

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 605**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/02** (2006.01) **C07K 1/00** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**C12Q 1/00** (2006.01)  
**C12Q 1/34** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12P 21/06** (2006.01)  
**C12P 21/04** (2006.01)  
**A61K 38/44** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07837576 .3**  
96 Fecha de presentación: **31.08.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2059587**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.2009**

54 Título: **Lacasas para bioblanqueo de pulpa**

30 Prioridad:  
**01.09.2006 US 824402 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2012**

73 Titular/es:  
**VERENIUM CORPORATION  
4955 DIRECTORS PLACE  
SAN DIEGO, CA 92121, US y  
BASF SE**

72 Inventor/es:  
**KEROVUO, Janne Samuli;  
HAREMZA, Sylke;  
KOCH, Oliver;  
HABICHER, Tilo;  
ROBERTSON, Dan;  
DESANTIS, Grace;  
MCCANN, Ryan y  
LUGINBUHL, Peter**

74 Agente/Representante:  
**Arias Sanz, Juan**

ES 2 380 605 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Lacasas para bioblanqueo de pulpa

### Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud U.S. Provisional N° 60/824,402, titulada "Lacasas para bioblanqueo de pulpa".

### Partes del acuerdo de investigación conjunta

La materia divulgada en este documento está sujeta a un acuerdo de investigación conjunta entre Verenum Corporation y BASF Aktiengesellschaft.

### Referencia a listado de secuencias, tabla o programa de listado de secuencias

10 La presente solicitud se presenta con un listado de secuencia en formato electrónico. El listado de secuencias está provisto como un archivo titulado DIVERSA.014VPC.TXT, creado el 30 de agosto de 2007, el cual tiene un tamaño de 15,7 KB. La información en formato electrónico del listado de secuencias se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

## 15 Antecedentes de la invención

### **Campo de la invención**

20 La invención se refiere al campo de la bioquímica. En el presente documento se proporcionan enzimas lacasas aisladas y ácidos nucleicos que las codifican. También se proporcionan mediadores para las reacciones de las lacasas. En el presente documento también se proporcionan procedimientos para usar lacasas para oxidar ligninas y otros compuestos fenólicos y aromáticos, tal como para decoloración por bioblanqueo de pulpa de la madera en condiciones de temperatura alta y pH para facilitar una reducción sustancial en el uso de productos químicos blanqueantes, así como para el tratamiento de fibras.

### Descripción de la técnica relacionada

25 La fibra de madera es una estructura de múltiples capas que consiste principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina. La lignina es un polímero complejo insoluble de compuestos fenólicos. Hasta el 90 % de la lignina se solubiliza y elimina durante el proceso de pulpeo. La lignina restante es una causa principal de color residual en la pulpa y debe eliminarse mediante degradación oxidativa o blanqueo. El procedimiento de blanqueo requiere aplicación de productos químicos duros y condiciones de energía intensa. El uso de enzimas que ayudan al procedimiento de blanqueo puede permitir el uso reducido de productos químicos de blanqueo, mayor eficiencia energética de las plantas de pulpeo y obtener beneficios ambientales debido a las menores corrientes de residuos químicos.

30 Los hongos filamentosos pueden degradar la lignina con eficacia mediante la acción de varias clases de enzimas secretadas. De estas, las lacasas han atraído un considerable interés para aplicación en el bioblanqueo de la pulpa. Las lacasas son oxidasas de multicobre que acoplan la oxidación directa de compuestos aromáticos con la reducción del oxígeno molecular en agua. Durante la degradación de la lignina, se piensa que las lacasas actúan sobre pequeños fragmentos de lignina fenólica que, después, reaccionan con el polímero lignina y dan como resultado su degradación. Como alternativa, se pueden proporcionar compuestos mediadores artificiales para acelerar el procedimiento de deslignificación.

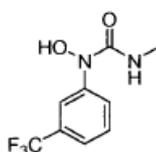
40 El proceso de pulpeo de la madera puede implicar condiciones alcalinas. No obstante, la mayoría de las lacasas conocidas son enzimas ácidas. Solo se han notificado unas pocas lacasas neutras o alcalinas; una lacasa de *Rhus vernificera* tiene un  $pH_{opt}$  de 9 y una lacasa de *Melanocarpus albomyces* tiene un  $pH_{opt}$  sobre sustratos fenólicos. No obstante, ambas lacasas solo son capaces de oxidar los mediadores de potencial redox relativamente bajo que no es probable que oxiden la lignina. Asimismo, es probable que las lacasas estén expuestas a temperaturas relativamente altas en la aplicación del bioblanqueo de la pulpa. Son deseables las enzimas lacasas que funcionan bien en condiciones de temperatura y pH altas de los procedimientos de pulpeo típicos.

45 Hernández y col. en Applied Microbiology and Biotechnology, Springer, Berlin, DE, vol 70, n° 2, Marzo de 2006, páginas 212-221 describen la producción, caracterización parcial y estudio espectrométrico de masas de la actividad lacasa extracelular de *Fusarium proliferatum*. Ruijssenaars y col. en Applied Microbiology and

Biotechnology, Springer Verlag, Berlin, DE, vol, 65, n° 2, 24 Febrero de 2004, páginas 177-182 describen una oxidasa multicobre clonada de *Bacillus holodurans* que exhibe actividad de lacasa alcalina. Sulistyaningdyah y col. En FEMS microbiology letters, vol, 230, n° 2, 30 de enero de 2004, páginas 209-214 describen la caracterización de la actividad de lacasa alcalina en el sobrenadante del cultivo de *Myrothecium verrucaria* 24G-4.

## 5 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido aislado, que comprende: Una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 4, en la que dicho polipéptido aislado comprende actividad lacasa, oxida la lignina en condiciones de pH superior o igual a 8 y conserva actividad lacasa durante más de al menos 5 minutos a una temperatura superior o igual a 60 °C tiene un pH reacción óptimo de  $\geq 8,0$  para la oxidación de siringaldazina (SGZ) a temperatura ambiente y/o tiene un pH de reacción óptimo de 8,0 para la oxidación de

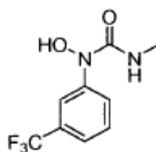


15 (Mediador 71) a temperatura ambiente.

Algunas realizaciones se refieren a variantes de la SEC ID N° 4 que tienen al menos una sustitución de aminoácido, en las que la posición de la al menos una sustitución en la SEC ID N° 4 se selecciona del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 162, 163, 164, 166, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 208, 210, 212, 213, 214, 215, 216, 218, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 351, 352, 353, 354, 452, 454, 470, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 540, 541, 542, 545, 546, 547, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 597, 598, 599, 603, 604, 605, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 616, 618, 619 y 620, o cualquier combinación de los mismos.

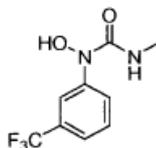
En algunas realizaciones, las variantes polipeptídicas de lacasa carecen de su péptido señal asociado, mientras que en otras realizaciones, los polipéptidos de lacasa o variantes polipeptídicas de lacasa incluyen una secuencