orgánicos Absorbibles), etc.
- 25 v) Síntesis química: a) producción de polímeros complejos (ej. policatecol para resinas de cromatografía); b) síntesis de agentes farmacológicos: antitumorales (ej. viblastina), nuevos derivados antibióticos (ej de la ciclosporina A), o colorantes (Suberasa® de Novozymes); c) cosméticos: tintes de cabello formulados con lacasa.

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

35 Por este motivo, se ha estudiado en profundidad la expresión heteróloga de lacasas fúngicas en hospedadores eucariotas (Kunameni *et al.* 2008 *Microbial Cell Factories.*, 7:32). Se ha realizado especial hincapié en sistemas de expresión basados en hongos filamentosos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae* y *Trichoderma reesei*); y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia methalonica*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis*). Gracias a los avances obtenidos en el diseño de biorreactores y a la optimización de las condiciones de expresión en levaduras, se han alcanzado niveles de expresión de unos 20 mg de lacasa activa por litro de cultivo en *Yarrowia lipolytica* o *Pichia pastoris*. Estos niveles son significativamente inferiores a los 135 mg/L obtenidos en *Aspergillus oryzae* o los 920 mg/L en *Trichoderma*. Sin embargo, la elección de levaduras como *S. cerevisiae* como  
40 hospedador ofrece la valiosa ventaja de poder mejorar las propiedades catalíticas de las lacasas recombinantes o su estabilidad en las condiciones de operación, mediante técnicas de evolución molecular dirigida.

Se ha estudiado la expresión en *S. cerevisiae* de lacasas de los hongos *Coriolus hirsutus*, *Trametes versicolor*, *Melanocarpus albomyces*, *Trametes* sp. strain C30, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus coccineus* y *Pleurotus eryngii*, aunque los niveles de expresión funcional detectados han sido mínimos (Kunameni *et al.*, 2008. *Microbial Cell Factories.*  
50 7:32). No obstante, la expresión funcional de lacasas fúngicas en *S. cerevisiae* puede ser incrementada significativamente mediante técnicas de evolución molecular dirigida, que permite el diseño de nuevas funciones enzimáticas no existentes en ambientes naturales o la mejora de ciertas propiedades de la enzima (Arnold, 2001. *Nature* 409:253-257). Esta metodología recrea en el laboratorio los procesos claves de la evolución natural (mutación, recombinación y selección) de manera que es posible diseñar enzimas de gran interés científico y tecnológico. De esta manera,  
55 sometiendo los genes seleccionados a ciclos sucesivos de evolución molecular, las diferentes mutaciones puntuales beneficiosas se irán acumulando y combinando hasta adquirir la propiedad deseada, que se ve mejorada de manera exponencial, generación tras generación. Utilizando este procedimiento se consiguió incrementar hasta 18 mg/L la producción de lacasa del ascomiceto *Myceliophthora thermophila* en *S. cerevisiae* (Bulter *et al.*, 2003. *Appl. Environ. Microb.* 69: 987-995. 2003).

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

Aunque, considerando la eficiencia de transformación, la estabilidad del ADN plasmídico y la tasa de crecimiento, *E. coli* es el organismo hospedador más frecuentemente utilizado en la expresión funcional heteróloga de los genes que codifican la proteína de interés, el diferente uso de codones, y la imposibilidad de realizar las modificaciones post-traduccionales necesarias para la correcta secreción de la proteína madura (como el procesamiento proteolítico o las glicosilaciones) pueden causar un plegamiento inapropiado de la proteína que es acumulada en cuerpos de inclusión, impidiendo su expresión funcional. Esto es especialmente cierto para las lacasas fúngicas para las que no se ha logrado todavía su expresión funcional en *E. coli*. Algunos de estos problemas pueden evitarse si estos genes se expresan en hospedadores eucarióticos cuya maquinaria celular sea más próxima a la nativa, como es el caso de las levaduras. En especial, el uso de *Saccharomyces cerevisiae* es de gran interés ya que posee la habilidad de glicosilar y secretar las proteínas al medio extracelular (lo cual evita en muchos casos pasos intermedios de lisis celular) y tiene una elevada eficiencia de transformación. Además, haciendo uso de un vector episódico adecuado, no integra el plásmido dentro de su genoma, facilitando así su posterior manipulación. Otra ventaja muy interesante desde un punto de vista evolutivo es su elevada frecuencia de recombinación de ADN, la cual a diferencia de *E. coli* permite la construcción de genotecas *in vivo* a través de la recombinación homóloga de diferentes genes (conocido como *in vivo* ADN shuffling o “barajeo”). Por último, la ligación de los genes mutados en vectores de expresión es, en muchos casos, un paso laborioso que requiere un ajuste fino. En levaduras, el mecanismo reparador de huecos (*in vivo* gap repair) puede sustituir la ligación *in vitro* de una manera rápida y precisa (Bulter & Alcalde, 2003. Directed evolution: library creation. Methods and protocols. Ed. Arnold, F.H. y Georgiou, G. Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU), pp. 17-22).

La evolución molecular dirigida de lacasas fúngicas presenta como requisito indispensable la expresión funcional de la enzima en *Saccharomyces cerevisiae*. La expresión funcional en *S. cerevisiae* de lacasas de alto potencial redox -procedentes de basidiomicetos- no se ha descrito con éxito hasta el momento. Únicamente se ha reportado la mejora por evolución dirigida de lacasas de bajo potencial de oxido-reducción por el grupo de M. Alcalde y colaboradores. Dichos trabajos se han centrado en la lacasa de bajo potencial redox ( $E^{\circ}T1 = +475$  mV) del ascomiceto *Myceliophthora thermophila*. En estos trabajos, los niveles de expresión funcional en *S. cerevisiae* se lograron beneficiándose de la similitud existente entre el microorganismo de partida (*Myceliophthora thermophila*) y *S. cerevisiae*, ambos ascomicetos. Con este sistema se ha conseguido mediante evolución dirigida: i) su expresión funcional en *S. cerevisiae*, (Bulter *et al.*, 2003. Appl. Environ. Microb. 69: 987-995.); y ii) su estabilización en cosolventes orgánicos, (Zumarraga *et al.*, 2007. Chem. Biol. 14: 1052-1064.; Zumarraga *et al.*, 2008. Proteins 71: 250-260.; Zumarraga *et al.*, 2007 Biocatal. Biotrans. 25: 219-228; Alcalde *et al.*, 2005. J. Biomol. Screen. 10: 624-631).

Dado que el rango de actuación de la lacasa evolucionada de *Myceliophthora thermophila* está limitado por su bajo potencial redox ( $E^{\circ}T1 = +475$  mV) que le impide catalizar eficientemente la oxidación de moléculas con potenciales redox superiores al suyo, las lacasas de alto potencial redox producidas por hongos basidiomicetos de podredumbre de la madera suponen un punto de partida más adecuado para la mejora de las propiedades de la lacasa por evolución dirigida, debido a su mayor aplicabilidad biotecnológica.

Las lacasas de alto potencial redox son un claro ejemplo de biocatalizador generalista que convierte en virtud su promiscuidad de sustratos. Impulsadas por oxígeno molecular, las lacasas de alto potencial redox transforman cientos de sustratos de diferente naturaleza y complejidad, abarcando desde xenobióticos (por ejemplo: pesticidas, tintes industriales, hidrocarburos aromáticos policíclicos) hasta biopolímeros (lignina, almidón). De aquí que las lacasas de alto potencial redox encuentren aplicaciones potenciales en biorremediación, refinado de textiles, bioblanqueo de pasta de papel, biocombustibles, síntesis orgánica y muchos otros procesos (Xu, 2005. Biochem. J. 334, 63-70; Kunamneni *et al.*, 2008. Microb. Cell Fact. 7, 32; Widsten y Kandelbauer, 2008. Enzyme Microb. Tech. 42, 293-307). Además, las lacasas de alto potencial redox son de las pocas enzimas capaces de aceptar electrones de manera directa desde un compartimento catódico, siendo así esenciales para la bioelectroquímica en la ingeniería de nanobiodispositivos, lo cual genera un interés especial en el diseño de bionanosensores tridimensionales y biopilas de combustible (Shleev *et al.*, 2005. Bioelectrochemistry 67, 115-124). Desafortunadamente, su diseño práctico mediante evolución dirigida se ha visto hasta ahora impedido por la falta de enfoques apropiados para evitar los complejos problemas encontrados durante su expresión funcional (Roodveldt *et al.*, 2005. Curr. Opin. Struc. Biol. 15, 50-56). De hecho, existen únicamente unos pocos estudios preliminares debido a la pobre excitosis producida por la levadura (Festa *et al.*, 2008. Proteins 72, 25-34; Cusano *et al.*, 2009; Miele *et al.*, 2010. J. Appl. Microbiol. 108, 998-1006). La lacasa de alto potencial redox de la presente invención, diseñada *ad hoc*, es fácilmente exportable y soluble, en forma activa y estable, lo que abre un abanico de posibilidades para su futura ingeniería. En efecto, el meticuloso diseño experimental empleado, que involucró la evolución dirigida y la mutagénesis dirigida, ha sido crucial para crear un biocatalizador altamente activo y termoestable que ahora está disponible para enfrentarse a nuevos retos. Asimismo, la evolución conjunta del gen foráneo de la lacasa de alto potencial redox con el gen del preprolídido del factor  $\alpha$  proporciona una forma idónea de mejorar estas capacidades a partir de niveles de expresión indetectables. Esta estrategia puede ser ahora aprovechada para diseñar otras lacasas de alto potencial redox, lo que apoya la idea general de emplear la evolución dirigida del preprolídido del factor  $\alpha$  como molde general para la expresión de diferentes sistemas enzimáticos (Rakestraw *et al.*, 2009. Biotechnol. Bioeng. 103, 1192-1201). Esperamos que en el futuro próximo, las lacasas de alto potencial redox diseñadas mediante evolución dirigida y enfoques racionales en *S. cerevisiae* puedan afrontar retos atractivos presentes en la biocatálisis tradicional y moderna.

El grupo de M. Alcalde y colaboradores describe en Microbial Cell Factories (2010, 9:17) varias lacasas generadas mediante varios métodos de evolución dirigida de las secuencias polinucleotídicas que comprenden el gen de la lacasa de alto potencial redox ( $E^{\circ}T1 = +790$  mV) del hongo basidiomiceto PM1, y la secuencia codificante de la secuencia

señal nativa del factor  $\alpha$ . De esta forma, estos autores han dado lugar a una expresión funcional mejorada en *S. cerevisiae* y a una actividad enzimática aumentada hacia uno o más sustratos.

5 Sin embargo, hasta la fecha no se ha conseguido producir lacasas de alto potencial redox con una elevada actividad y una elevada termoestabilidad en cantidad suficiente.

### Descripción de la invención

10 La presente invención describe la evolución dirigida de una lacasa de alto potencial redox expresada funcionalmente en *S. cerevisiae* que presenta una elevada actividad y una gran termoestabilidad. El punto de partida fue la lacasa de alto potencial redox del basidiomiceto PM1, la cual exhibe unas destacables propiedades de estabilidad y actividad, incluyendo activación térmica (Coll *et al.*, 1993. Appl. Environ. Microb. 59, 2607-2613). Tras reemplazar la secuencia señal nativa por la secuencia preprolíder del factor  $\alpha$  con el fin de regular el tráfico de la proteína heteróloga, la proteína de fusión fue objeto de 8 ciclos de evolución de laboratorio en combinación con enfoques racionales. El último mutante de este proceso, constituye una valiosa herramienta para diseñar lacasas de alto potencial redox *ad hoc* para diferentes aplicaciones.

20 Por tanto, la presente invención proporciona una nueva lacasa con alto potencial redox, alta tasa de producción, alta actividad y alta termoestabilidad. La presente invención se refiere a la secuencia aminoacídica de dicha lacasa y a la secuencia nucleotídica que codifica para dicha lacasa.

25 Los autores de la presente invención han utilizado una combinación metodológica basada en la evolución y la mutagénesis dirigida y han confeccionado una lacasa que resuelve la necesidad de un biocatalizador con elevada actividad y termoestabilidad, y que además presenta una alta tasa de producción funcional (8 mg/L; 1400 U/L de fermentado).

30 La lacasa de la presente invención es altamente estable frente a la temperatura (valores de  $T_{50}=73^{\circ}\text{C}$ ), la presencia de cosolventes orgánicos y en un amplio intervalo de pH (estable en el intervalo 3 a 9). Dicha lacasa posee unos valores cinéticos del orden de 6 veces superiores a los descritos para lacasas equivalentes en el estado de la técnica, por lo que su diseño evolutivo ha permitido:

- i) incrementar 34000 veces los niveles de actividad total;
- ii) incrementar sus constantes catalíticas,
- 35 iii) mantener una elevada estabilidad frente a diversos factores (temperatura, pH, cosolventes).

Por tanto, las principales ventajas de la lacasa de la presente invención son:

- 40 i) presenta una alta tasa de producción,
- ii) presenta una elevada actividad y
- 45 iii) presenta una elevada termoestabilidad.

50 Un primer aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido (en adelante llamado polinucleótido de la invención) que codifica para el polipéptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 (en adelante llamado polipéptido de la invención). En una realización preferida, el polinucleótido de la invención tiene la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.

El término “polinucleótido”, tal y como se emplea en la descripción, se refiere a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos.

55 El término “codifica”, tal y como se emplea en la descripción, hace referencia a la correlación que existe entre los tripletes de nucleótidos o codones en una secuencia de ADN y los aminoácidos que forman los péptidos, las secuencias aminoacídicas o las proteínas. Cuando se dice que una secuencia nucleotídica codifica para un péptido, significa que cuando dicha secuencia nucleotídica sea transcrita a ARN mensajero (ARNm) y este ARNm sea traducido, se generará dicho péptido.

60 El término “péptido”, “polipéptido” o “proteína”, tal y como se emplea en la descripción, se refiere a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud.

65 Otro aspecto de la invención se refiere a una construcción genética (en adelante llamada construcción genética de la invención) que comprende:

- a. el polinucleótido de la invención, o

- b. el polinucleótido de la invención, que además comprende un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicho polinucleótido, y/o con otras secuencias nucleotídicas necesarias o apropiadas para la transcripción *in vitro* o *in vivo* y su regulación en tiempo y lugar.

5

Una construcción genética puede incluir los vectores de clonación y expresión génica que comprende el polinucleótido de la invención. Tales vectores de expresión génica incluyen secuencias de control, tales como, por ejemplo, elementos de control de la traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión). Los vectores conforme a la invención pueden incluir plásmidos bacterianos y vectores virales, y otros vectores de acuerdo con los procedimientos bien conocidos y documentados en el estado de la técnica, y pueden expresarse en una variedad de sistemas de expresión diferentes, asimismo bien conocidos y documentados. Se conoce, así mismo, una variedad de técnicas que pueden utilizarse para introducir tales vectores en células procarióticas o eucarióticas (células hospedadoras) para su expresión. Técnicas adecuadas de transformación o transfección están bien descritas en el estado de la técnica. Un “vector” es un replicón al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido. Un “replicón” es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleótida dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control. El término “secuencia de control” se refiere a secuencias de nucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificadoras a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal, y señales de terminación; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa. La expresión “unidos de forma operativa” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a una secuencia codificadora está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

En una realización preferida, la construcción genética de la invención además comprende un polinucleótido que codifica para un péptido señal mejorado por evolución dirigida que favorece la expresión funcional del polipéptido de la invención. Preferiblemente, el péptido señal es el del factor  $\alpha$ , de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 9. Más preferiblemente, el polinucleótido que codifica para el péptido señal es la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 10. Preferiblemente, la construcción genética de la invención comprende un polinucleótido que codifica para el polipéptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3. Más preferiblemente, la construcción genética de la invención comprende el polinucleótido de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4.

El término “péptido señal”, tal y como se emplea en la descripción, se refiere a un péptido que se localiza en el extremo amino de un polipéptido o proteína, y cuya función es dirigir la localización de la proteína a distintos compartimentos de la célula (núcleo, mitocondria, cloroplasto, retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi (AG), etc.) o al espacio extracelular, en el caso de que la proteína sea secretada.

El péptido señal del factor  $\alpha$  es un polipéptido de 83 aminoácidos. Los 19 primeros aminoácidos constituyen el preláder que dirige el polipéptido en creación hacia el RE. Tras entrar en el RE, el preláder es escindido por una peptidasa, dejando una pro-proteína. En este punto, las N-glicosilaciones de tres residuos de asparagina facilitan el tránsito de la pro-proteína del RE al AG. En el AG, el prolíder puede actuar como chaperona hasta que es procesado por las proteasas KEX1, KEX2 y STE13 (Romanos *et al.*, 1992. Yeast 8, 423-488; Shuster, 1991. Curr. Opin. Biotech. 2, 685-690). Además, el prolíder parece estar implicado en un proceso de señalado vacuolar, que es perjudicial para la secreción heteróloga (Rakestraw *et al.*, 2009. Biotechnol. Bioeng. 103, 1192-1201).

En una realización preferida de la construcción genética de la invención, entre la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal del factor  $\alpha$  SEQ ID NO: 9 y la secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 (ambos mejorados por evolución dirigida), se encuentra la secuencia nucleotídica que codifica para los aminoácidos ácido glutámico y fenilalanina. Más preferiblemente, la construcción genética de la invención comprende el polinucleótido que codifica para el polipéptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5. Más preferiblemente, la construcción genética de la invención comprende el polinucleótido de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 6.

Estos dos aminoácidos (ácido glutámico y fenilalanina) son consecuencia de la estrategia de clonaje empleada para fusionar la secuencia nucleotídica que codifica para el factor  $\alpha$  con la secuencia nucleotídica que codifica para la lacasa de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora (en adelante llamada célula de la invención) que comprende el polinucleótido de la invención o la construcción genética de la invención. Más preferiblemente, la célula de la invención es una levadura. Más preferiblemente, la célula de la invención pertenece al género *Saccharomyces*. Aún más preferiblemente, la célula de la invención pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*).

## ES 2 370 216 A1

El término “célula hospedadora”, tal y como se emplea en la descripción, se refiere a una célula que sirve como recipiente del polinucleótido de la invención o de la construcción genética de la invención. El término “célula hospedadora”, tal y como se emplea en la descripción, también puede referirse a una célula que expresa una proteína de interés (por ejemplo, la lacasa de la invención) donde la célula hospedadora es transformada con un vector de expresión que contiene el polinucleótido de la invención o la construcción genética de la invención, además de otras secuencias nucleotídicas de control.

La levadura de cerveza *S. cerevisiae* es un hongo unicelular que pertenece al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Saccharomycotina*, Clase *Saccharomycetes*, Orden *Saccharomycetales*, Familia *Saccharomycetaceae* y Género *Saccharomyces*.

Otro aspecto de la invención se refiere a una lacasa de alto potencial redox (en adelante llamada lacasa de la invención) que comprende el polipéptido de la invención. Preferiblemente, la lacasa de la invención además comprende los aminoácidos ácido glutámico y fenilalanina en el extremo amino del polipéptido, y su secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 7. Más preferiblemente, la lacasa de la invención además comprende los últimos cuatro aminoácidos del péptido señal del factor  $\alpha$  mejorado por evolución dirigida (ácido glutámico, treonina, ácido glutámico, alanina) en el extremo amino del polipéptido, y su secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 8.

La cola extra amino terminal de 2 aminoácidos no altera la termoestabilidad ni la actividad de la lacasa de la invención.

La presencia de los últimos cuatro aminoácidos del péptido señal del factor  $\alpha$  (ácido glutámico, treonina, ácido glutámico, alanina) se debe a la falta de procesado por parte de la proteasa STE13. Este es un fenómeno común en casos en los que una proteína alcanza niveles de hipersecreción, como sucede con la lacasa de la invención cuando es producida por la célula hospedadora de la invención. Es bien sabido que la cantidad de proteasa STE13 producida por la maquinaria de *S. cerevisiae* está ligada a la producción del factor  $\alpha$ , de ahí que cuando la lacasa fusionada al preprolíder del factor  $\alpha$  se hipersecreta, los niveles de la proteasa STE13 generados no son suficientes para procesar correctamente el extremo terminal del prolíder. La cola extra amino terminal de 6 aminoácidos (los últimos cuatro aminoácidos del péptido señal del factor  $\alpha$  y los dos aminoácidos producto de la estrategia de clonaje) no altera la termoestabilidad ni la actividad de la lacasa de la invención.

El término “amino terminal”, tal y como se emplea en la descripción, se refiere al extremo desde el que se crea el polipéptido o proteína durante la traducción del ARNm. Este extremo se denomina amino terminal porque el aminoácido que se sitúa en la posición inicial presenta el grupo amino libre.

El término “proteasa”, tal y como se emplea en la descripción, se refiere a una proteína con actividad enzimática o enzima capaz de cortar (digerir, lisar, proteolizar o procesar) un polipéptido o proteína en una región concreta de su secuencia aminoacídica. Una proteasa también puede llamarse peptidasa o hidrolasa, ya que rompe el enlace peptídico entre dos aminoácidos de una secuencia aminoacídica, polipéptido o proteína.

La expresión “falta de procesado”, tal y como se emplea en la descripción, se refiere a la ausencia de corte por parte de la proteasa. Se entiende por procesamiento de una enzima el fenómeno por el cual dicha enzima modifica su sustrato. En este caso, se entiende por procesamiento de la proteasa el corte del polipéptido al final de la secuencia aminoacídica del péptido señal del factor  $\alpha$ .

El término “hipersecreción”, tal y como se emplea en la descripción, se refiere a una secreción aumentada en gran medida. Esta secreción grandemente aumentada se debe a la presencia del péptido señal del factor  $\alpha$  con la secuencia aminoacídica mejorada SEQ ID NO: 9. La hipersecreción de la lacasa de la invención permite la alta tasa de producción de dicha lacasa.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de la lacasa de la invención, que comprende:

- a. cultivar la célula hospedadora de la invención, y
- b. purificar la lacasa.

El término “purificar”, tal y como se emplea en la descripción, se refiere a la separación de la lacasa de la invención y a su concentración, a partir del medio de cultivo de la célula de la invención. La separación de la lacasa puede llevarse a cabo mediante técnicas de solubilidad diferencial, cromatografía, electroforesis o isoelectroenfoque. Las técnicas de cromatografía pueden estar basadas en el peso molecular, la carga o la afinidad de la proteína y puede realizarse en columna, en papel o en placa. La separación de la proteína puede realizarse, por ejemplo, por cromatografía líquida rápida (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*), en un sistema automatizado que reduce notablemente el tiempo de purificación e incrementa el rendimiento de la purificación.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del polinucleótido de la invención o de las construcciones genéticas de la invención para la obtención de una lacasa de alto potencial redox.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula hospedadora de la invención para la obtención de una lacasa de alto potencial redox.

Otro aspecto de la invención se refiere a un cultivo de células hospedadoras de la invención.

Un cultivo de células hospedadoras se refiere al proceso de mantener y crecer las células hospedadoras. Los cultivos celulares necesitan condiciones controladas de temperatura, pH, porcentajes de gases como el dióxido de carbono y el oxígeno, así como la presencia de los nutrientes adecuados para permitir la viabilidad y la división celular. Los cultivos celulares pueden desarrollarse en sustratos sólidos como el agar, o en medio líquido, lo que permite cultivar grandes cantidades de células en suspensión.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del cultivo de células hospedadoras de la invención para la obtención de una lacasa de alto potencial redox.

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

### Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra la Ruta de Evolución Artificial de  $\alpha$ -PM1. Se empleó una combinación de estrategias evolutivas (mutagénesis aleatoria, barajado *in vivo* del ADN (del inglés “*in vivo DNA-shuffling*”), ensamblaje *in vivo* de librerías mutagénicas con diferente espectro mutacional (IvAM, del inglés “*in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra*”) y racionales (mutagénesis dirigida tanto para recuperar mutaciones beneficiosas como para el intercambio mutacional con HRPL evolucionadas) durante la evolución del gen de fusión  $\alpha$ -PM1. El punto de partida para las mutaciones incorporadas en el 7º ciclo por mutagénesis dirigida está indicado por las flechas punteadas. MAT: mejora en la actividad total frente al tipo parental de la generación anterior. MT: mejora en la termoestabilidad frente al tipo parental de la generación anterior.

Figura 2. Muestran los entrecruzamientos sugeridos durante la Evolución Dirigida de  $\alpha$ -PM1. El pre-líder del factor- $\alpha$  está representado en gris, el prolíder del factor- $\alpha$  en blanco y la PM1 madura en negro. Las nuevas mutaciones puntuales están señaladas en gris. Con doble asterisco está señalado el mutante 16B10, el mejor mutante de termoestabilidad de la 6ª generación.

Figura 3. Muestra el enfoque racional de la Termoestabilidad. (A) Detalle del modelo 3D de la lacasa mostrando la ubicación del Residuo 454 en las inmediaciones del sitio Cu T1 para el parental PM1 y el mutante 7H2. S454 establece dos puentes de hidrógeno con A458 y después de la mutación, forma un enlace adicional con A161. La esfera es el cobre T1. Termoestabilidad de HRPLs evolucionadas: (B)  $T_{50}$  de los mutantes de la 4ª, 5ª y 6ª generación. Círculos negros, mutante 1D11 (4ª G); triángulos blancos, mutante 11A2 (4ª G); triángulos negros, mutante 7H2 (5ª G); círculos blancos, mutante 6C8 (6ª G); cuadrados negros, mutante 16B10 (6ª G). (C)  $T_{50}$  de los mutantes construidos por mutagénesis dirigida usando el mutante 6C8 como molde. Triángulos negros, mutante P393H; cuadrados negros, mutante D281E; triángulos blancos invertidos, mutante S224G; círculos blancos, mutante revertido S454F.

Figura 4. Muestra la caracterización bioquímica del mutante OB-1. (A, B) Perfiles de pH actividad de las lacasas mutantes. Círculos blancos, mutante 5G3 (3ª G); círculos negros, mutante 1D11 (4ª G); triángulos negros, mutante S454F (7ª G); triángulos blancos, mutante OB-1 (8ª G). Las actividades se midieron en buffer Britton y Robinson 100 mM a diferentes pHs con 3 mM DMP (A) o ABTS (B) como sustratos. La actividad lacasa fue normalizada al valor de actividad óptimo y cada punto, incluyendo la desviación estándar, es la media de tres experimentos independientes. (C)  $T_{50}$  del mutante OB-1 y otras HRPLs relacionadas. Triángulos negros, lacasa de *Corioloopsis gallica*; círculos negros, lacasa de *Pleurotus ostreatus*; cuadrados negros, lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*; triángulos blancos invertidos, lacasa de *Trametes versicolor*; círculos blancos, lacasa de *Trametes hirsuta*; cuadrados blancos, mutante OB-1. (D) Estabilidad de OB-1 en presencia de concentraciones crecientes (v/v) de distintos disolventes orgánicos. Los experimentos se realizaron en viales con tapón de rosca conteniendo la variante OB-1 en una mezcla disolvente/buffer Britton y Robinson 100 mM (pH 6,0). Tras 4 h, se extrajeron alícuotas y se midió la actividad con ABTS 3 mM en buffer acetato sódico 100 mM (pH 4,0). Cuadrados negros, acetonitrilo; triángulos negros invertidos, etanol; cuadrados blancos, N,N'-dimetilformamida; círculos blancos, metanol; círculos negros, dimetilacetamida; triángulos blancos, dimetilsulfóxido. La actividad residual está expresada como el porcentaje de actividad original a la correspondiente concentración de disolvente orgánico. (E) Estabilidad frente al pH del mutante OB-1 a pH 3,0, 6,0 y 9,0. Las muestras de enzima fueron incubadas en buffer Britton y Robinson 10 mM a diferentes pHs, y la actividad residual se midió en ABTS 3 mM en buffer acetato sódico 100 mM (pH 4,0). Círculos negros, pH 3,0; cuadrados blancos, pH 6,0; triángulos negros, pH 9,0.

Figura 5. Muestra las mutaciones en la Lacasa Evolucionada. Muestra los detalles de las siete mutaciones presentes en la variante OB-1 (B, D, F) comparadas con los correspondientes residuos de la lacasa PM1 nativa (A, C, E). Las esferas representan átomos de Cu. Se muestran los ligandos del Cu T1 y del cluster trinuclear Cu T2/T3. Los puentes de hidrógeno relacionados con los residuos mutados (antes y después de la mutación) se muestran como líneas discontinuas.



Figura. 6. Muestra la estrategia de clonaje para la construcción de  $\alpha$ -PM1.

Figura. 7. Muestra la Ruta de Evolución Artificial de  $\alpha$ -PcL. La figura muestra las tres primeras generaciones de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*. MAP: mejora en la actividad total frente al tipo parental de la generación anterior. Esta figura está relacionada con la Figura 1.

Figura. 8. Muestra la caracterización del mutante OB-1. (A) espectro de masas del mutante OB-1. (B) Electroforesis del mutante OB-1 purificado. Los carriles contienen lo siguiente: 1: marcador de peso molecular, 2: filtrado del cultivo, 3: precipitación fraccionada con sulfato de amonio, 4: intercambio aniónico, 5: intercambio aniónico de alta resolución. (C) N-deglicosilación de OB-1. Los carriles contienen lo siguiente: 1: OB-1, 2: OB-1 deglicosilado, 3: marcador de peso molecular. La enzima purificada fue deglicosilada usando la N-glicosidasa PNGasaF. Las muestras se analizaron en un gel de SDS y acrilamida al 12% y se tiñeron con azul de Coomassie. Esta figura está relacionada con la Figura 4.

Figura. 9. Muestra la estructura general de la Lacasa Evolucionada OB-1. Están representados los tres dominios de tipo cobre (D1, D2 y D3), los átomos de cobre como esferas grises y las sustituciones de aminoácidos, en negro. También se muestran las distancias de los residuos mutados al cobre T1 (representadas como líneas discontinuas) y la superficie de la proteína. Esta figura está relacionada con la Figura 5.

Figura 10. Muestra el alineamiento parcial de la secuencia aminoacídica de PM1 y de otras lacasas de alto potencial redox muy relacionadas. La numeración incluye las secuencias señal. El alineamiento de las secuencias se realizó con el algoritmo cobalto en el servidor NCBI-Blast. PM1, lacasa del basidiomiceto PM1 (CAA78144.1) (SEQ ID NO: 34); T. C30, lacasa de *Trametes* sp. C30 Lacc1 (AAF06967.1) (SEQ ID NO: 35); *T. trogii*, lacasa de *Trametes trogii* (2HRG-A (SEQ ID NO: 36)); *C. gallica*, lacasa de *Corioloopsis gallica* (ABD93940.1) (SEQ ID NO: 37); *C. rigida*, lacasa de *Corioloopsis rigida* (ACU29545.1) (SEQ ID NO: 38); T. sp AH28-2, lacasa A de *Trametes* sp. AH28-2 (AAW28933.1) (SEQ ID NO: 39); *T. versicolor*, lacasa III de *Trametes versicolor* (AAL93622.1) (SEQ ID NO: 40); *T. pubescens*, lacasa 2 de *Trametes pubescens* (AAM18407.1) (SEQ ID NO: 41); *T. hirsuta*, lacasa de *Trametes hirsuta* (ACC43989.1) (SEQ ID NO: 42); T. I-62, lacasa de *Trametes* sp. I-62 (AAQ 12269.1) (SEQ ID NO: 43); *P. coccineus*, lacasa de *Pycnoporus coccineus* (BAB69775.1) (SEQ ID NO: 44); *P. sanguineus*, lacasa de *Pycnoporus sanguineus* (ACN69056.1) (SEQ ID NO: 45); *P. cinnabarinus*, lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* (AAF13052.1) (SEQ ID NO: 46); *L. tigrinus*, lacasa de *Lentinus tigrinus* (2QT6-A) (SEQ ID NO: 47).

### Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

#### Ejemplo 1

##### Punto de partida para la evolución: la construcción de $\alpha$ -PM1

Nuestro punto de partida fue la lacasa de alto potencial redox del basidiomiceto PM1. Además de su elevado potencial redox (por encima de +700 mV), la lacasa PM1 es altamente estable en el intervalo de pH de 3 a 9 y a elevada temperatura (con una actividad óptima a 80°C) (Coll *et al.*, 1993. Appl. Environ. Microb. 59, 2607-2613, Coll *et al.*, 1993, Appl. Environ. Microb. 59, 4129-4135). Estas características la convierten en altamente deseable no sólo para uso práctico sino también para llevar a cabo experimentos de evolución dirigida. Teniendo en mente que la acumulación de mutaciones beneficiosas durante varios ciclos de evolución de laboratorio generalmente conduce a la desestabilización del molde proteico, cuanto mejor sea la estabilidad de la enzima de partida, mayor es la probabilidad de alcanzar las mejoras perseguidas sin poner en peligro la función proteica (Bloom y Arnold, 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 9.995-10.000). En primer lugar, el ADN copia de la lacasa PM1 con la secuencia señal nativa fue clonado en el correspondiente vector lanzadera, aunque no se detectaron niveles de expresión funcional en *S. cerevisiae*. Para aumentar los niveles de expresión a valores que pudieran detectarse en los ensayos de *screening*, la secuencia señal nativa de la lacasa PM1 fue reemplazada por diferentes péptidos señales comúnmente empleados para expresar proteínas heterólogas en levadura. El mejor resultado se consiguió con la construcción  $\alpha$ -PM1 (Figura 6) constituida por el preprolídido de la feromona del factor  $\alpha$  (Shuster, 1991. Curr. Opin. Biotech. 2, 685-690) acoplada a la PM1 madura, lo cual generó niveles de expresión muy bajos pero detectables (~35 mU/L). Los coeficientes de varianza (CV) para los ensayos de *screening* se ajustaron durante el proceso de evolución (alcanzando CVs por debajo del 11% a partir del tercer ciclo en adelante) y las condiciones de microfermentación fueron optimizadas (asimilación de cobre, composición del medio, disponibilidad de oxígeno y temperatura).

#### 1.1. Reactivos y enzimas

El vector pUEX1 con el cDNA de la PM1 nativa fue cedido por el Prof. R. Santamaría (Universidad de Salamanca). La lacasa de *Trametes versicolor*, las lacasas de *Pycnoporus cinnabarinus* y *Trametes hirsuta*, y las lacasas de *Corioloopsis gallica* y *Pleurotus ostreatus*, fueron donadas por Novozymes (Davis, CA, USA), Prof. E. Record (Universidad de Marsella, Francia), Prof. A. Yaropolov (Instituto de Bioquímica, Moscú, Rusia) y Prof. R. Vázquez-

## ES 2 370 216 A1

Duhalt (UNAM, Cuernavaca, México), respectivamente. El ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), el DMP (2,6-dimetoxifenol), la Taq polimerasa y el kit de transformación en *S. cerevisiae* fueron comprados a Sigma-Aldrich. Las células competentes de *E. coli* XL2-Blue y los kits Genemorph I y II Random mutagénesis son de Stratagene. La cepa BJ5465 de *S. cerevisiae* deficiente en proteasas es de LGCPromochem. El vector lanzadera pJR0C30 con el gen de resistencia a ampicilina y el de auxotrofia para uracilo procede del Instituto de Tecnología de California (Caltech, CA, USA), mientras que el vector pGAPZ $\alpha$ , que contiene el prepro-líder del factor  $\alpha$ , es de Invitrogen, USA. Los kits *Zymoprep yeast plasmid miniprep*, *Zymodean gel DNA recovery*, y *DNA clean & concentrator TM-5* se compraron a Zymo Research. El kit *NucleoSpin Plasmid* se compró a Macherey-Nagel y las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* a New England Biolabs. Todos los reactivos usados fueron los de mayor pureza disponible.

### 1.2. Construcción de la $\alpha$ -PM1

El ADN copia de la PM1 incluyendo la señal líder nativa fue clonado en el vector lanzadera pJR0C30 en *S. cerevisiae*. El vector pUEX1 con el ADN copia de la PM1 se usó como molde para amplificar la PM1 incluyendo los 21 aminoácidos del péptido señal. Los cebadores utilizados para la amplificación fueron: (SEQ ID NO: 11) F3PM1: 5'CTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAACTATA ART-3' y (SEQ ID NO: 12) R3PM1: 5'GACATAACTAAT TACATGATGCGGCC TCTAGATGCATGCTCGAGCtactggtcgtcaggcgagc3', donde las letras mayúsculas indican los fragmentos que anillan específicamente *in vivo* en las células de *S. cerevisiae* con el vector pJR0C30 linearizado con *BamHI* y *XhoI*. La correspondiente construcción pJR0C30-PM1 no dio lugar a niveles de expresión funcional en *S. cerevisiae*. En consecuencia, la secuencia señal nativa de la PM1 fue sustituida por las señales líder de MtLT2 (Bulter *et al.*, 2003. Appl. Environ. Microb. 69, 987-995), la de la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (Frederick *et al.*, 1990. J. Biol. Chem. 265, 3793-3802) y el preprolíder del factor  $\alpha$  (Brake *et al.*, 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4642-4646), siendo el último el único que dio lugar a niveles detectables de secreción de la PM1 en *S. cerevisiae* (inferior a 35 mU/L). La construcción  $\alpha$ -PM1 se obtuvo por amplificación del gen de la PM1 nativa excluyendo la señal líder usando los cebadores (SEQ ID NO: 13) PM1Eco-F (5'-gcGAATTCagcattggccagtc-3') y (SEQ ID NO: 14) PM1-R (5'-atGCGGCCGCTtactggtcgtcaggcgagc-3), que incluyen las dianas para *EcoRI* y *NotI* (en letras mayúsculas) así como el codón de parada óptimo (en negrita y subrayado) para *Pichia Pastoris*. El vector pGAPZ $\alpha$  con el preprolíder del factor  $\alpha$  fue linearizado con *EcoRI* y *NotI*, y el fragmento amplificado correspondiente fue digerido con *EcoRI* y *NotI* y clonado en el pGAPZ $\alpha$  linearizado, dando lugar a la construcción pGAPZ $\alpha$ -PM1. La construcción pGAPZ $\alpha$ -PM1 se utilizó para amplificar el gen de fusión  $\alpha$ -PM1 por medio de los siguientes cebadores: (SEQ ID NO: 15)  $\alpha$ -F (5'-ATAGGATCCatgagatttcctcaattttactgctgtt-3') que incluye la diana de *BamHI* (en letras mayúsculas) y (SEQ ID NO: 16) PM1-R (5'-tcaatgctccgcttcgagga-3'). El fragmento obtenido se digirió con *NotI*. El vector episómico pJR0C30 fue digerido con *BamHI* y amplificado con *Klenow* para el clonaje con extremos romos. Finalmente, el plásmido fue digerido con *NotI*, desfosforilado y ligado con  $\alpha$ PM1 para generar el pJR0C30- $\alpha$ PM1.

### Ejemplo 2

#### 40 Evolución de laboratorio de $\alpha$ -PM1

La estrategia de evolución dirigida fue elaborada siguiendo las siguientes reglas: i) para ajustar adecuadamente los requisitos de la ruta secretora del hospedador durante la expresión funcional de la lacasa, el gen de fusión completo fue objeto de mutagénesis aleatoria y/o recombinación. Por lo tanto, se evolucionó conjuntamente tanto el preprolíder del factor  $\alpha$  como el gen de la lacasa foránea con el fin de adaptar ambos elementos para una exportación exitosa por *S. cerevisiae*; ii) para asegurar que la mejora de actividad no fuera dependiente de un sustrato en concreto, se validaron y emplearon durante la evolución molecular ensayos de *screening* basados en la oxidación de compuestos fenólicos (2,6 DMP) y no fenólicos (ABTS); iii) para garantizar la termoestabilidad general del mutante final, las pérdidas en estabilidad producidas por la acumulación de mutaciones durante la evolución fueron detectadas y recuperadas mediante enfoques racionales acoplados con el *screening* de termoestabilidad de librería de mutantes; y iv) las mutaciones que representaron mejoras significativas durante los primeros ciclos de evolución *in vitro*, pero que no fueron finalmente seleccionadas tras las recombinaciones y el *screening*, fueron recuperadas individualmente, analizadas e introducidas en las últimas variantes mediante mutagénesis dirigida.

La generación de diversidad fue emulada aprovechando la maquinaria celular eucariota de *S. cerevisiae*. Los altos niveles de recombinación homóloga que ofrece *S. cerevisiae* permiten reparar *in vivo* los productos mutagenizados con el vector linearizado a través de la ingeniería de extremos solapantes diseñados al efecto sin alterar la clase de lectura. Las librerías mutagénicas fueron recombinadas mediante barajado *in vivo* del ADN (del inglés "*in vivo DNA shuffling*" y/o mediante ensamblaje *in vivo* de librerías mutagénicas con diferente espectro mutacional (IvAM, del inglés "*in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra*") (Okkels, 2004. Enzyme functionality: design, engineering, and screening, A. Svendsen, ed. (New York: Marcel Dekker, Inc.). 413-424; Zumárraga *et al.*, 2008. Proteins 71, 250-260). Para aumentar el número de entrecruzamientos entre los insertos sin comprometer la eficiencia de transformación, se chequearon varias regiones solapantes con baja homología respecto al vector linearizado. Las tasas mutacionales se ajustaron de forma que aproximadamente 1-3 aminoácidos por proteína de fusión fueran introducidos, de media, por cada ciclo de evolución (Tracewell y Arnold, 2009. Curr. Opin. Chem. Biol. 13, 3-9).

## ES 2 370 216 A1

Más de 50.000 clones fueron explorados en 8 ciclos de evolución dirigida y mutagénesis dirigida, culminando en la selección de la última variante, el mutante OB-1, con una mejora total sobre  $\alpha$ -PM1 de 34.000 veces (Figura 1). Con independencia de la enzima y la característica sometida a evolución dirigida, es raro alcanzar unas mejoras tan elevadas. Parece lógico pensar que la evolución conjunta del preprolídido del factor  $\alpha$  junto con la PM1 madura para su secreción en levadura, haya favorecido un efecto sinérgico entre ambos polipéptidos, lo cual eventualmente se traduce en una mejora en la exportación de  $\alpha$ -PM1 por el hospedador eucariota. Durante la ruta de evolución artificial (Figura 1), se caracterizaron y fueron recombinados 26 mutantes con mejoras entre 1,3 a 12 veces respecto del mejor tipo parental correspondiente en cada ciclo. En términos generales, hasta 28 posiciones diferentes fueron mutadas (9 de ellas mutaciones sinónimas) a lo largo del gen de fusión  $\alpha$ -PM1 (Tabla 1). De éstas, 9 mutaciones se encontraron en el preprolídido del factor  $\alpha$  y las restantes 19 en el gen de la lacasa.

Los dos primeros ciclos de evolución se llevaron a cabo mediante PCR propensa a error con diferentes tasas mutacionales y con ADN polimerasas con distinto perfil mutacional (Figura 1, Tabla 1). Para acelerar aún más la evolución, a partir del segundo ciclo en adelante se empleó un protocolo que combinó la construcción de librerías mutantes a partir de cada parental mediante barajado *in vivo* del ADN. Esta estrategia produjo entrecruzamientos complejos para cada descendencia junto con la introducción de nuevas mutaciones puntuales (Figura 2). La mejor variante del quinto ciclo, el mutante 7H2, tuvo aprox. 24.300 veces mejor actividad que  $\alpha$ -PM1, con una actividad total de 1.000 U/L. La caracterización preliminar de 7H2 demostró una fuerte reducción en su termoestabilidad con un descenso en su  $T_{50}$  de aprox. 5°C con respecto a sus correspondientes parentales, los mutantes 1D11 y 11A2 (de 73°C a 68°C, Figura 3B), lo cual estuvo relacionado con la significativa caída de actividad durante su almacenamiento en largos períodos (perdiendo aproximadamente el 30% de su actividad tras 14 días a 4°C). La acumulación de mutaciones beneficiosas pero desestabilizantes durante la evolución es un fenómeno bien descrito (Bloom *et al.*, 2006. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 5869-5874; Bloom y Arnold, 2009. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 9995-10000; García *et al.*, 2010. Microb. Cell Fact. 9, 17).

Para superar este problema y recuperar la estabilidad al tiempo que permitiera tolerar la introducción de un nuevo set de mutaciones beneficiosas, se incorporó en el sexto ciclo un *screening* de termoestabilidad basado en la determinación de la  $T_{50}$  (definida como la temperatura a la que la enzima retiene el 50% de su actividad tras 10 min de incubación) (García *et al.*, 2010. Microb. Cell Fact. 9, 17; Bommarium *et al.*, 2006. Curr. Opin. Biotech. 17, 606-610). Para esta ocasión, la librería se construyó mediante IvAM, mezclando diferentes perfiles y predisposiciones mutacionales. La mejor variante de termoestabilidad, 16B10, recuperó parte de su termoestabilidad con una mejora en su  $T_{50}$  de 3°C (Figura 3B), pero a expensas de su actividad, la cual se redujo a la mitad (de 1.000 a 510 U/L) (Figura 1, Tabla 1). Por otro lado, la mejor variante de actividad de este ciclo, el mutante 6C8, todavía mejoró su actividad total hasta valores de 2.000 U/L mientras que retuvo una estabilidad similar a 7H2.

En este punto, estuvimos en la encrucijada de o bien continuar evolucionando para termoestabilidad a partir de 16B10 pero poniendo en peligro la actividad, o emplear el mutante 6C8 como parental e intentar resolver el problema de estabilidad “racionalmente”.

Más que enfrentarnos con el bien conocido “trueque” que normalmente surge entre la actividad y la estabilidad para muchas mutaciones puntuales (Romero y Arnold, 2009. Nat. Rev. Mol. Cell Bio. 10, 866-876), decidimos volver a analizar el inestable mutante 7H2. Este mutante procede de un evento de entrecruzamiento entre 1D11 y 11A2, lo cual permitió unir las mutaciones V( $\alpha$ 10)D, A( $\alpha$ 87)T y V162A del mutante 11A2 con las mutaciones H208Y, A239P, S426N y A461T del mutante 1D11 (Figura 2, Tabla 1).

TABLA 1: Mutaciones introducidas en la evolución dirigida de  $\alpha$ -PM1. +, mutación acumulada; ●, nueva mutación. En sombreado se detallan las mutaciones sinónimas; con subíndices se indican el uso de codones en *S. cerevisiae*. \*El mutante OB-1 incorporó las dos mutaciones recuperadas S224G y D281 más la mutación revertida S454F introducidas mediante mutagénesis dirigida en los ciclos de evolución 7° y 8°.

Además, 7H2 incorporó una mutación sinónima más la mutación F454S, generada por mutagénesis en combinación con barajado *in vivo* del ADN. Decidimos mapear esta mutación en un modelo 3D basado en la estructura cristalográfica de la lacasa de *Trametes trogii* (con un 97% de identidad de secuencia con la PM1). La Phe454 está localizada en una  $\alpha$  hélice cercana al cobre del sitio T1, el lugar donde se une el sustrato reductor. De hecho, la Phe454 se sitúa al lado de uno de los ligandos de coordinación del cobre T1, la His455 que parece estar involucrada en la unión del sustrato reductor facilitando la entrada de electrones al cobre T1 (Bertrand *et al.*, 2002. Biochemistry 41, 7325-7333; Matera *et al.*, 2008. Inorg. Chim. Acta 361, 4129-4137). La inspección del modelo sugiere que la mutación F454S permite un puente de H adicional con la Alai61 (Figura 3A).

ES 2 370 216 A1

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Generación		1G			2G			3G					4G			5G		6G		8G			
Amino ácido	Mutación	PMJ-60	PMJ-30C	PMJ-1A2	3E1	10D2	2G5	4C2	5G3	7D2	9H4	4E12	4B8	8G8	11B3	1D11	11A2	7F2	7H2	6C8	16B10	OB-1*	
	Codón																						
V(α10)D	GTT(29)GAT				•																+	+	+
N(α23)K	AAC(69)AAA																				•		+
I(α33)T	ATT(98)ACT																					•	
L(α53)L	<sup>27</sup> TTG(157)CTG <sub>10</sub>																						
G(α62)G	<sup>4</sup> GGG(186)GG <sub>11</sub>																						+
L(α63)S	TTA(188)TCA					•																	
E(α83)G	GAG(248)GGG													•									
A(α87)T	GCT(259)ACT				•																		+
E(α90)E	<sup>45</sup> GAA(270)GAG <sub>19</sub>																						+
Q70Q	<sup>27</sup> CAA(483)CAG <sub>12</sub>				•																		+
V162A	GTC(738)GCC																						+
A167A	<sup>6</sup> GCG(774)GCT <sub>11</sub>				•																		+
N181D	AAC(814)GAC																						+
A185A	<sup>25</sup> GCT(828)GCC <sub>13</sub>																					•	
H208Y	CAC(895)TAC																						+
S224G	AGC(943)GGC		•																				+
A239P	GCT(988)CCT		•																				+
D281E	GAC(1116)GAA			•																			+
V286L	GTT(1129)CTT				•																		
A361T	GCG(1354)ACG																					•	
P395P	<sup>7</sup> CCC(1458)CCT <sub>13</sub>																					•	
S426N	AGC(1550)AAC																						+

Parece posible que este nuevo puente de H provoque el movimiento del segmento helicoidal donde se encuentra la His455, amplificando la distancia entre el ligando de coordinación y el cobre T1. Este efecto incrementaría las velocidades catalíticas, pero disminuiría dramáticamente la estabilidad de la variante. Por lo tanto, se decidió revertir la mutación F454S en el mutante 6C8 mediante mutagénesis dirigida. El mutante revertido generado (mutante S454F) recuperó completamente su estabilidad con una  $T_{50}$  idéntica a la de los parentales del 4º ciclo y anteriores (Figura 3C). Notoriamente, mientras el mutante revertido fue 0,5 veces más débil catalíticamente (900 U/L) mostró unos valores de actividad similares a los descritos para 7H2 pero siendo de nuevo altamente termoestable. El efecto sinérgico de recombinar 1D11 y 11A2, junto con la nueva mutación beneficiosa que apareció en 6C8 (N[ $\alpha$ 23]K) sirvió para superar la pérdida de la mutación F454, que resultó ser beneficiosa pero altamente desestabilizante, en términos de mejora de actividad total.

### 2.1. Recuperación de mutaciones beneficiosas

Durante el diseño de la lacasa de alto potencial redox en *S. cerevisiae*, algunas de las mutaciones descubiertas en las fases iniciales de la evolución que afectaron la actividad fueron finalmente descartadas por el aparato de recombinación homóloga de *S. cerevisiae*, a pesar de sus potenciales efectos beneficiosos. En el hospedador eucariota, la probabilidad de que un evento de entrecruzamiento suceda entre dos mutaciones es directamente proporcional al número de nucleótidos que separa ambas mutaciones. Así, no es sorprendente que algunas mutaciones beneficiosas no fueran finalmente incorporadas en un molde que ya contenía la mutación A239P, tales como las mutaciones S224G o D281G (Figura 2). Pensamos que sería interesante rescatar estas mutaciones y probarlas individualmente en la variante 6C8. La mutación S224G fue la única mutación presente en el mutante PM1-30C (de la primera generación) produciendo una mejora de 7 veces en la actividad (Figura 1). Esta variante fue de nuevo empleada como parental en el tercer ciclo para ejercer un efecto de *backcrossing* y así, S224G se incorporó a la descendencia. Desafortunadamente, debido al ya mencionado entrecruzamiento entre 1D11 y 11A2 en el quinto ciclo, la mutación S224G finalmente se perdió. Asimismo, la mutación D281E apareció de forma independiente en diferentes momentos de la evolución (en los mutantes PM1-1A2 y 2G5 de la primera y segunda generación) con unas mejoras de aprox. 4 veces. De nuevo, la recombinación entre 1D11 y 11A2 eliminó la mutación D281E del gen de la lacasa. Ambas mutaciones fueron estudiadas individualmente mediante mutagénesis dirigida en el séptimo ciclo y en ambos casos, la actividad total aumentó sin comprometer la termoestabilidad (Figuras 1, 3C). Así pues, las mutaciones S224G y D281E se incorporaron conjuntamente al mutante revertido en el último ciclo para dar lugar al mutante OB-1.

### 2.2. Intercambio mutacional con una lacasa de alto potencial redox evolucionada

En un esfuerzo paralelo, también hemos estado involucrados en la evolución dirigida de otra lacasa de alto potencial redox procedente del hongo *Pycnoporus cinnabarinus* (Camarero *et al.*, 2009. Patent PCT/ES2009/070516), la cual comparte el 77% de identidad de secuencia con la lacasa PM1. Emulando el mismo enfoque que hemos seguido con la lacasa PM1, la secuencia señal nativa de la lacasa de *P. cinnabarinus* se reemplazó por el preprolíder del factor  $\alpha$ , y la correspondiente proteína de fusión fue objeto de varios ciclos de mutagénesis aleatoria y recombinación (Figura 7). Una de las mejores mutaciones encontradas durante la evolución de la lacasa de *P. cinnabarinus* (P394H) se encuentra en la vecindad del cobre T1. La sustitución de una Pro por una His en la posición 394 promueve un nuevo puente de H con la Asn208 que está próxima a la His295, uno de los ligandos del cobre T1 (Camarero *et al.*, 2009. Patent PCT/ES2009/070516). El alineado de secuencias de la lacasa PM1 con la lacasa de *P. cinnabarinus* indica que la P394 pertenece a una región altamente conservada entre las lacasas de alto potencial redox (Figura 10). Por lo tanto, la mutación P394H (P393H empleando la numeración de la PM1) fue introducida en 6C8 durante el séptimo ciclo con mejoras en la actividad de hasta 3.000 U/L pero con una pérdida significativa de termoestabilidad (la  $T_{50}$  bajo 2°C, Figura 3C).

Realmente desconocemos si la pérdida de termoestabilidad tras la mutación fue un efecto lateral común en ambas lacasas o si únicamente aconteció en el mutante 6C8. De hecho, no se pudo realizar un análisis de termoestabilidad en la lacasa de *P. cinnabarinus* ya que la P394H fue introducida en el primer ciclo, cuando los niveles de expresión eran virtualmente indetectables (Figura 7). Teniendo en cuenta que nuestro principal objetivo era el diseñar una HRPL altamente activa y estable, y a pesar de la mejora en actividad, la mutación P393H no fue finalmente incorporada en el último mutante, la variante OB-1.

### 2.3. Evolución dirigida del preprolíder del factor $\alpha$

La secuencia señal preprolíder del factor  $\alpha$  codifica un polipéptido de 83 aminoácidos del cual los 19 primeros residuos constituyen el prelíder que dirige el polipéptido en creación hacia el retículo endoplasmático (RE). Tras entrar en el RE, el prelíder es escindido por una peptidasa dejando una pro-proteína. En este punto, las N-glicosilaciones de tres residuos de asparagina facilitan el tránsito de la pro-proteína del RE al aparato de Golgi. En el Golgi, el preprolíder puede actuar como chaperona hasta que es procesado por las proteasas *KEX1*, *KEX2* y *STE13* (Romanos *et al.*, 1992. Yeast 8, 423-488; Shuster, 1991. Curr. Opin. Biotech. 2, 685-690). Además, el preprolíder parece estar implicado en un proceso de señalado vacuolar, que es perjudicial para la secreción heteróloga (Rakestraw *et al.*, 2009. Biotechnol. Bioeng. 103, 1192-1201). Hasta 8 mutaciones, (3 sinónimas) fueron introducidas en el preprolíder del factor  $\alpha$  durante la evolución de la  $\alpha$ -PM1 aunque únicamente las mutaciones V[ $\alpha$ 10]D, N[ $\alpha$ 23]K, A[ $\alpha$ 87]T y la mutación sinónima

## ES 2 370 216 A1

G[α62]G se conservaron en la última variante mutante OB-1. V[α10]D se localiza en el dominio hidrofóbico del prelíder e interesantemente, una de las mejores mutaciones encontradas durante la evolución de la lacasa de *P. cinnabarinus* fusionada con el preprolíder del factor α fue también descubierta en este dominio (mutación A[α9]D, Figura 7). Se ha descrito que las mutaciones en la pre-región pueden afectar el señalado en el RE y la secreción (Romanos *et al.*, 1992. *Yeast* 8, 423-488). El papel de estas dos mutaciones consecutivas en el tráfico de lacasa fue testado mediante la construcción de mutantes individuales, dobles y revertidos a partir del mutante 6C8 durante el séptimo ciclo de evolución (Tabla 2).

TABLA 2

*Mejoras de actividad para los mutantes en las posiciones 9 y 10 del prelíder del factor α. Los mutantes fueron contruidos empleando el mutante 6C8 como tipo parental*

	A(α9)D	V(α10)D	A(α9)D V(α10)D	D(α9)A D(α10)V
<b>Mejora de actividad total (en veces)</b>	2,2	2,2	0,5	0,1

Los datos experimentales indican que las mutaciones individuales, A[α9]D y V[α10]D, ejercen una clara mejoría en la secreción aunque no cuando son combinadas: la hidrofobicidad de este dominio es entonces disminuida drásticamente.

Es bien sabido que la mayoría de las alteraciones que reducen la eficiencia de translocación están relacionadas con el descenso general en la hidrofobicidad de este dominio (Romanos *et al.*, 1992. *Yeast* 8, 423-488). Suponemos que los cambios individuales en los residuos carboxílicos cargados en las posiciones 9 o 10 del preprolíder del factor α podrían afectar positivamente la interacción entre el péptido señal y la partícula de reconocimiento de señal involucrada en orientar e insertar la cadena polipeptídica de la lacasa en la bicapa de la membrana del RE (Nothwehr y Gordon, 1990. *BioEssays* 12, 479-484; Boyd y Beckwith, 1990. *Cell* 62, 1031-1033). La mutación N[α23]K aparece en el primer de los tres sitios de Asn-glicosilación del prolíder (Romanos *et al.*, 1992). Aunque no es absolutamente necesario para la secreción, tales glicosilaciones podrían facilitar el transporte del RE al Golgi (Rakestraw *et al.*, 2009. *Biotechnol. Bioeng.* 103, 1192-1201). Sin embargo, nuestros resultados no apoyan esta hipótesis ya que tras la eliminación del sitio de glicosilación en el sexto ciclo de evolución (generando el mutante 6C8) se mejoró la secreción.

Finalmente, la mutación A[α87]T se encontró en el sitio de procesado para *STE13*, una dipeptidil aminopeptidasa que elimina los residuos espaciadores (Glu/Asp-Ala)<sub>2</sub> en el amino terminal entre el prolíder del factor α y la lacasa PM1 madura. Tras la mutación, los residuos espaciadores proporcionan un ambiente incluso más hidrofílico a la diana del sitio de restricción para la *KEX2* (Lys-Arg), lo cual podría afectar a la secreción de la lacasa madura (Brake, 1990. *Meth Enzymol* 185, 408-421).

### 2.4. Evolución Dirigida: Aspectos Generales

En cada generación, los fragmentos de PCR se lavaron, concentraron y cargaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, tras lo cual se purificaron usando el kit Zymoclean gel DNA recovery (Zymo Research). Los productos de PCR se clonaron bajo el control del promotor Gal 1 del vector de expresión pJRoC30, reemplazando el gen nativo presente en el mismo. Para eliminar el gen nativo, el plásmido pJRoC30 fue linearizado con *XhoI* y *BamHI* y el plásmido lineal fue concentrado y purificado del mismo modo que se describió arriba para los fragmentos de PCR.

### 2.5. Primera Generación

Se prepararon tres librerías independientes con distintas ADN polimerasas y bajo diferentes tasas mutacionales. La primera librería mutagénica (~15.000 mutantes) se construyó con el kit Genemorph I ajustando la tasa mutacional a 1,1-3,5 mutaciones por kb. La segunda y la tercera librería (~15.000 mutantes cada una) fueron construidas con el kit Genemorph II ajustando la tasa mutacional a 0-4,5 y 4,5-9 mutaciones por kb, respectivamente. La PCR propensa a error se llevó a cabo en un termociclador de gradiente (Mycycler, BioRad, USA) usando los siguientes parámetros: 95°C durante 2 min (1 ciclo); 94°C durante 0,45 min, 53°C durante 0,45 min, 74°C durante 3 min (28 ciclos); y 74°C durante 10 min (1 ciclo). Los cebadores usados para la amplificación fueron: RMLN directo (SEQ ID NO: 17) (5'-CCTCTATACTTTAACGTC AAGG-3', que se une a las pb 160-180 del pJRoC30-αPM1) y RMLC inverso (SEQ ID NO: 18) (5'-GGGAGGGCGTGAATGTAAGC-3', que se une a las pb 2028-2048 del pJRoC30-αPM1). Para promover

## ES 2 370 216 A1

la ligación *in vivo*, se diseñaron fragmentos de 40 y 66 pb homologas al vector lineal. Los productos de PCR (400 ng) se mezclaron con el vector linealizado (100 ng) y se transformaron en células competentes usando el kit de transformación en levadura de Sigma. Las células transformantes se sembraron en placas SC y se incubaron durante 3 días a 30°C. Las colonias con el vector completo de replicación autónoma se picaron y se sometieron a ensayos de *screening*, así como a re-*screenings* adicionales. Del primer al quinto ciclo de evolución las librerías se exploraron de cara a encontrar mejoras en de actividad, y a partir del sexto ciclo, se incorporó un ensayo de termoestabilidad.

### 2.6. Segunda Generación

La segunda generación se realizó por PCR mutagénica con la ADN polimerasa Mutazyme I y usando el mutante PM1-60 como parental. La tasa mutacional se ajustó a 2,1-3,5 mutaciones por kb y la librería mutagénica (~1.000 mutantes) se preparó como se describió para la primera generación.

### 2.7. Tercera Generación

Las mejores variantes de la segunda generación (3E1, 10D2, 2G5 y 4C2) se sometieron a amplificación con Taq/MnCl<sub>2</sub> y recombinación por barajado *in vivo* del ADN (~1.000 clones). El mutante PM1-30C de la primera generación también fue incluido como parental para *backcrossing*. Las amplificaciones Taq/MnCl<sub>2</sub> se prepararon en un volumen final de 50 µL conteniendo 90 nM RMLN, 90 nM RMLC, 0,1 ng/µL template, 0,3 mM dNTPs (0,075 mM de cada uno), 3% DMSO, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 U/µL Taq polimerasa. Se probaron diferentes concentraciones de MnCl<sub>2</sub> para estimar la tasa mutacional adecuada, obteniendo 0,01 mM como la concentración final, y la PCR se realizó igual que en las generaciones anteriores. Se diseñaron varias áreas de solapamiento, con un tamaño variable desde 5 a 70 pb, para aumentar el número de entrecruzamientos sin comprometer la eficiencia de la transformación. Los productos de PCR se mezclaron en cantidades equimolares y se transformaron junto con el vector linealizado en la levadura (ratio productos PCR:vector, 4:1).

### 2.8. Cuarta Generación

Las mejores variantes de la tercera generación (5G3, 7D2, 9H4, 4E12, 4B8, 8G8 y 11B3) se sometieron a amplificación con Taq/MnCl<sub>2</sub> y recombinación por barajado *in vivo* del ADN (~1.000 clones) como se describió para la tercera generación.

### 2.9. Quinta Generación

Las mejores variantes de la cuarta generación (1D11, 11A2, y 7F2) se sometieron a amplificación con Taq/MnCl<sub>2</sub> y recombinación por barajado *in vivo* del ADN (~1.000 clones) como se describió para la tercera generación.

### 2.10. Sexta Generación

Se construyó una librería de ~1.300 clones por ensamblaje de librerías mutantes IvAM (Zumárraga *et al.*, 2008. Proteins 71, 250-260). El mutante 7H2 se utilizó como parental, y las librerías Taq/MnCl<sub>2</sub> y Mutazima se mezclaron en cantidades equimolares, y se transformaron en células de *S. cerevisiae* competentes junto con el vector linealizado tal y como se describió arriba (ratio librería:vector, 8:1). A partir de esta generación se incorporó un *screening* de termoestabilidad (véase más adelante).

### 2.11. Mutagénesis Dirigida

La séptima y octava generación se obtuvieron por mutagénesis dirigida usando “*in vivo Overlap Extension*” (IVOE) (Alcalde, 2010. *In vitro* Mutagenesis Protocols, J. Bramman, ed. (Totowa, New Jersey, US: Humana Press). Se realizaron simultáneamente dos reacciones de PCR para amplificar los dos fragmentos de ADN que superponen en posiciones específicas correspondientes a las regiones objetivo de mutagénesis dirigida en la secuencia parental. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 50 µL conteniendo 0,25 µM de cada cebador, 100 ng de molde, 0,25 mM de cada dNTP, 3% DMSO y 2,5 Unidades de la ADN polimerasa Pfu-Ultra. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95°C durante 2 min (1 ciclo); 94°C durante 0,45 min, 55°C durante 0,45 min, 74°C durante 2 min (28 ciclos); y 74°C durante 10 min (1 ciclo). Los fragmentos de PCR se cargaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión y se purificaron usando el kit “Zymoclean gel DNA recovery”. El plásmido pJRoC30 fue linealizado con *XhoI* y *BamHI* y el vector linealizado se purificó como se describió arriba para los fragmentos de PCR. Los fragmentos de PCR (400 ng de cada uno) se mezclaron con el vector linealizado (100 ng, 8:1 ratio producto PCR:vector) y se transformaron en células de levadura competentes como se describió anteriormente. En promedio, se analizaron 50 clones individuales por mutación. Los plásmidos seleccionados fueron aislados y secuenciados para verificar la mutagénesis dirigida.

## ES 2 370 216 A1

### 2.12. Séptima Generación

Los siguientes mutantes se construyeron usando la variante 6C8 como parental:

- 5 Mutante revertido S454F: Los cebadores para la PCR 1 fueron: RMLN y DEL-REV (SEQ ID NO: 19) (5'-cgtgaaccagcctcaaggtgGAAgtcgtatgtggcagtgagg-3' que se une en pb 5'-1823-1866-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1). Los cebadores para la PCR 2 fueron: DEL-FOR (SEQ ID NO: 20) (5'-cctccactgccacatcgacTTCcaccttgaggctgggttcacg-3' que se une en pb 5'-1823-1866-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1) y RMLC.
- 10 Mutante S224G: Los cebadores para la PCR 1 fueron: RMLN y 5-S315G-REV (SEQ ID NO: 21) (5'-gtctgggcttga gattcacGCCgtccgctcgatgacg-3' que se une en pb 5'-1136-1174-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1). Los cebadores para la PCR 2 fueron: 5'-S315G-FOR (SEQ ID NO: 22) (5'-cgtcatcgaggcggacGGCgtgaatctcaagccccagac-3' que se une en pb 5'-1136-1174-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1) y RMLC.
- 15 Mutante D281E: Los cebadores para la PCR 1 fueron: RMLN y 4-D372E-REV (SEQ ID NO: 23) (5'-gctcaacggcgc cagcaccTTCgtagcgaaggatggc-3' que se une en pb 5'-1308-1344-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1). Los cebadores para la PCR 2 fueron: 4-D372E-FOR (SEQ ID NO: 24) (5'-gccatcttctgctacGAAggtgctgcgcccggtgagc-3' que se une en pb 5'-1639-1678-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1) y RMLC.
- 20 Mutante P393H: Los cebadores para la PCR 1 fueron: RMLN y 3CP484HREV (SEQ ID NO: 25) (5'-gcaagtgaagg ggtgGTGgaagccggggcggcggagg-3' que se une en pb 5'-1639-1678-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1). Los cebadores para la PCR 2 fueron: 3CP484HFOR (SEQ ID NO: 26) (5'-cctccgccgccccggcttcCACcacccttccactgc-3' que se une en pb 5'-1639-1678-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1) y RMLC.
- 25 Mutante A[ $\alpha$ 9]D: Los cebadores para la PCR 1 fueron: RMLN-2 (SEQ ID NO: 27) (5'-ggtaattaatcagcgaagc-3' que se une en pb 5'-5-24-3' del pJR0C30- $\alpha$ ) y 1C-REVDI (SEQ ID NO: 28) (5'-gaggatgctgcgaataaATCcatcagtaaaaattgaagg-3' que se une en pb 5'-219-257-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1). Los cebadores para la PCR 2 fueron: 1C-FORDI (SEQ ID NO: 29) (5'-cctcaattttactgatGATttattcgcagcatctc-3' que se une en pb 5'-219-257-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1) y RMLC.
- 30 Doble mutante A[ $\alpha$ 9]D-D[ $\alpha$ 10]V: Los cebadores para la PCR 1 fueron: RMLN-2 y 1C-PREALREV (SEQ ID NO: 30) (5'-gaggatgctgcgaaAACATcatcagtaaaaattgaagg-3' que se une en pb 5'-219-257-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1). Los cebadores para la PCR 2 fueron: 1C-PREALFOR (SEQ ID NO: 31) (5'-cctcaattttactGATGTTttattcgcagcatctc-3' que se une en pb 5'-219-257-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1) y RMLC.
- 35 Mutante revertido D[ $\alpha$ 10]V: Los cebadores para la PCR 1 fueron: RMLN-2 y 1C-PREALDOBREV (SEQ ID NO: 32) (5'-gaggatgctgcgaaAACatcagtaaaaattgaagg-3' que se une en pb 5'-219-257-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1). Los cebadores para la PCR 2 fueron: 1C-PREALDOBFOR (SEQ ID NO: 33) (5'-cctcaattttactgatGTTttattcgcagcatctc-3' que se une en pb 5'-219-257-3' del pJR0C30- $\alpha$ PM1) y RMLC.

40

### 2.13. Octava Generación

- El mutante OB-1 se obtuvo por introducción de las mutaciones S224G y D281E en el mutante revertido S454F de la 7ª generación. Los cebadores para la PCR1 fueron: RMLN y 5-S315G-REV. Los cebadores para la PCR2 fueron: 5-S315G-FOR y 4-D372E-REV. Los cebadores para la PCR3 fueron: 4-D372E-FOR y RMLC.

Todos los codones sometidos a mutagénesis dirigida están subrayados.

### 2.14. Screening de alto rendimiento

- Los *screenings* de actividad y termoestabilidad se realizaron en formato sólido y líquido (en placas de 96 pocillos). Los mutantes seleccionados fueron producidos y purificados como se describe más adelante.

55

### Modelado de la Proteína

- En la base de datos de proteínas "Protein Data Bank" se llevó a cabo una búsqueda de proteínas con homología estructural respecto a la lacasa PM1. La proteína más similar a la PM1 fue la lacasa de *Trametes trogii*, cuya estructura cristalográfica está resuelta con una resolución de 1,58 Å y tiene un 97% de identidad de secuencia (PDB id: 2hrGA) (Matera *et al.*, 2008. Inorg. Chim. Acta 361, 4129-4137). Se generó un modelo por medio del servidor para el modelado de proteínas Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) y se analizó con DeepView/Swiss-Pdb Viewer y PyMol Viewer.

65



## Ejemplo 3

## Caracterización del mutante OB-1

5 El último mutante obtenido, la variante OB-1, fue purificado a homogeneidad y caracterizado bioquímicamente (Tabla 3, Figuras 4 y 8). La actividad específica del mutante OB-1 fue de 400 U/mg y presentó unos niveles de secreción de ~8 mg/L. La masa molecular de OB-1 fue estimada por espectrometría de masas MALDI-TOF en 60.310 Da, 3.690 Da por debajo del peso molecular para la lacasa nativa expresada por el basidiomiceto PM1 (Coll *et al.*, 1993. Appl. Environ. Microb. 59, 2607-2613) (Figura 8). La masa molecular determinada a partir de la composición de  
10 aminoácidos de OB-1 fue 53.284 Da y la contribución a la glicosilación deducida a partir del patrón de desglicosilación fue entorno al 10% (Figura 8).

TABLA 3

## Cinéticas para la lacasa evolucionada

Substrato	Mutante OB-1		
	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )
ABTS	0,0063 ± 0,0009	200 ± 7	31721
DMP	0,14 ± 0,02	134 ± 5	939
Guaiacol	6,6 ± 0,5	47 ± 1	7,2

30 Nuestros resultados de evolución dirigida en *S. cerevisiae* de las lacasas de *P. cinnabarinus* (PcL) (Camarero *et al.*, 2009. Patent PCT/ES2009/070516) y de la lacasa *M. thermophila* (MtL) (Bulter *et al.*, 2003. Appl. Environ. Microb. 69, 987-995; Zumárraga *et al.*, 2007. Chem. Biol. 14, 1052-1064) fueron bastante diferentes y al contrario que la variante OB-1, los mutantes de PcL y MtL fueron hiperglicosilados con residuos de azúcar que contribuyeron alrededor del 50% del peso molecular total. Ya que en el aparato de Golgi es donde se produce la compleja adición de cadenas periféricas de carbohidratos mediante la incorporación de residuos de mañosa, la hiperglicosilación puede ser  
35 considerada como una consecuencia de tiempos de residencia más largos en este compartimento celular. Suponemos que nuestro mutante evolucionado es fácilmente secretado por *S. cerevisiae* mientras que otras lacasas heterólogas experimentan serias dificultades para salir del Golgi. Los perfiles de pH para compuestos fenólicos y no fenólicos no se vieron alterados significativamente durante la evolución, por lo que OB-1 y las variantes previas del proceso evolutivo mostraron similares valores de pH (aproximadamente 4,0 y 3,0 para DMP y ABTS respectivamente, Figuras 4A, 4B).  
40 Los parámetros cinéticos se valoraron con sustratos clásicos frecuentemente usados para caracterizar lacasas (Tabla 3). Las cinéticas de OB-1 fueron ~4 a 6 veces mejores que las descritas para las lacasas altamente relacionadas de *Trametes* C30 y *Trametes trogii*, que comparten 99 y 97% de identidad de secuencia con la lacasa PM1, respectivamente (Klonowska *et al.*, 2002. Eur. J. Biochem. 269, 6119-6125; Colao *et al.*, 2006. Microb. Cell Fact. 5, 31). Notablemente, tras 8 ciclos de evolución la termoestabilidad del mutante OB-1 se conservó 100%, con valores de  $T_{50}$  de ~73°C. La lacasa PM1 pertenece al grupo de lacasas de alto potencial redox aisladas de la región oeste del Mediterráneo, junto con las lacasas de *T. trogii*, *Trametes* C30 y *Corioloopsis gallica*. Todas estas lacasas de alto potencial redox comparten un elevado grado de identidad de secuencia (superior al 97%) y similares características bioquímicas, incluyendo en todos los casos una elevada termoestabilidad (Colao *et al.*, 2003. Appl. Microbiol. Biot. 63, 153-158; Hilden *et al.*, 2009. Biotechnol. Lett. 31, 1117-1128). Para evaluar adicionalmente la termoestabilidad de nuestra lacasa evolucionada, se comparó con una batería de lacasas de alto potencial redox de diferentes procedencias (Figura 4C). La  $T_{50}$  del mutante OB-1 fue mayor que las de las lacasas de alto potencial redox de *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor*, *P. cinnabarinus*, o *Pleurotus ostreatus* y como se presumía, similar a la  $T_{50}$  de *Corioloopsis gallica* (con un 96% de identidad de secuencia con la PM1, Figura 10). La estabilidad de OB-1 fue adicionalmente evaluada en presencia de altas concentraciones de cosolventes orgánicos con diferentes polaridades y naturaleza química (Figura 4D). Como  
55 era de esperar de una enzima altamente termoestable (Zumárraga *et al.*, 2007), la lacasa evolucionada PM1 fue altamente tolerante a la presencia de cosolventes (reteniendo entre un 30 a un 90% de su actividad tras 4 h de incubación en concentraciones de cosolventes tan altas como 50% (v/v)). La estabilidad de la lacasa evolucionada a diferentes valores de pHs fue también evaluada, manteniendo cerca del 90% de su actividad en el intervalo de pH 3-9 tras 4 h de incubación (Figura 4E).

60 La última variante OB-1 acumuló 15 mutaciones: 5 en la secuencia preprolíder del factor  $\alpha$  (dos sinónimas), y 10 en la proteína madura (3 sinónimas). Tres de las cinco mutaciones sinónimas favorecieron el uso de codones (Tabla 1), lo cual puede ser un factor potencial para beneficiar el rendimiento de la secreción afectando a la velocidad de elongación (Romanos *et al.*, 1992. Yeast 8, 423-488). Las mutaciones beneficiosas en la lacasa madura se mapearon básicamente en residuos más bien accesibles, algunos localizados lejos de los cobres catalíticos mientras que otros aparecieron en la vecindad de los sitios catalíticos (la Tabla 4 y las Figuras 5, 9 resumen las características de estos cambios en la estructura de la lacasa mutante).

## ES 2 370 216 A1

En particular, las mutaciones V162A, S426N y A461T están en la vecindad del cobre T1. La Val162 es uno de los residuos hidrofóbicos en el lazo que delimita la cavidad del bolsillo de sustrato del sitio T1 (Bertrand *et al.*, 2002. *Biochemistry* 41, 7325-7333). El cambio de Val a Ala en esta posición representa la sustitución de un residuo hidrofóbico por otro que también lo es pero más pequeño, lo cual podría favorecer la unión del sustrato (Figuras 5A, 5B). La Ser426 está unida mediante un puente de H a la Gly428 pero tras la mutación el puente de H se interrumpe y la Asn426 resultante establece un nuevo puente de H con la Thr427 adyacente. A consecuencia de este efecto, la Thr427 se encuentra doblemente unida a la His394 que es ligando del cobre T1, por lo que este cambio podría afectar la posición relativa de la His394 respecto del sitio T1 (Figuras 5A, 5B).

La Ala461 es adyacente a la Phe460, que constituye la posición del cuarto ligando axial en lacasas de plantas y bacterianas (Alcalde, 2007. *Industrial Enzymes: Structure, functions and applications*, J. Polaina and A.P. MacCabe, eds. (Dordrecht, The Netherlands: Springer) 459-474), y establece puentes de hidrógeno con los ligandos del cobre T1, His455 y Cys450. La mutación A461T parece generar un nuevo puente de H con la Phe460, lo cual podría cambiar la geometría local del sitio T1 (Xu *et al.*, 1998. *Biochem. J.* 334, 63-70), Figuras 5A, 5B.

La mayoría de las mutaciones beneficiosas restantes (H208Y, S224G, A239P, D281E) fueron localizadas lejos de los cobres catalíticos, apareciendo en giros y motivos secundarios cuyo papel en la función de la lacasa es incierto (Tabla 4, Figuras 5C, 5D, 5E, 5F). Es altamente improbable que tales mutaciones pudieran haber sido anticipadas mediante diseño racional, sin embargo, el empleo de la evolución dirigida ha permitido descubrir la relevancia funcional de estas regiones de la lacasa previamente desconocidas.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 4: Mutaciones en el mutante maduro OB-1.

Mutación	Dominio	Motivo de estructura secundaria	Posición relativa	Distancia al sitio T1 (Å)	Distancia al sitio T2/T3 (Å)	Interacciones mediante puentes de hidrógeno con los residuos circundantes*	
						Antes de la mutación	Después de la mutación
V162A	D2	Giro	Superficie	9.62	21.29	---	---
H208Y	D2	Lámina beta	Cerca del Asp206 (que une fenoles al Cu del sitio T1)	14.74	19.33	I237, T168	I237, T168
S224G	D3	Giro	Superficie	21.22	9.96	<u>T105, E221, R242</u>	E221
A239P	D2	Giro	Superficie	8.57	11.65	Q241	Q241
D281E	D2	Giro	Superficie	39.95	35.33	<u>T188, V189, T190</u>	V189, <b>G282</b>
S426N	D3	Lámina beta	Superficie. En la vecindad del Cu T1, al lado de la T427 (unida a la H394).	8.23	16.40	<u>G428</u>	<b>T427</b>
A461T	D3	Lámina beta	Vecindad del Cu T1, al lado de la F460 (posición del 4º ligando axial).	8.86	10.93	G459	G459, <b>F460</b>

\* Subrayado, las uniones interrumpidas tras la mutación; en negrita, las nuevas uniones formadas tras la mutación.

## ES 2 370 216 A1

Por ejemplo, el Asp281 está localizado en un loop distal del dominio D2 quedando prácticamente expuesto a la superficie proteica (a unos 40 Å del sitio del cobre T1). La sustitución de un Asp por un Glu en la posición 281 rompió dos puentes de H con la Thr188 y la Thr190 de un bucle vecino, y produjo un nuevo puente de H con la Gly282 del mismo motivo, lo cual podría incrementar la flexibilidad de esta zona (Figuras 5E, 5F). En cualquier caso, tampoco se puede descartar que las mutaciones mencionadas mejoren el plegamiento y la maduración de la lacasa en *S. cerevisiae*, además de su posible contribución a la robustez final de la proteína.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido que codifica para el polipéptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
2. Polinucleótido según la reivindicación 1 de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.
3. Construcción genética que comprende:
  - a. el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
  - b. el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que además comprende un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicho polinucleótido, y/o con otras secuencias nucleotídicas necesarias o apropiadas para la transcripción *in vitro* o *in vivo* y su regulación en tiempo y lugar.
4. Construcción genética según la reivindicación 3, que además comprende un polinucleótido que codifica para un péptido señal que favorece la expresión funcional del polipéptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
5. Construcción genética según la reivindicación 4, donde el péptido señal es el del factor  $\alpha$  evolucionado de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 9.
6. Construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, donde el polinucleótido que codifica para el péptido señal es la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 10.
7. Construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que comprende un polinucleótido que codifica para el polipéptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.
8. Construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 3-7, que comprende el polinucleótido de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4.
9. Construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 3-8, donde entre la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal del factor  $\alpha$  y la secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, se encuentra la secuencia nucleotídica que codifica para los aminoácidos ácido glutámico y fenilalanina.
10. Construcción genética según la reivindicación 9 que comprende un polinucleótido que codifica para el polipéptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5.
11. Construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 que comprende el polinucleótido de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 6.
12. Célula hospedadora que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 3-11.
13. Célula hospedadora según la reivindicación 12, que es una levadura.
14. Célula hospedadora según la reivindicación 13, que pertenece al género *Saccharomyces*.
15. Célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 que pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
16. Lacasa de alto potencial redox que comprende el polipéptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
17. Lacasa de alto potencial redox según la reivindicación 16 que además comprende los aminoácidos ácido glutámico y fenilalanina en el extremo amino del polipéptido, cuya secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 7.
18. Lacasa de alto potencial redox según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, que además comprende los últimos cuatro aminoácidos del péptido señal del factor  $\alpha$  (ácido glutámico, treonina, ácido glutámico, alanina) en el extremo amino del polipéptido, cuya secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 8.
19. Método de obtención de una lacasa de alto potencial redox según se describe en las reivindicaciones 16-18, que comprende:
  - a. cultivar la célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, y
  - b. purificar la lacasa.

## ES 2 370 216 A1

20. Uso de los polinucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o de las construcciones genéticas según cualquiera de las reivindicaciones 3-11 para la obtención de una lacasa de alto potencial redox.

5 21. Uso de la célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 12-15 para la obtención de una lacasa de alto potencial redox.

22. Cultivo celular que comprende las células hospedadoras según cualquiera de las reivindicaciones 12-15.

10 23. Uso del cultivo según la reivindicación 22 para la obtención de una lacasa de alto potencial redox.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

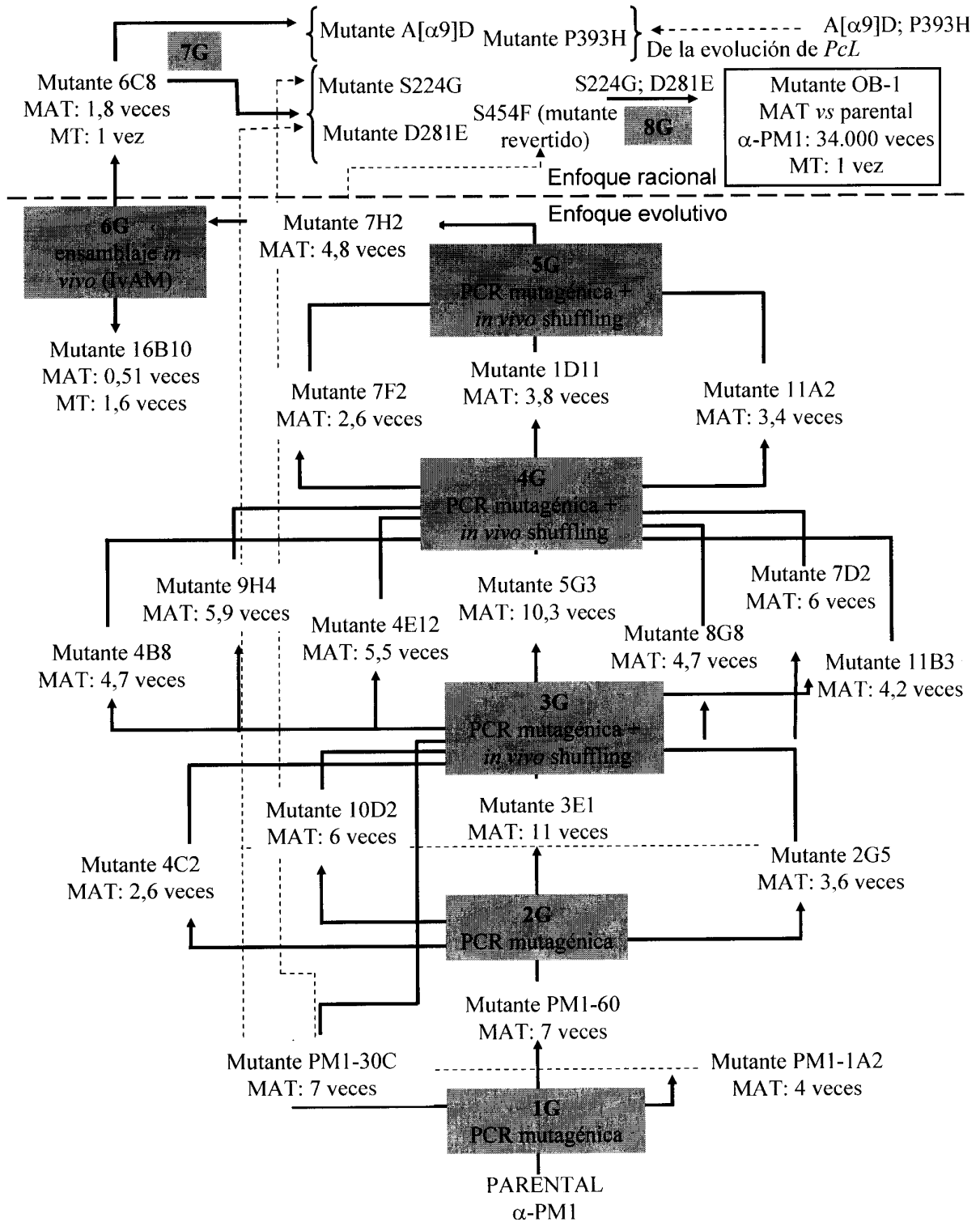


FIG. 2 CONTINÚA

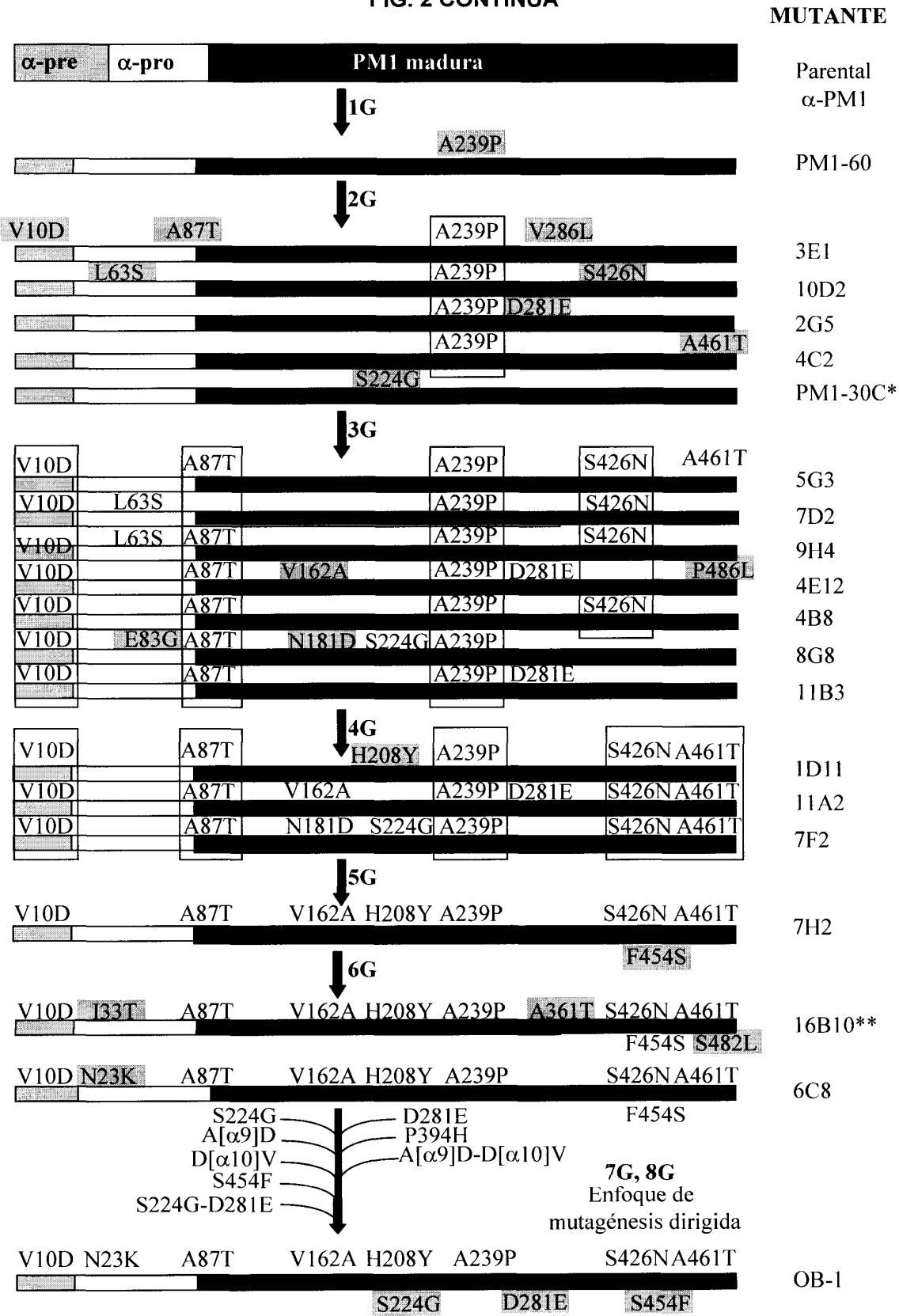




FIG. 2

MUTANTE	EVENTO DE ENTRE-CRUZAMIENTO SUGERIDO	MEJORA (VECES) Mutante/parental $\alpha$ -M1
Parental $\alpha$ -PM1	---	---
PM1-60	---	12
3E1	---	132
10D2	---	72
2G5	---	43
4C2	---	31
PM1-30C*	---	7*
5G3	3E1+10D2+4C2	1.360
7D2	3E1+10D2	792
9H4	3E1+10D2	779
4E12	3E1+2G5+2 nuevas mutaciones	726
4B8	3E1+10D2	620
8G8	3E1+PM1-30C+2 nuevas mutaciones	620
11B3	3E1+2G5	554
1D11	5G3+1 nueva mutación	5.170
11A2	5G3+4E12	4.625
7F2	5G3+8G8	3.535
7H2	11A2+1D11 +1 nueva mutación	24.290
16B10**	2 nuevas mutaciones	12.390
6C8	1 nuevas mutaciones	43.720
OB-1	3 mutaciones: 2 recuperadas, 1 revertida	34.000

FIG 3A

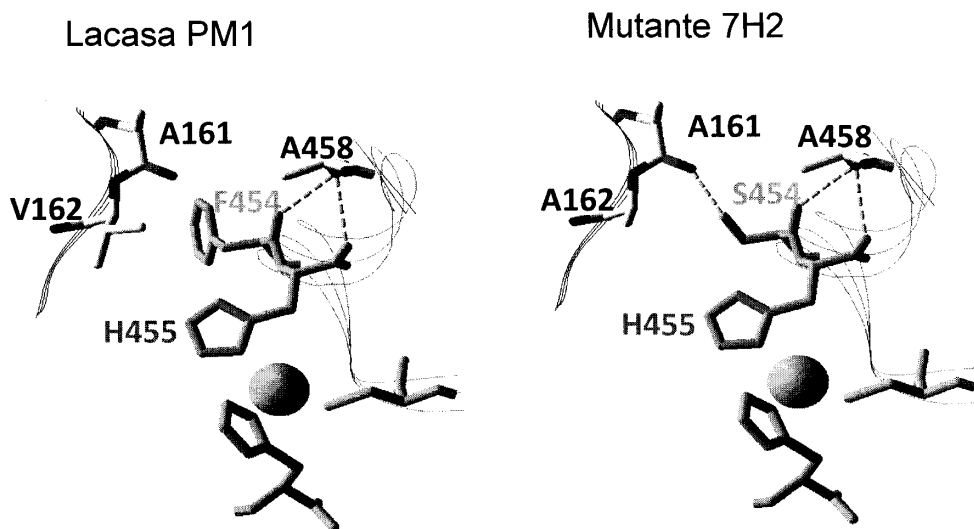


FIG. 3B

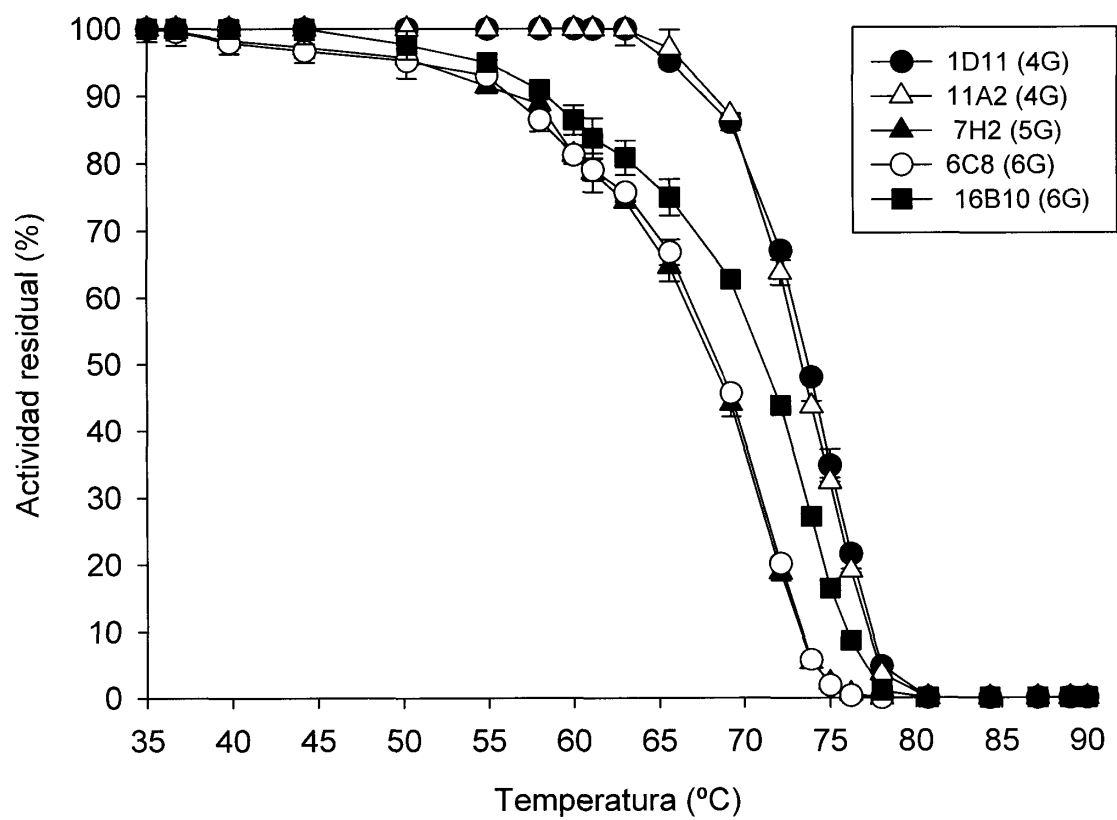


FIG. 3C

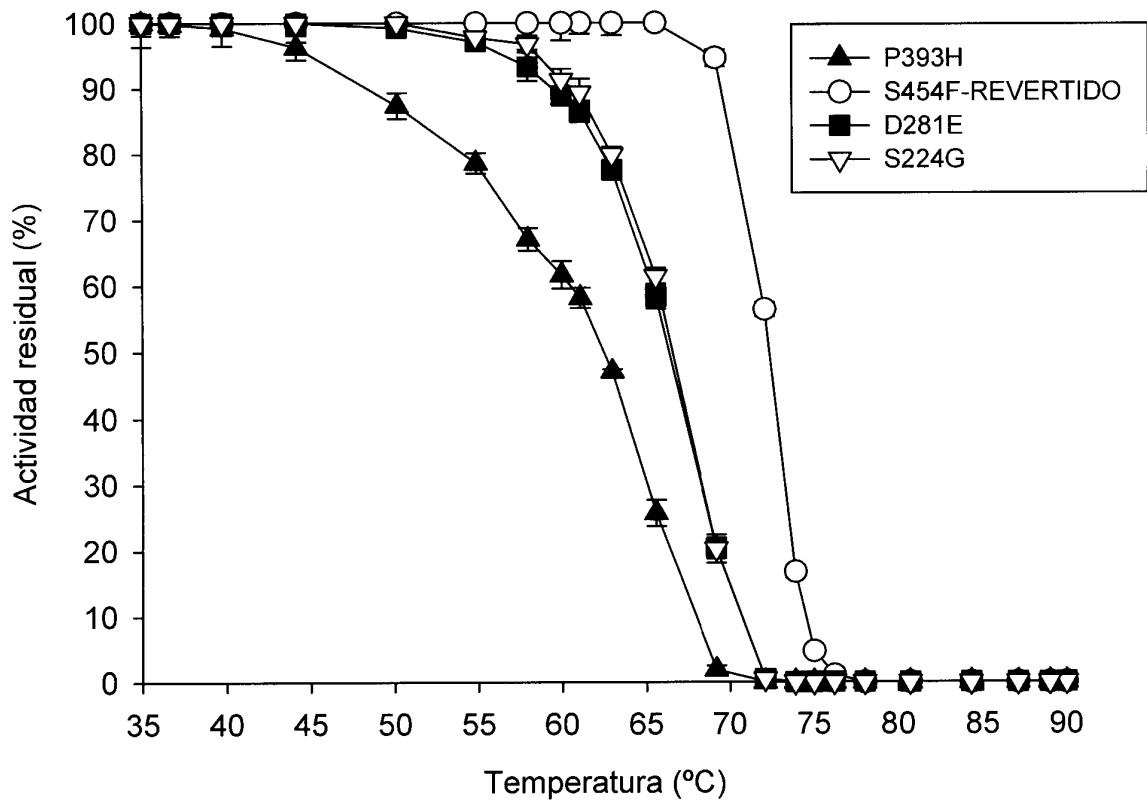


FIG. 4A

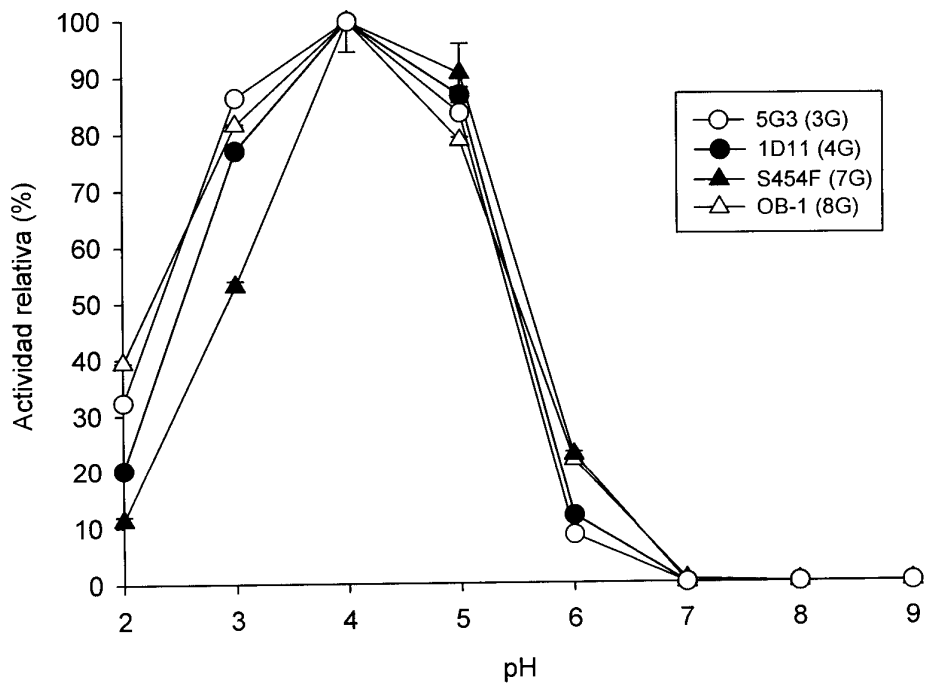


FIG. 4B

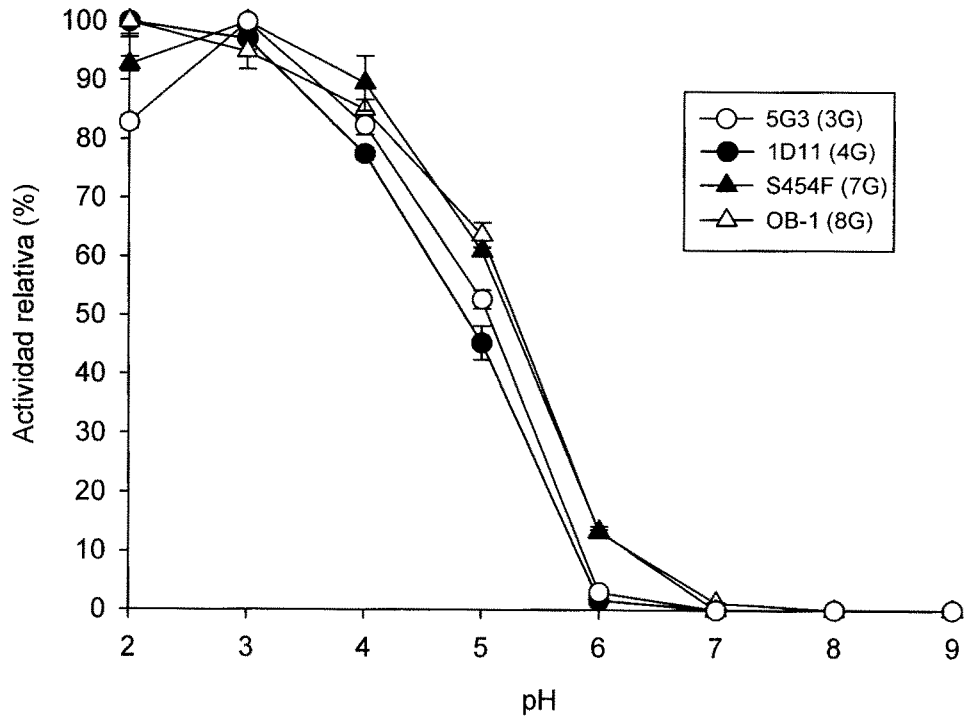


FIG. 4C

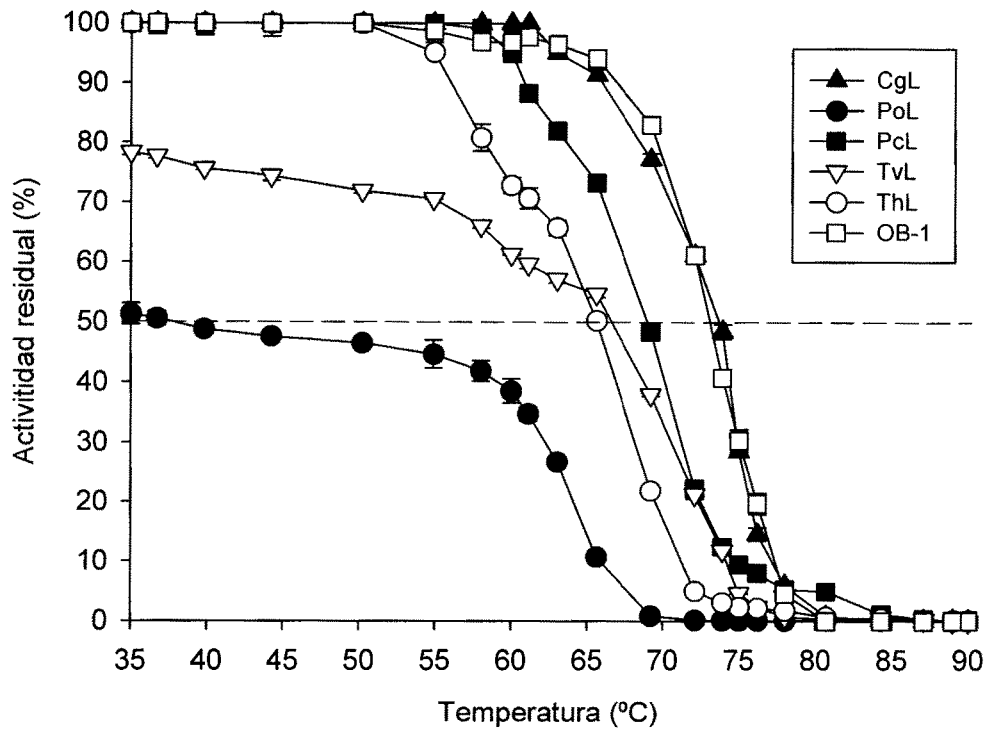


FIG. 4D

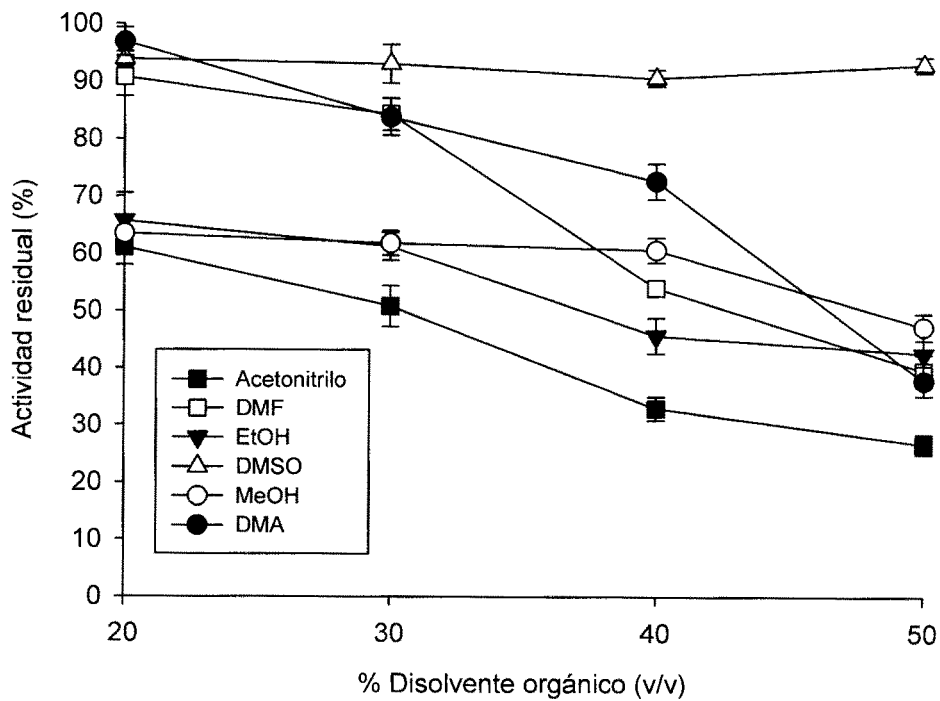


FIG. 4E

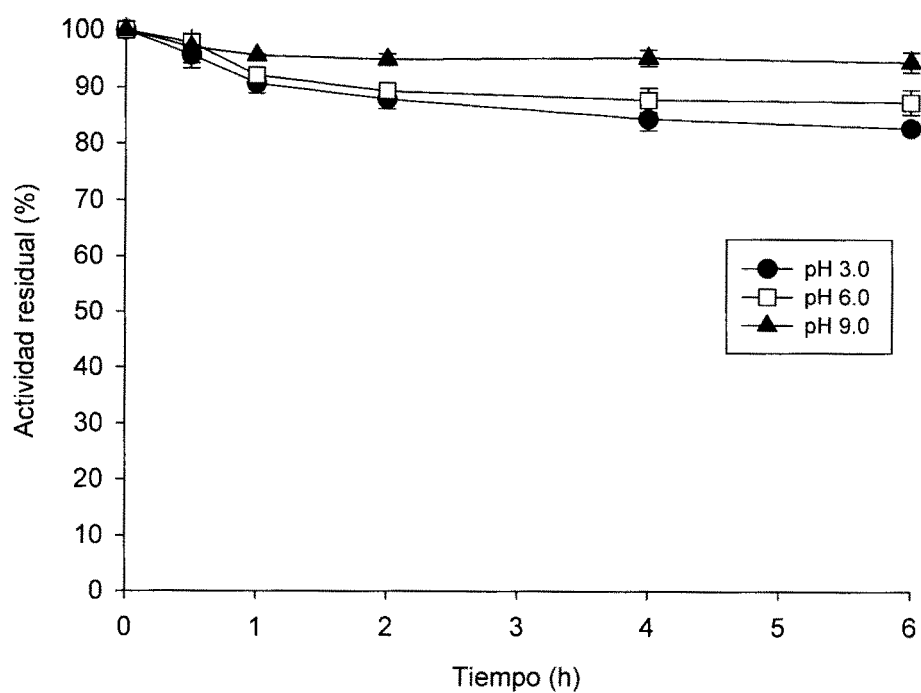


FIG. 5

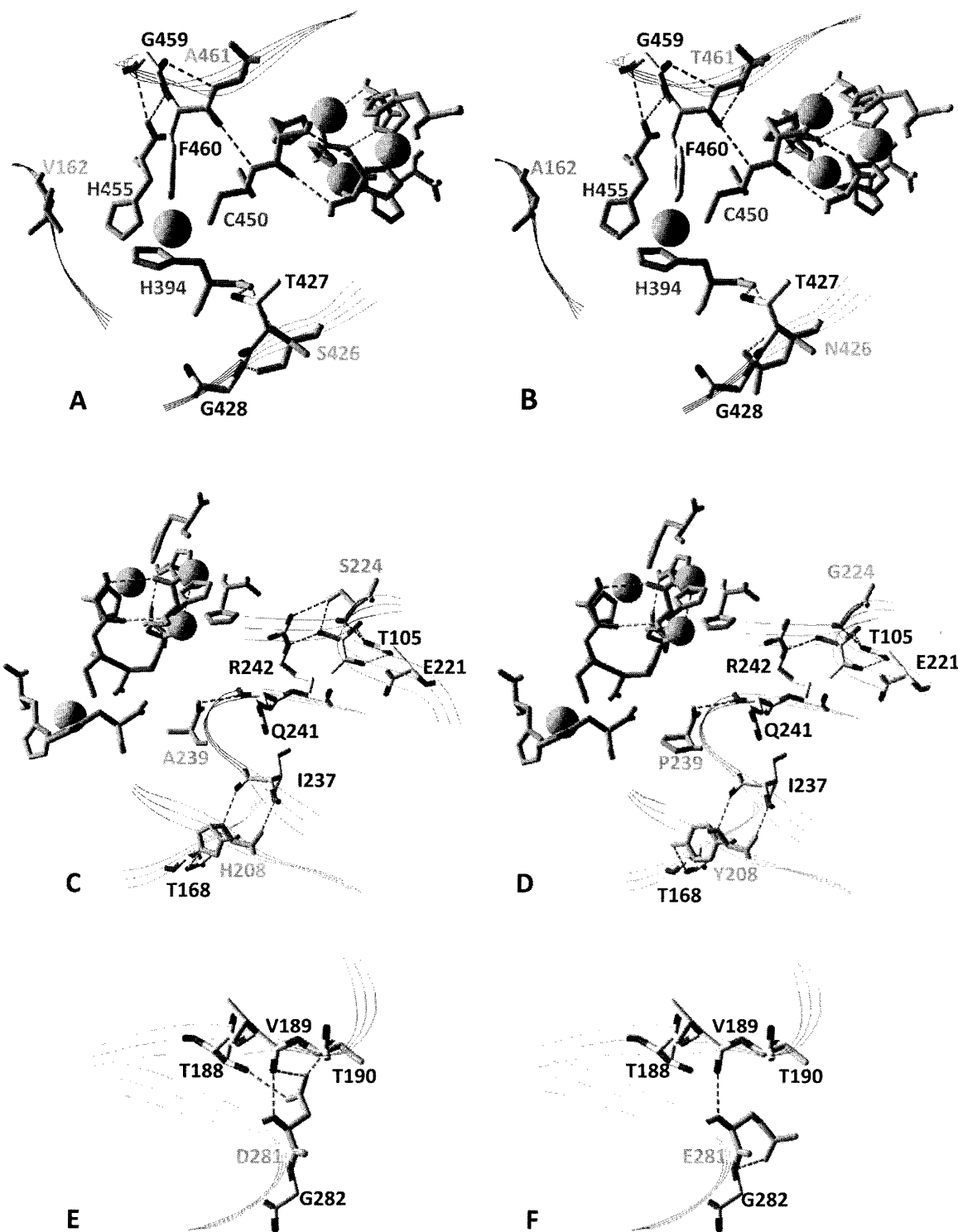


FIG. 6 CONTINÚA

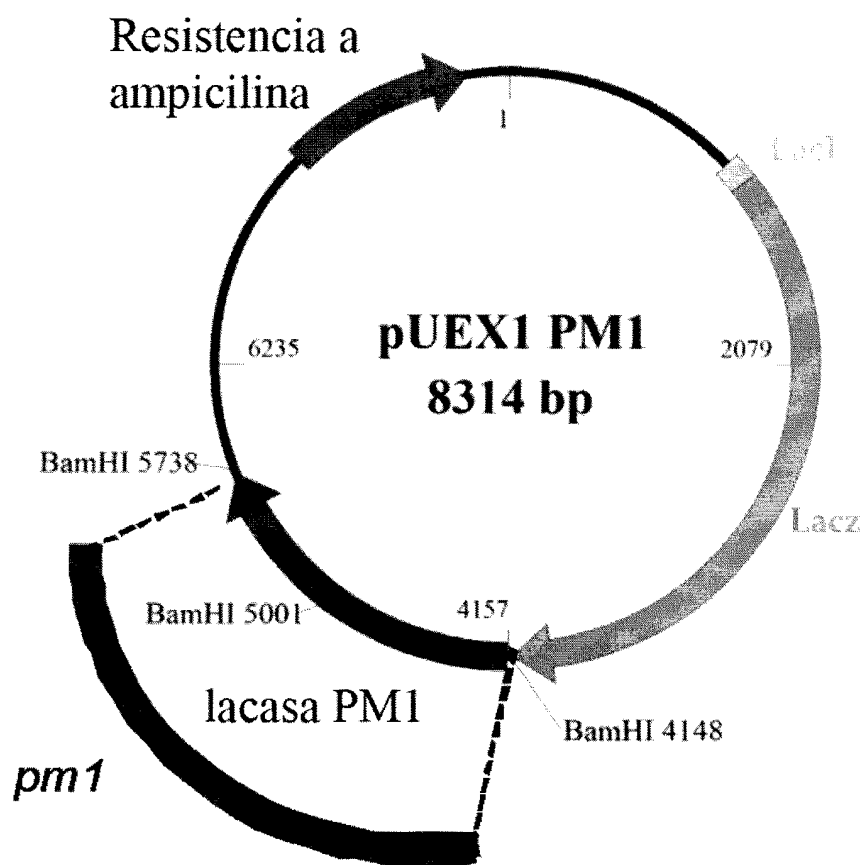
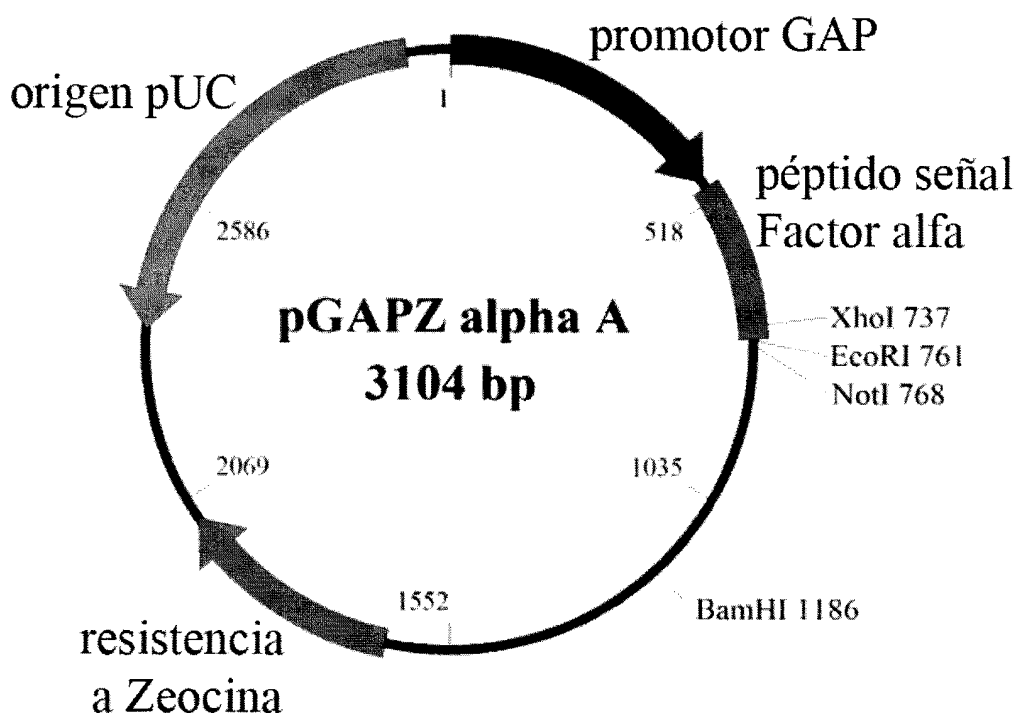


FIG. 6 CONTINÚA

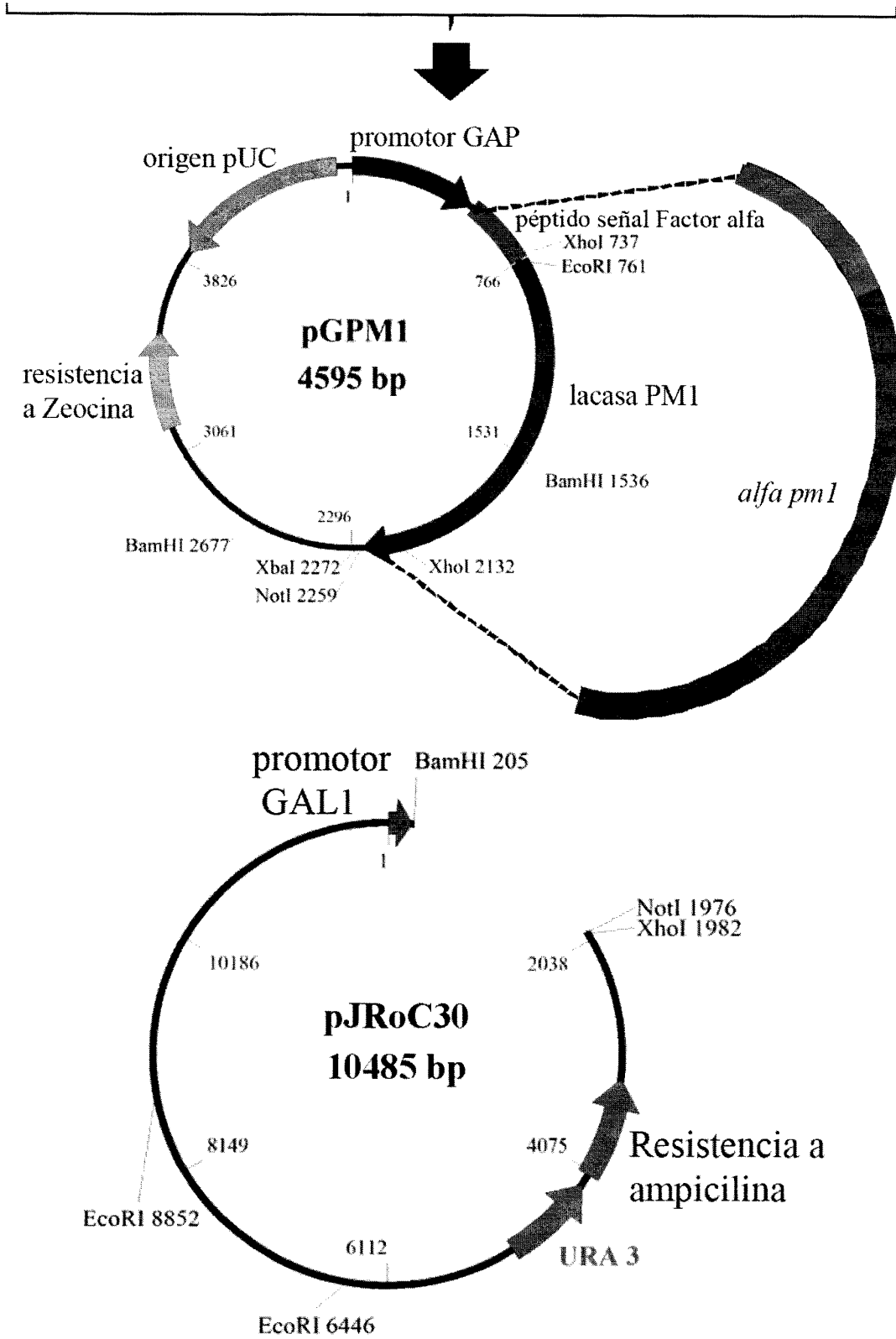




FIG. 6

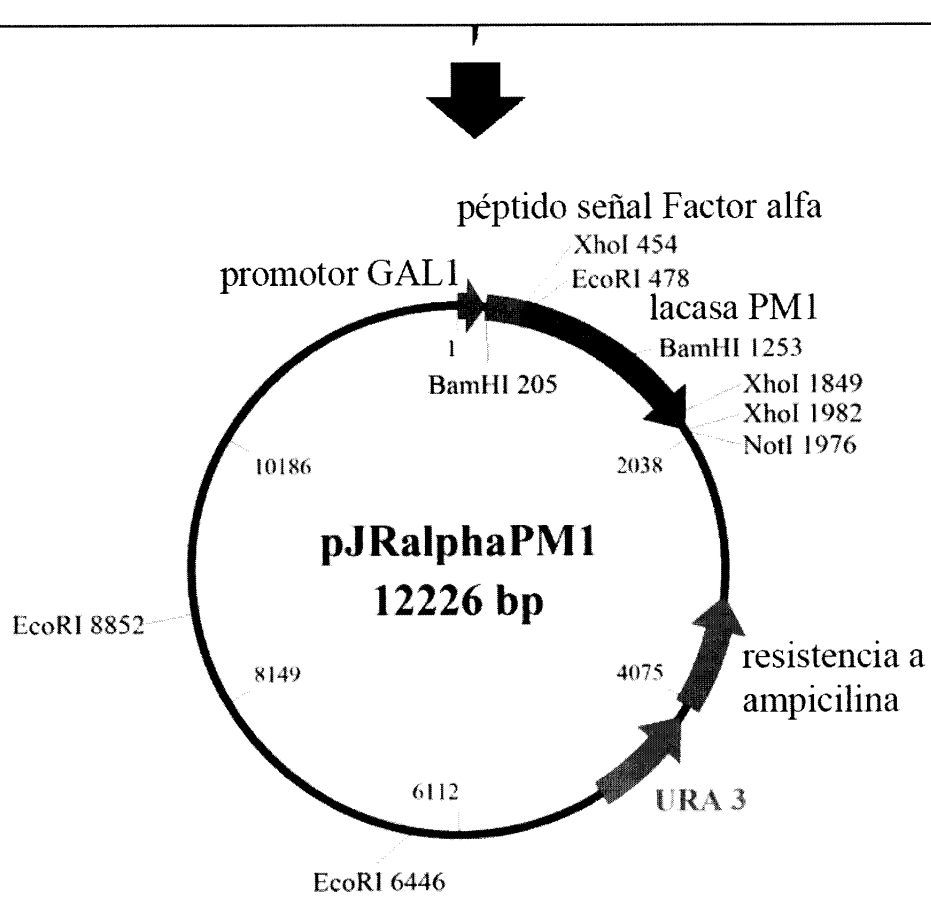


FIG. 7

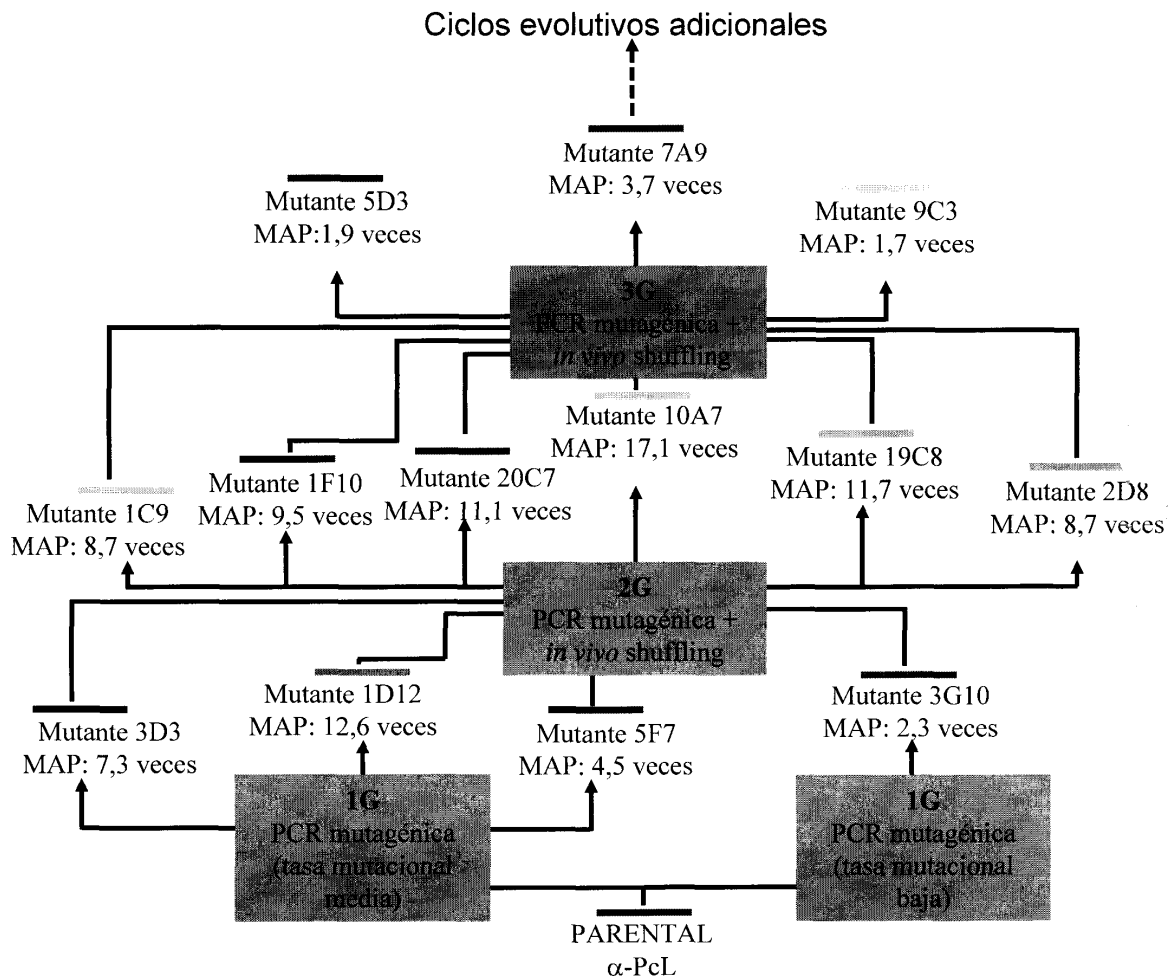


FIG. 8

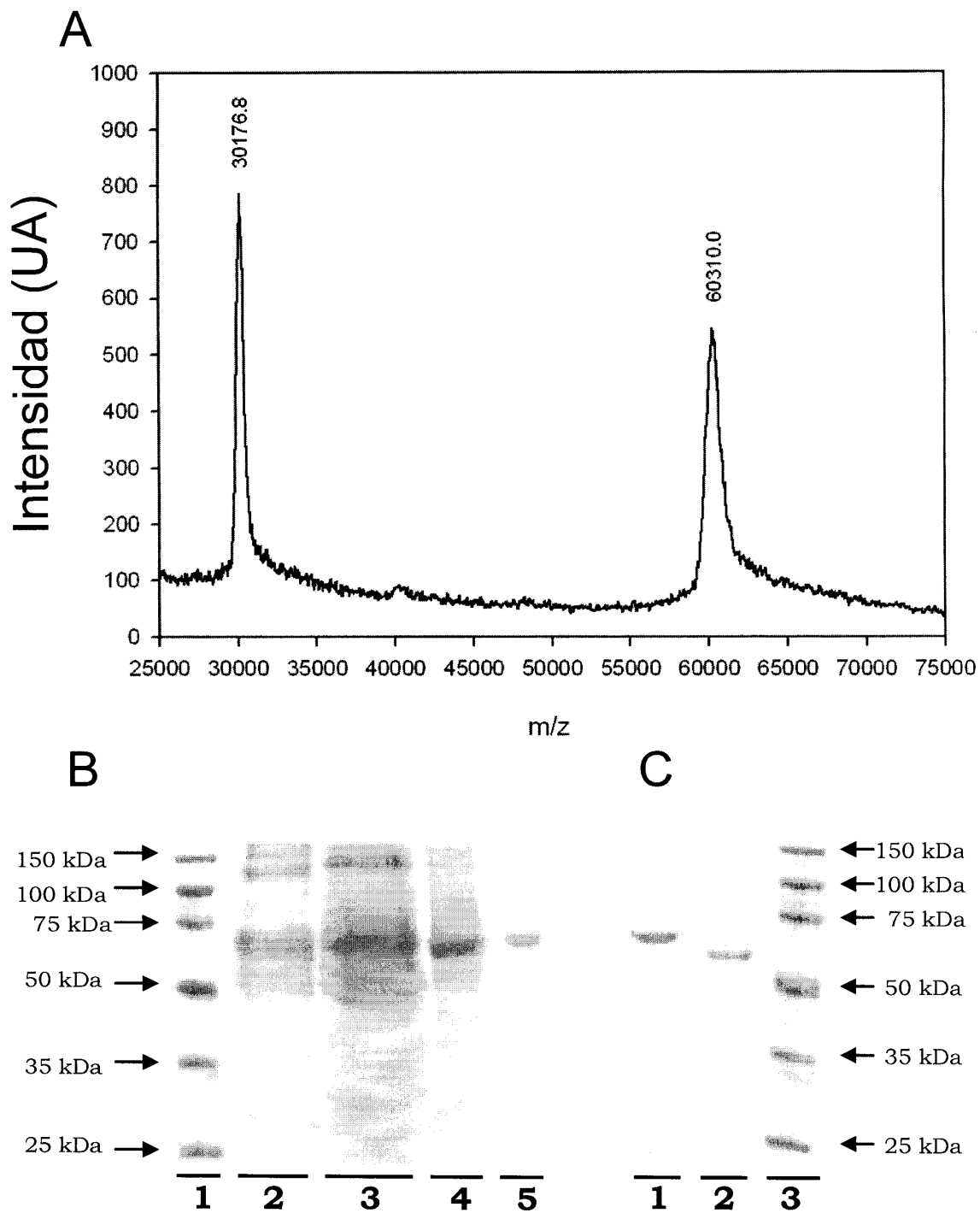


FIG. 9

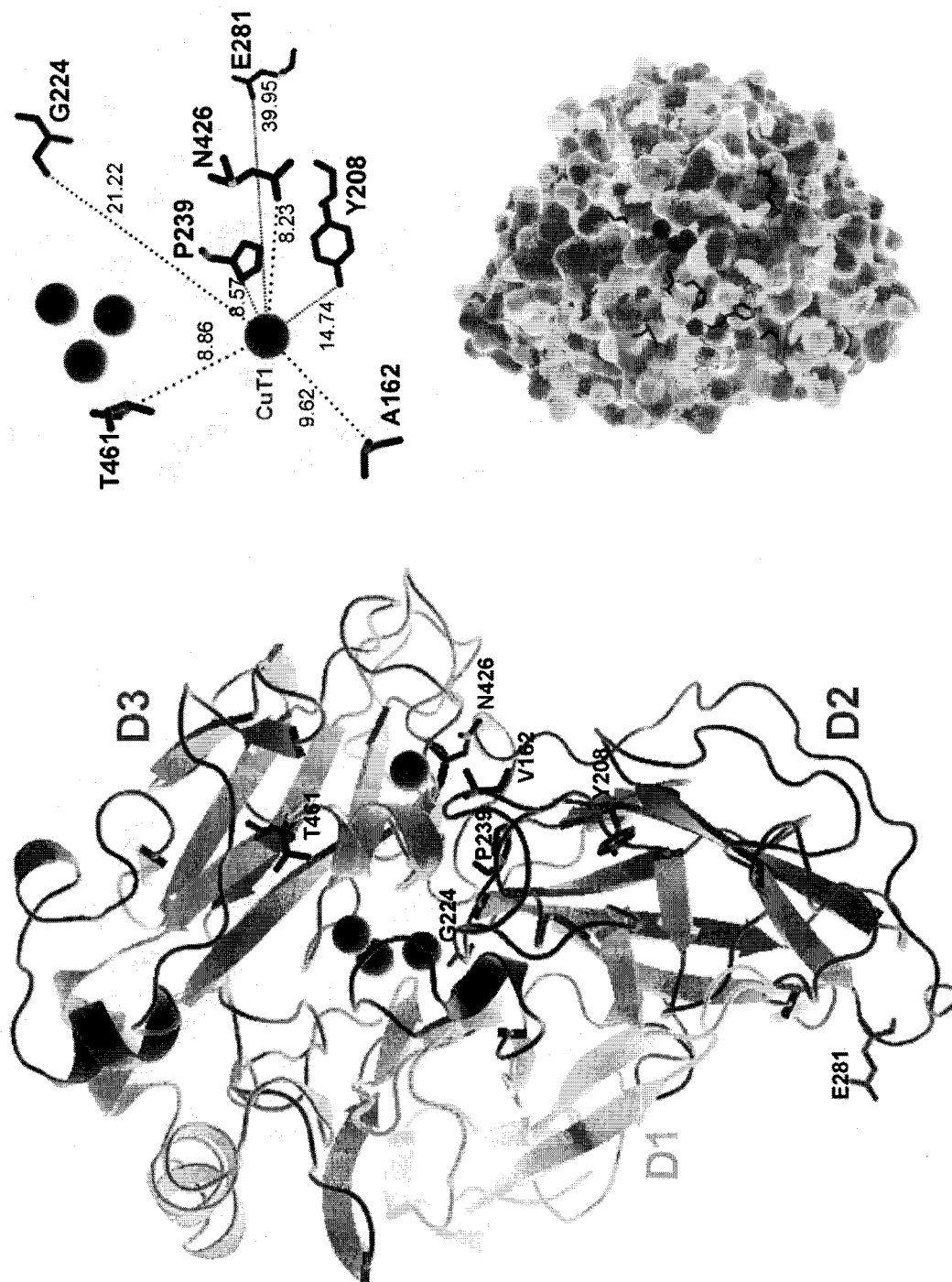


FIG. 10

HRPL	IDENTIDAD	400	400	379	400	379	401	401	401	401	401	401	401	401	401	401	379
PM1		99%	97%	96%	90%	81%	80%	80%	78%	78%	78%	77%	77%	76%			
<i>T.C30</i>																	
<i>T.trogii</i>																	
<i>C.gallica</i>																	
<i>C.rigida</i>																	
<i>T.sp AH28-2</i>																	
<i>T.versicolor</i>																	
<i>T.pubescens</i>																	
<i>T.hirsuta</i>																	
<i>T. I-62</i>																	
<i>P.coccineus</i>																	
<i>P.sanguineus</i>																	
<i>P.cinnabarinus</i>																	
<i>L.tigrinus</i>																	

# ES 2 370 216 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

5 <120> Lacasa de alto potencial redox

<130> 1641.761

10 <160> 47

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1  
<211> 496  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(496)

25 <223> Secuencia modificada de la lacasa del basidiomiceto PM1.

<400> 1

30 Ser Ile Gly Pro Val Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser  
1 5 10 15

35 Pro Asp Gly Phe Ser Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro  
20 25 30

40 Ser Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val  
35 40 45

45 Ile Asp Asn Met Thr Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His  
50 55 60

50 Trp His Gly Phe Phe Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala  
65 70 75 80

55 Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp  
85 90 95

60 Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu  
100 105 110

65 Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Val Tyr Asp  
115 120 125

70 Pro Gln Asp Pro His Lys Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp Asp Ser Thr  
130 135 140

75 Val Ile Thr Leu Ala Asp Trp Tyr His Leu Ala Ala Lys Val Gly Pro  
145 150 155 160

80 Ala Ala Pro Thr Ala Asp Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Ser  
165 170 175

## ES 2 370 216 A1

	Ile	Asn	Thr	Leu 180	Asn	Ala	Asp	Leu	Ala 185	Val	Ile	Thr	Val	Thr 190	Lys	Gly
5	Lys	Arg	Tyr 195	Arg	Phe	Arg	Leu	Val 200	Ser	Leu	Ser	Cys	Asp 205	Pro	Asn	Tyr
10	Thr	Phe 210	Ser	Ile	Asp	Gly	His 215	Ser	Leu	Thr	Val	Ile 220	Glu	Ala	Asp	Gly
15	Val 225	Asn	Leu	Lys	Pro	Gln 230	Thr	Val	Asp	Ser	Ile 235	Gln	Ile	Phe	Pro	Ala 240
20	Gln	Arg	Tyr	Ser	Phe 245	Val	Leu	Asn	Ala	Asp 250	Gln	Asp	Val	Asp	Asn 255	Tyr
25	Trp	Ile	Arg	Ala 260	Leu	Pro	Asn	Ser	Gly 265	Thr	Arg	Asn	Phe	Asp 270	Gly	Gly
30	Val	Asn	Ser 275	Ala	Ile	Leu	Arg	Tyr 280	Glu	Gly	Ala	Ala	Pro 285	Val	Glu	Pro
35	Thr	Thr 290	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser 295	Thr	Gln	Pro	Leu	Val 300	Glu	Ser	Ala	Leu
40	Thr 305	Thr	Leu	Glu	Gly	Thr 310	Ala	Ala	Pro	Gly	Asn 315	Pro	Thr	Pro	Gly	Gly 320
45	Val	Asp	Leu	Ala	Leu 325	Asn	Met	Ala	Phe	Gly 330	Phe	Ala	Gly	Gly	Arg 335	Phe
50	Thr	Ile	Asn	Gly 340	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro 345	Pro	Thr	Val	Pro	Val 350	Leu	Leu
55	Gln	Ile	Leu 355	Ser	Gly	Ala	Gln	Ser 360	Ala	Gln	Asp	Leu	Leu 365	Pro	Ser	Gly
60	Ser	Val 370	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ala 375	Asn	Ala	Asp	Ile	Glu 380	Ile	Ser	Leu	Pro
65	Ala 385	Thr	Ser	Ala	Ala	Pro 390	Gly	Phe	Pro	His 395	Pro	Phe	His	Leu	His	Gly 400
70	His	Thr	Phe	Ala	Val 405	Val	Arg	Ser	Ala	Gly 410	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asn 415	Tyr
75	Ala	Asn	Pro	Val 420	Tyr	Arg	Asp	Val	Val 425	Asn	Thr	Gly	Ser	Pro 430	Gly	Asp
80	Asn	Val	Thr 435	Ile	Arg	Phe	Arg	Thr 440	Asp	Asn	Pro	Gly	Pro 445	Trp	Phe	Leu

## ES 2 370 216 A1

His Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Thr Val Val Met  
 450 455 460

5 Ala Glu Asp Ile Pro Asp Val Ala Ala Thr Asn Pro Val Pro Gln Ala  
 465 470 475 480

10 Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr Asp Ala Leu Ser Pro Asp Asp Gln  
 485 490 495

<210> 2

15 <211> 1488

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1488)

<223> Secuencia modificada derivada de la secuencia que codifica para la lacasa del basidiomiceto PM1.

25

<400> 2

30	agcattgggc cagtcgcaga cctcaccatc tccaacgggtg ctgtcagtcc cgatggtttc	60
	tctcggcagg ccatcctggt caacgacgtc ttcccagtc ccctcattac ggggaacaag	120
	ggtgatcgtt tccaactcaa tgtcatcgac aacatgacca accacacat gttgaagtc	180
35	accagtatcc attggcacgg cttcttccag cacggcacca actgggccga cggccccgcc	240
	ttcgtgaacc agtgcccgat ttctaccggg catgcgttcc tttacgactt ccaggtcctt	300
	gaccaagctg gtactttctg gtaccacagt cacttgcca ctcaatactg tgacgggtctc	360
40	aggggtccga ttgttgctta tgaccctcaa gatccccaca agagccttta cgatgttgat	420
	gacgactcca ctgtaatcac tctcgggat tgggtaccact tggctgcaa agtcggccccg	480
	gcgccccga ctgccgatgc tactcttata aacggcctcg gtcgcagcat caacacgctc	540
45	aacgccgatt tggctgtcat cacggtcacg aagggcaagc gctatcgctt ccgcctgggtg	600
	tcgctgtcat gcgaccgaa ttacacgttc agcattgatg gtcactctct gaccgtcatc	660
50	gaggcggacg gcgtgaatct caagccccag actgtcgact ccatccagat cttccctgcc	720
	cagcggctact cgtttggtct caacgcagat caggatgtgg acaactactg gatccgtgcc	780
	cttccaact ccgggaccag gaacttcgac ggcggcggtta actccgcat ctttcgctac	840
55	gaagtgctg cggccgttga gccaccacg acccagacgc cgtcgacgca gcctttgggtg	900
	gagtcgccc tgaccactct cgaaggcacc gctgcgcccg gcaaccgac ccctggcgggt	960
	gtcgacctgg ctctcaacat ggttttcggc tttgccggcg gcaggttcac catcaacggc	1020
60	gcgagcttca ccccgccac cgtccccgtc ctctgcaga tcctgagcgg cgcgcagtcg	1080
	gcgcaggacc tcctcccctc tggaagtgta tactcgctcc ctgcgaacgc ggacattgag	1140
65	atctccctcc ccgccacctc cgccgcccc ggcttcccgc accccttcca cttgcacggg	1200
	cacaccttcg ccgtcgtgcg cagcgcggc tcgtcgacgt acaactacgc gaaccggctc	1260



## ES 2 370 216 A1

```

taccgcgacg tcgtcaacac gggctcggcc ggggacaacg tcacgatccg gttcaggacg      1320
gacaaccccc gcccggtggtt cctccactgc cacatcgact tccaccttga ggctgggttc      1380
5  acggtcgtca tggccgagga cattcccgac gtcgccgcta cgaacccggg cccgcaagca      1440
   tggtcggatc tgtgccccgac ctatgatgcg ctctcgctg acgaccag      1488

10 <210> 3
   <211> 585
   <212> PRT
15 <213> Secuencia Artificial

   <220>
   <221> MISC_FEATURE
20 <222> (1)..(585)
   <223> Secuencia modificada del péptido señal de Saccharomyces cerevisiae seguida de la
       lacasa del basidiomiceto PM1.

25 <400> 3

   Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
   1           5           10           15
30   Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
       20           25           30
35   Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
       35           40           45
40   Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
       50           55           60
45   Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
       65           70           75           80
50   Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala Ser Ile Gly Pro Val Ala Asp
       85           90           95
55   Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser Arg Gln
       100          105          110
60   Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr Gly Asn
       115          120
65   Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr Asn His
       130          135          140
70   Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln His
       145          150          155          160
75   Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile
       165          170          175

```

## ES 2 370 216 A1

Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala  
 180 185 190  
 5 Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly  
 195 200 205  
 10 Leu Arg Gly Pro Ile Val Val Tyr Asp Pro Gln Asp Pro His Lys Ser  
 210 215 220  
 15 Leu Tyr Asp Val Asp Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala Asp Trp  
 225 230 235 240  
 20 Tyr His Leu Ala Ala Lys Val Gly Pro Ala Ala Pro Thr Ala Asp Ala  
 245 250 255  
 25 Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Ser Ile Asn Thr Leu Asn Ala Asp  
 260 265 270  
 30 Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Lys Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu  
 275 280 285  
 35 Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp Gly His  
 290 295 300  
 40 Ser Leu Thr Val Ile Glu Ala Asp Gly Val Asn Leu Lys Pro Gln Thr  
 305 310 315 320  
 45 Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Pro Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu  
 325 330 335  
 50 Asn Ala Asp Gln Asp Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Leu Pro Asn  
 340 345 350  
 55 Ser Gly Thr Arg Asn Phe Asp Gly Gly Val Asn Ser Ala Ile Leu Arg  
 355 360 365  
 60 Tyr Glu Gly Ala Ala Pro Val Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr Pro Ser  
 370 375 380  
 65 Thr Gln Pro Leu Val Glu Ser Ala Leu Thr Thr Leu Glu Gly Thr Ala  
 385 390 395 400  
 Ala Pro Gly Asn Pro Thr Pro Gly Gly Val Asp Leu Ala Leu Asn Met  
 405 410 415  
 Ala Phe Gly Phe Ala Gly Gly Arg Phe Thr Ile Asn Gly Ala Ser Phe  
 420 425 430  
 Thr Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln  
 435 440 445

## ES 2 370 216 A1

Ser Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Ser Leu Pro Ala  
 450 455 460

5

Asn Ala Asp Ile Glu Ile Ser Leu Pro Ala Thr Ser Ala Ala Pro Gly  
 465 470 475 480

10

Phe Pro His Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val Val Arg  
 485 490 495

15

Ser Ala Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Tyr Ala Asn Pro Val Tyr Arg Asp  
 500 505 510

20

Val Val Asn Thr Gly Ser Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg  
 515 520 525

25

Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His  
 530 535 540

30

Ala Ala Thr Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr  
 545 550 555 560

35

Tyr Asp Ala Leu Ser Pro Asp Asp Gln  
 565 570 575 580 585

<210> 4  
 <211> 1755  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1755)  
 <223> Secuencia modificada derivada de la secuencia que codifica para el péptido señal de *Saccharomyces cerevisiae*  
 y de la que codifica para la lacasa del basidiomiceto PM1.

40

50

atgagatttc cttcaatttt tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60  
 ccagtcaaaa ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggc 120  
 55 tactcagatt tagaaggggg tttcgatggt gctgttttgc ctttttcaa cagcacaagt 180  
 aacggattat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240  
 tctctcgaga aaagagagac tgaagctagc attgggcccag tcgcagacct caccatctcc 300  
 60 aacggtgctg tcagtcccga tggtttctct cggcaggcca tcctgggtcaa cgacgtcttc 360  
 cccagtcccc tcattacggg gaacaagggt gatcgtttcc aactcaatgt catcgacaac 420  
 atgaccaacc acaccatggt gaagtccacc agtatccatt ggcacggctt cttccagcac 480  
 65 ggcaccaact gggccgacgg ccccgcttc gtgaaccagt gcccatttc taccgggcat 540

## ES 2 370 216 A1

```

gcgttccttt acgacttcca ggtccctgac caagctggta ctttctggta ccacagtcac      600
ttgtccactc aatactgtga cggctctcagg ggtccgattg ttgtctatga ccctcaagat      660
5  ccccaacaaga gccttttacga tgttgatgac gactccactg taatcactct cgcggtattgg      720
taccacttgg ctgccaaagt cggcccggcg gccccgactg ccgatgctac tcttatcaac      780
ggcctcggtc gcagcatcaa cacgctcaac gccgatttgg ctgtcatcac ggtcacgaag      840
10 ggcaagcgct atcgcttccg cctgggtgctg ctgtcatgcg acccgaatta cacgttcagc      900
attgatggtc actctctgac cgatcatcgag gcggacggcg tgaatctcaa gccccagact      960
15 gtcgactcca tccagatctt ccctgccag cggtaactcg ttgtgctcaa cgagatcag      1020
gatgtggaca actactggat ccgtgccctt cccaactccg ggaccaggaa cttcgacggc      1080
ggcgtaact ccgccatcct tcgctacgaa ggtgctgcgc ccggtgagcc caccacgacc      1140
20 cagacgccgt cgacgcagcc tttgggtggag tccgccctga ccaactctga aggaccgct      1200
gcgcccggca acccgacccc tggcgggtgtc gacctggctc tcaacatggc tttcggcttt      1260
ggcggcggca ggttcaccat caacggcgcg agcttacc ccgccaccgt ccccgctctc      1320
25 ctgcagatcc tgagcggcgc gcagtcggcg caggacctc tcccctctgg aagtgtatac      1380
tcgctccctg cgaacgcgga cattgagatc tcctccccg ccacctccgc cgccccggc      1440
30 ttcccgacc ctttccactt gcacgggcac accttcgccg tcgtgcgcag cgccggctcg      1500
tcgacgtaca actacgcgaa cccgggtctac cgcgacgtcg tcaacacggg ctcgccccggg      1560
gacaacgtca cgatccggtt caggacggac aaccccgcc cgtggttcct ccaactgccac      1620
35 atcgacttcc accttgaggc tgggttcacg gtcgtcatgg ccgaggacat tcccgcgctc      1680
gccgctacga acccggtccc gcaagcatgg tcggatctgt gcccgaccta tgatgcgctc      1740
40 tcgcctgacg accag      1755

```

<210> 5

<211> 587

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

50 <221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(587)

<223> Secuencia modificada de la proteína de fusión formada por el péptido señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la lacasa del basidiomiceto PM1.

55 <400> 5

```

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1           5           10           15
60 Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
           20           25           30
65 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
           35           40           45

```

## ES 2 370 216 A1

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

## ES 2 370 216 A1

Gln Thr Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Pro Ala Gln Arg Tyr Ser Phe  
 325 330 335  
 5  
 Val Leu Asn Ala Asp Gln Asp Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Leu  
 340 345  
 10  
 Pro Asn Ser Gly Thr Arg Asn Phe Asp Gly Gly Val Asn Ser Ala Ile  
 355 360 365  
 15  
 Leu Arg Tyr Glu Gly Ala Ala Pro Val Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr  
 370 375 380  
 20  
 Pro Ser Thr Gln Pro Leu Val Glu Ser Ala Leu Thr Thr Leu Glu Gly  
 385 390 395 400  
 25  
 Thr Ala Ala Pro Gly Asn Pro Thr Pro Gly Gly Val Asp Leu Ala Leu  
 405 410 415  
 30  
 Asn Met Ala Phe Gly Phe Ala Gly Gly Arg Phe Thr Ile Asn Gly Ala  
 420 425 430  
 35  
 Ser Phe Thr Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly  
 435 440 445  
 40  
 Ala Gln Ser Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Ser Leu  
 450 455 460  
 45  
 Pro Ala Asn Ala Asp Ile Glu Ile Ser Leu Pro Ala Thr Ser Ala Ala  
 465 470 475 480  
 50  
 Pro Gly Phe Pro His Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val  
 485 490 495  
 55  
 Val Arg Ser Ala Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Tyr Ala Asn Pro Val Tyr  
 500 505 510 515  
 60  
 Arg Asp Val Val Asn Thr Gly Ser Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg  
 515 520 525  
 65  
 Phe Arg Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp  
 530 535 540  
 70  
 Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Thr Val Val Met Ala Glu Asp Ile Pro  
 545 550 555 560  
 75  
 Asp Val Ala Ala Thr Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys  
 565 570 575  
 80  
 Pro Thr Tyr Asp Ala Leu Ser Pro Asp Asp Gln  
 580 585

## ES 2 370 216 A1

<210> 6

<211> 1761

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (1)..(1761)

<223> Secuencia modificada derivada de la secuencia que codifica para el péptido señal de *Saccharomyces cerevisiae* y de la que codifica para la lacasa del basidiomiceto PM1.

15 <400> 6

	atgagatttc cttcaatfff tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct	60
20	ccagtcaaaa ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt	120
	tactcagatt tagaagggga tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat	180
	aacggattat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta	240
25	tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc	300
	atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtaacgac	360
	gtcttcccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc	420
30	gacaacatga ccaaccacac catggtgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc	480
	cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgccc gatttctacc	540
35	gggcatgctg tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctggtacttt ctggtaccac	600
	agtcacttgt ccaactcaata ctgtgacggc ctcaggggtc cgattggtgt ctatgaccct	660
	caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccaactgtaat cactctcgcg	720
40	gattgggtacc acttggctgc caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt	780
	atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggctgt catcacggtc	840
	acgaagggca agcgcctatcg cttccgcctg gtgtcgcgtg catgcgacc gaattacacg	900
45	ttcagcattg atggctactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc	960
	cagactgtcg actccatcca gatcttccct gcccagcggc actcgtttgt gctcaacgca	1020
50	gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc	1080
	gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaagggt ctgccccgt tgagcccacc	1140
	acgaccaga cgccgtcgac gcagcctttg gtggagtccg ccctgaccac tctcgaaggc	1200
55	accgctgcgc ccggcaaccc gaccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc	1260
	ggctttgccc gcggcagggt caccatcaac ggcgcgagct tcaccccgcc caccgtcccc	1320
60	gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt	1380
	gtatactcgc tccctgcgaa cgcggacatt gagatctccc tccccgccac ctccgccgcc	1440
	cccggcttcc cgcacccctt ccacttgac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc	1500
65	ggctcgtcga cgtacaacta cgcgaacccg gtctaccgcg acgtcgtcaa cacgggctcg	1560

## ES 2 370 216 A1

```

ccccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac      1620
tgccacatcg acttccacct tgaggctggg ttcacggtcg tcatggccga ggacattccc      1680
5  gacgtcgccg ctacgaaccc ggtcccgcaa gcatggtcgg atctgtgccc gacctatgat      1740
   gcgctctcgc ctgacgacca g                                             1761

10 <210> 7
   <211> 498
   <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial

15 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (1)..(498)
20 <223> Secuencia modificada de la secuencia de la lacasa del basidiomiceto PM1 con 2 aminoácidos extra en el
   extremo amino terminal.

   <400> 7

25   Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala
      1           5           10           15

30   Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val
      20           25           30

35   Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu
      35           40           45

40   Asn Val Ile Asp Asn Met Thr Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser
      50           55           60

45   Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly
      65           70           75           80

50   Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu
      85           90           95

55   Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser
      100          105          110

60   His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Val
      115          120          125

65   Tyr Asp Pro Gln Asp Pro His Lys Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp Asp
      130          135          140

70   Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala Asp Trp Tyr His Leu Ala Ala Lys Val
      145          150          155          160

75   Gly Pro Ala Ala Pro Thr Ala Asp Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly
      165          170          175

```



## ES 2 370 216 A1

	Arg	Ser	Ile	Asn 180	Thr	Leu	Asn	Ala	Asp 185	Leu	Ala	Val	Ile	Thr 190	Val	Thr
5	Lys	Gly	Lys 195	Arg	Tyr	Arg	Phe	Arg 200	Leu	Val	Ser	Leu	Ser 205	Cys	Asp	Pro
10	Asn	Tyr 210	Thr	Phe	Ser	Ile	Asp 215	Gly	His	Ser	Leu	Thr 220	Val	Ile	Glu	Ala
15	Asp 225	Gly	Val	Asn	Leu	Lys 230	Pro	Gln	Thr	Val	Asp 235	Ser	Ile	Gln	Ile	Phe 240
20	Pro	Ala	Gln	Arg	Tyr 245	Ser	Phe	Val	Leu	Asn 250	Ala	Asp	Gln	Asp	Val 255	Asp
25	Asn	Tyr	Trp	Ile 260	Arg	Ala	Leu	Pro	Asn 265	Ser	Gly	Thr	Arg	Asn 270	Phe	Asp
30	Gly	Gly	Val 275	Asn	Ser	Ala	Ile	Leu 280	Arg	Tyr	Glu	Gly	Ala 285	Ala	Pro	Val
35	Glu	Pro 290	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr 295	Pro	Ser	Thr	Gln	Pro 300	Leu	Val	Glu	Ser
40	Ala 305	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu 310	Gly	Thr	Ala	Ala	Pro 315	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro 320
45	Gly	Gly	Val	Asp	Leu 325	Ala	Leu	Asn	Met	Ala 330	Phe	Gly	Phe	Ala	Gly 335	Gly
50	Arg	Phe	Thr	Ile 340	Asn	Gly	Ala	Ser	Phe 345	Thr	Pro	Pro	Thr	Val 350	Pro	Val
55	Leu	Leu	Gln 355	Ile	Leu	Ser	Gly	Ala 360	Gln	Ser	Ala	Gln	Asp 365	Leu	Leu	Pro
60	Ser	Gly 370	Ser	Val	Tyr	Ser	Leu 375	Pro	Ala	Asn	Ala	Asp 380	Ile	Glu	Ile	Ser
65	Leu 385	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala 390	Ala	Pro	Gly	Phe	Pro 395	His	Pro	Phe	His	Leu 400
70	His	Gly	His	Thr	Phe 405	Ala	Val	Val	Arg	Ser 410	Ala	Gly	Ser	Ser	Thr 415	Tyr
75	Asn	Tyr	Ala	Asn 420	Pro	Val	Tyr	Arg	Asp 425	Val	Val	Asn	Thr	Gly 430	Ser	Pro
80	Gly	Asp	Asn 435	Val	Thr	Ile	Arg	Phe 440	Arg	Thr	Asp	Asn	Pro 445	Gly	Pro	Trp

## ES 2 370 216 A1

Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Thr Val  
 450 455 460

5 Val Met Ala Glu Asp Ile Pro Asp Val Ala Ala Thr Asn Pro Val Pro  
 465 470 475 480

10 Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr Asp Ala Leu Ser Pro Asp  
 485 490 495

Asp Gln

15 <210> 8  
 <211> 502  
 <212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

25 <222> (1)..(502)  
 <223> Secuencia modificada a partir de la lacasa del basidiomiceto PM1 con una cola de 6 aminoácidos en el extremo amino terminal.

30 <400> 8

Gln Thr Gln Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val Ala Asp Leu Thr Ile  
 1 5 10 15

35 Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser Arg Gln Ala Ile Leu  
 20 25 30

40 Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp  
 35 40 45

45 Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr Asn His Thr Met Leu  
 50 55 60

Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln His Gly Thr Asn  
 65 70 75 80

50 Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ser Thr Gly  
 85 90 95

55 His Ala Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe  
 100 105 110

60 Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly  
 115 120 125

Pro Ile Val Val Tyr Asp Pro Gln Asp Pro His Lys Ser Leu Tyr Asp  
 130 135 140

65 Val Asp Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala Asp Trp Tyr His Leu  
 145 150 155 160

# ES 2 370 216 A1

Ala Ala Lys Val Gly Pro Ala Ala Pro Thr Ala Asp Ala Thr Leu Ile  
165 170 175

5 Asn Gly Leu Gly Arg Ser Ile Asn Thr Leu Asn Ala Asp Leu Ala Val  
180 185 190

10 Ile Thr Val Thr Lys Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu  
195 200 205

15 Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp Gly His Ser Leu Thr  
210 215 220

20 Val Ile Glu Ala Asp Gly Val Asn Leu Lys Pro Gln Thr Val Asp Ser  
225 230 235 240

Ile Gln Ile Phe Pro Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Asn Ala Asp  
245 250 255

25 Gln Asp Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Leu Pro Asn Ser Gly Thr  
260 265 270

30 Arg Asn Phe Asp Gly Gly Val Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Glu Gly  
275 280 285

Ala Ala Pro Val Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr Pro Ser Thr Gln Pro  
290 295 300

35 Leu Val Glu Ser Ala Leu Thr Thr Leu Glu Gly Thr Ala Ala Pro Gly  
305 310 315 320

40 Asn Pro Thr Pro Gly Gly Val Asp Leu Ala Leu Asn Met Ala Phe Gly  
325 330 335

45 Phe Ala Gly Gly Arg Phe Thr Ile Asn Gly Ala Ser Phe Thr Pro Pro  
340 345 350

50 Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Ser Ala Gln  
355 360 365

55 Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Ser Leu Pro Ala Asn Ala Asp  
370 375 380

Ile Glu Ile Ser Leu Pro Ala Thr Ser Ala Ala Pro Gly Phe Pro His  
385 390 395 400

60 Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
405 410 415

65 Ser Ser Thr Tyr Asn Tyr Ala Asn Pro Val Tyr Arg Asp Val Val Asn  
420 425 430

# ES 2 370 216 A1

Thr Gly Ser Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg Thr Asp Asn  
                   435                                  440                                  445  
 5 Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala  
           450                                  455                                  460  
 10 Gly Phe Thr Val Val Met Ala Glu Asp Ile Pro Asp Val Ala Ala Thr  
    465                                  470                                  475                                  480  
 15 Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr Asp Ala  
                                   485                                  490                                  495  
 20 Leu Ser Pro Asp Asp Gln  
                                   500

20 <210> 9

<211> 89

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> SIGNAL

30 <222> (1)..(89)

<223> Secuencia modificada del péptido señal de *Saccharomyces cerevisiae*.

35 <400> 9

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser  
 1                  5                                  10                                  15  
 40 Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln  
                   20                                  25                                  30  
 45 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe  
           35                                  40                                  45  
 50 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu  
           50                                  55                                  60  
 55 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val  
    65                                  70                                  75                                  80  
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala  
                                   85

60 <210> 10

<211> 267

<212> DNA

65 <213> Secuencia Artificial

## ES 2 370 216 A1

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(267)  
 5 <223> Secuencia modificada a partir de la secuencia que codifica para el péptido señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

<400> 10  
 10       atgagatttc cttcaatfff tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct       60  
           ccagtcaaaa ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt       120  
 15       tactcagatt tagaagggga tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat       180  
           aacggattat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta       240  
           tctctcgaga aaagagagac tgaagct   267  
 20

<210> 11  
 <211> 67  
 25 <212> DNA  
     <213> Secuencia Artificial

<220>  
 30 <223> Cebador directo para la amplificación de la lacasa de PM1.

<400> 11  
           ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac tataggatcc ccaacatggc caagttccaa       60  
 35       tctctcc   67

<210> 12  
 <211> 68  
 40 <212> DNA  
     <213> Secuencia Artificial

<220>  
 45 <223> Cebador inverso para la amplificación de la lacasa de PM1.

<400> 12  
 50       gacataacta attacatgat gcggccctct agatgcatgc tcgagctcac tggtcgctcag       60  
           gcgagagc   68

<210> 13  
 55 <211> 23  
     <212> DNA  
     <213> Secuencia Artificial

<220>  
 60 <223> Cebador directo para la amplificación de la lacasa de PM1 sin el péptido señal.

<400> 13  
 65       gcgaattcag cattgggcca gtc   23

## ES 2 370 216 A1

	<210> 14		
	<211> 33		
	<212> DNA		
5	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso para la amplificación de la lacasa de PM1 sin el péptido señal.		
10	<400> 14		
	<b>atggcggccg cttactggtc gtcaggcgag agc</b>		<b>33</b>
15	<210> 15		
	<211> 39		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador directo para la amplificación de la lacasa PM1 con el péptido señal del factor alfa.		
25	<400> 15		
	<b>ataggatcca tgagatttcc ttcaattttt actgctgtt</b>		<b>39</b>
	<210> 16		
30	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador inverso para la amplificación de la lacasa de PM1 con el péptido señal del factor alfa.		
40	<400> 16		
	<b>tcaatgtccg cgttcgcagg ga</b>		<b>22</b>
	<210> 17		
45	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador directo para la amplificación de la primera generación.		
	<400> 17		
55	<b>cctctatact ttaacgtcaa gg</b>		<b>22</b>
	<210> 18		
	<211> 20		
60	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
65	<223> Cebador inverso para la amplificación de la primera generación.		

## ES 2 370 216 A1

	<b>&lt;400&gt; 18</b>			
		<b>gggagggcgt gaatgtaagc</b>		20
5	<b>&lt;210&gt; 19</b>			
	<b>&lt;211&gt; 43</b>			
	<b>&lt;212&gt; DNA</b>			
10	<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>			
	<b>&lt;220&gt;</b>			
	<b>&lt;223&gt; Cebador inverso para la PCR1 para el mutante revertido S454F.</b>			
15	<b>&lt;400&gt; 19</b>			
		<b>cgtdaaccca gcctcaaggt ggaagtcgat gtggcagtgg agg</b>		43
20	<b>&lt;210&gt; 20</b>			
	<b>&lt;211&gt; 43</b>			
	<b>&lt;212&gt; DNA</b>			
	<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>			
25	<b>&lt;220&gt;</b>			
	<b>&lt;223&gt; Cebador directo para la PCR2 del mutante revertido S454F.</b>			
30	<b>&lt;400&gt; 20</b>			
		<b>cctccactgc cacatcgact tccaccttga ggctgggttc acg</b>		43
35	<b>&lt;210&gt; 21</b>			
	<b>&lt;211&gt; 39</b>			
	<b>&lt;212&gt; DNA</b>			
	<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>			
40	<b>&lt;220&gt;</b>			
	<b>&lt;223&gt; Cebador inverso para la PCR1 del mutante S224G.</b>			
45	<b>&lt;400&gt; 21</b>			
		<b>gtctggggct tgagattcac gccgtccgcc tcgatgacg</b>		39
50	<b>&lt;210&gt; 22</b>			
	<b>&lt;211&gt; 39</b>			
	<b>&lt;212&gt; DNA</b>			
	<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>			
55	<b>&lt;220&gt;</b>			
	<b>&lt;223&gt; Cebador directo para la PCR2 del mutante S224G.</b>			
60	<b>&lt;400&gt; 22</b>			
		<b>cgatcatcgag gcggacggcg tgaatctcaa gccccagac</b>		39
65	<b>&lt;210&gt; 23</b>			
	<b>&lt;211&gt; 37</b>			
	<b>&lt;212&gt; DNA</b>			
	<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>			

## ES 2 370 216 A1

	<220>	
	<223> Cebador inverso para la PCR1 del mutante D281E.	
5	<400> 23	
	<b>gctcaacggg cgcagcacct tcgtagcgaa ggatggc</b>	37
	<210> 24	
10	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador directo para la PCR2 del mutante D281E.	
	<400> 24	
20	<b>gccatccttc gctacgaagg tgctgcgccc gttgagc</b>	37
	<210> 25	
	<211> 39	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador inverso para la PCR1 del mutante P393H.	
	<400> 25	
35	<b>gcaagtggaa ggggtggtgg aagccggggg cggcggagg</b>	39
	<210> 26	
	<211> 39	
40	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador directo para la PCR2 del mutante P393H.	
	<400> 26	
50	<b>cctccgccgc ccccggttc caccaccct tccacttgc</b>	39
	<210> 27	
	<211> 19	
55	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador directo para la PCR1 del mutante Aalfa9D.	
	<400> 27	
	<b>ggtaattaat cagcgaagc</b>	19
65	<210> 28	
	<211> 38	



## ES 2 370 216 A1

<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Cebador inverso para la PCR1 del mutante Aalfa9D.

<400> 28

10 **gaggatgctg cgaataaatc atcagtaaaa attgaagg** 38

<210> 29  
<211> 38

15 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
20 <223> Cebador directo para la PCR2 del mutante Aalfa9D.

<400> 29

25 **ccttcaattt ttactgatga tttattcgca gcatcctc** 38

<210> 30  
<211> 38

30 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
35 <223> Cebador inverso para la PCR1 del mutante Aalfa9D-Dalfa10V.

<400> 30

40 **gaggatgctg cgaaaacatc atcagtaaaa attgaagg** 38

<210> 31  
<211> 38  
<212> DNA

45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
50 <223> Cebador directo para la PCR2 del mutante Aalfa9D-Dalfa10v.

<400> 31

**ccttcaattt ttactgatgt tttattcgca gcatcctc** 38

55 <210> 32  
<211> 38  
<212> DNA

60 <213> Secuencia Artificial

<220>  
65 <223> Cebador inverso para la PCR1 del mutante Dalfa10v.

ES 2 370 216 A1

<400> 32

gaggatgctg cgaaaacatc atcagtaaaa attgaagg

38

5

<210> 33

<211> 38

<212> DNA

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Cebador directo para la PCR2 del mutante Dalfa10v.

<400> 33

ccttcaattt ttactgatgt tttattcgca gcacccctc

38

20

<210> 34

<211> 78

25

<212> PRT

<213> *Basidiomycete* PM1

<400> 34

30

Ile Glu Ile Ser Leu Pro Ala Thr Ser Ala Ala Pro Gly Phe Pro His  
1 5 10 15

35

Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
20 25 30

40

Ser Ser Thr Tyr Asn Tyr Ala Asn Pro Val Tyr Arg Asp Val Val Ser  
35 40 45

45

Thr Gly Ser Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg Thr Asp Asn  
50 55 60

50

Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
65 70 75

<210> 35

<211> 78

<212> PRT

55

<213> *Trametes* C30

<400> 35

60

Ile Glu Ile Ser Leu Pro Ala Thr Ser Ala Ala Pro Gly Phe Pro His  
1 5 10 15

65

Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
20 25 30

ES 2 370 216 A1

Ser Ser Thr Tyr Asn Tyr Ala Asn Pro Val Tyr Arg Asp Val Val Ser  
 35 40 45

5

Thr Gly Ser Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg Thr Asp Asn  
 50 55 60

10

Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
 65 70 75

<210> 36

15 <211> 78

<212> PRT

<213> *Trametes trogii*

20 <400> 36

Ile Glu Ile Ser Leu Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Gly Phe Pro His  
 1 5 10 15

25

Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
 20 25 30

30

Ser Ser Thr Tyr Asn Tyr Glu Asn Pro Val Tyr Arg Asp Val Val Ser  
 35 40 45

35

Thr Gly Ser Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg Thr Asp Asn  
 50 55 60

40

Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
 65 70 75

<210> 37

<211> 78

<212> PRT

45

<213> *Coriolopsis gallica*

<400> 37

50

Ile Glu Ile Ser Leu Pro Ala Thr Thr Ala Ala Pro Gly Phe Pro His  
 1 5 10 15

55

Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
 20 25 30

60

Ser Ser Thr Tyr Asn Tyr Glu Asn Pro Val Tyr Arg Asp Val Val Ser  
 35 40 45

65

Thr Gly Ser Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg Thr Asp Asn  
 50 55 60

Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
 65 70 75

## ES 2 370 216 A1

<210> 38

<211> 78

<212> PRT

5 <213> *Coriolopsis rigida*

<400> 38

10 Ile Glu Ile Ser Leu Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Gly Phe Pro His  
 1 5 10 15  
 15 Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val Val Arg Ser Ser Gly  
 20 25 30  
 15 Gln Gln Thr Tyr Asn Tyr Ala Asn Pro Val Tyr Arg Asp Val Val Ser  
 35 40 45  
 20 Thr Gly Ser Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg Thr Asp Asn  
 50 55 60  
 25 Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
 65 70 75

<210> 39

<211> 80

<212> PRT

30 <213> *Trametes sp. AH28-2*

<400> 39

35 Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Gly Ala Pro His  
 1 5 10 15  
 40 Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
 20 25 30  
 45 Ser Thr Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser  
 35 40 45  
 45 Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg Thr  
 50 55 60  
 50 Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
 65 70 75 80

<210> 40

<211> 80

<212> PRT

55 <213> *Trametes versicolor*

<400> 40

60 Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Gly Ala Pro His  
 1 5 10 15  
 65 Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
 20 25 30

ES 2 370 216 A1

Ser Thr Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser  
 35 40 45

5 Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg Thr  
 50 55 60

10 Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
 65 70 75 80

<210> 41

15 <211> 80

<212> PRT

<213> *Trametes pubescens*

20 <400> 41

Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Thr Ala Ala Pro Gly Ala Pro His  
 1 5 10 15

25 Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
 20 25 30

30 Ser Thr Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser  
 35 40 45

35 Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg Thr  
 50 55 60

40 Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
 65 70 75 80

<210> 42

<211> 80

<212> PRT

45 <213> *Trametes hirsuta*

<400> 42

50 Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Gly Ala Pro His  
 1 5 10 15

55 Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
 20 25 30

60 Ser Thr Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser  
 35 40 45

65 Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Asp Thr  
 50 55 60

Asn Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
 65 70 75 80

## ES 2 370 216 A1

<210> 43

<211> 80

<212> PRT

5 <213> *Trametes* sp. 1-62

<400> 43

```

10      Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Gly Val Pro His
       1          5          10
      Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
15      20
      Ser Thr Glu Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser
       35          40          45
20      Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr
       50          55          60
25      Asn Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu
       65          70          75          80

```

<210> 44

<211> 78

30 <212> PRT

<213> *Pycnoporus coccineus*

<400> 44

```

35      Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Ala Asn Ala Pro Gly Ala Pro His
       1          5          10          15
40      Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
       20          25          30
45      Ser Ser Glu Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser
       35          40          45
50      Thr Gly Thr Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr Asn Asn
       50          55          60
55      Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu
       65          70          75

```

<210> 45

55 <211> 78

<212> PRT

<213> *Pycnoporus sanguineus*

60 <400> 45

```

65      Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Ala Asn Ala Pro Gly Ala Pro His
       1          5          10          15
      Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
       20          25          30

```

ES 2 370 216 A1

Ser Ser Glu Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser  
35 40 45

5 Thr Gly Thr Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Glu Thr Asn Asn  
50 55 60

10 Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
65 70 75

<210> 46  
<211> 78  
15 <212> PRT  
<213> *Pycnoporus cinnabarinus*

<400> 46  
20 Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Ala Asn Ala Pro Gly Phe Pro His  
1 5 10 15

25 Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
20 25 30

30 Ser Ser Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser  
35 40 45

35 Thr Gly Gln Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Glu Thr Asn Asn  
50 55 60

40 Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
65 70 75

<210> 47  
40 <211> 80  
<212> PRT  
<213> *Lentinus triginus*

45 <400> 47  
50 Ile Glu Ile Thr Phe Pro Ala Thr Thr Ala Ala Pro Gly Ala Pro His  
1 5 10 15

55 Pro Phe His Leu His Gly His Val Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly  
20 25 30

60 Ser Thr Ser Tyr Asn Tyr Asp Asp Pro Val Trp Arg Asp Val Val Ser  
35 40 45

65 Thr Gly Thr Pro Gln Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr  
50 55 60

Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu  
65 70 75 80



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030723

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.05.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2009127702 A2 (NOVOZYMES A/S) 22.10.2009, todo el documento.	1-23
A	WO 9838287 A1 (NOVO NORDISK A/S) 03.09.1998, todo el documento.	1-23
A	WO 9533836 A1 (NOVO NORDISK BIOTECH, INC.; NOVO NORDISK A/S) 14.12.1995, todo el documento.	1-23
A	FESTA GIOVANNA, et al. "Development of new laccases by directed evolution: functional and computational analyses" PROTEINS (10 Enero 2008) Vol. 72, N.º.1, páginas 25-34; DOI: 10.1002/prot.21889; ISSN: 1097-0134; todo el documento.	1-23
A	ROODVELDT CINTIA et al. "Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability" Current Opinion in Structural Biology (13 Enero 2005) Vol. 15, N.º. 1, páginas 50-56; DOI: 10.1016/j.sbi.2005.01.001; ISSN 0959-440X; todo el documento.	1-23

#### 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  
21.09.2011

Examinador  
M. M. García Coca

Página  
1/4



CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N9/02** (2006.01)

**C12N15/52** (2006.01)

**C12N15/62** (2006.01)

**C12N15/81** (2006.01)

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.09.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como 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	WO 2009127702 A2 (NOVOZYMES A/S)	22.10.2009
D02	WO 9838287 A1 (NOVO NORDISK A/S)	03.09.1998
D03	WO 9533836 A1 (NOVO NORDISK BIOTECH, INC.; NOVO NORDISK A/S)	14.12.1995
D04	FESTA GIOVANNA, et al. "Development of new laccases by directed evolution: functional and computational analyses" PROTEINS (10 Enero 2008) Vol. 72, N°. 1, páginas 25-34; DOI: 10.1002/prot.21889; ISSN: 1097-0134.	
D05	ROODVELDT CINTIA et al. "Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability" Current Opinion in Structural Biology (13 Enero 2005) Vol. 15, N°. 1, páginas 50-56; DOI: 10.1016/j.sbi.2005.01.001; ISSN 0959-440X.	

**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**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-23, es un polinucleótido que codifica para una variante de la lacasa del basidiomicete PM1, la propia lacasa modificada (con un mayor potencial redox), la construcción génica, la célula hospedadora y el cultivo celular que comprenden dicho polinucleótido. También es objeto de la invención el método de obtención de la lacasa y el uso tanto de los polinucleótidos, de la célula hospedadora y del cultivo, para la obtención de la lacasa.

**Novedad y Actividad Inventiva**

Los documentos D01, D02 y D03 divulgan lacasas modificadas que tienen mejoradas sus propiedades funcionales. En el documento D01 se utilizan distintos métodos para obtener las propiedades deseadas, basados en la sustitución de determinados aminoácidos. En el documento D02 el método para el diseño de dichas enzimas se basa en el análisis de la estructura tridimensional de la enzima y posteriormente identificar un aminoácido o una parte estructural de la enzima que al ser modificado, altere sus características funcionales, mientras que en el documento D03 el método utilizado se basa en el cultivo de la célula huésped modificada con la construcción génica en presencia de cobre.

Los documentos D04 y D05 divulgan el desarrollo de nuevas lacasas por el método de evolución dirigida, identificándose unas variantes mutagénicas con propiedades catalíticas mejoradas respecto a las variantes nativas.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-23, ya que ningún documento anterioriza la lacasa de alto potencial redox de la invención. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-23 es con referencia a los documentos D01-D05 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).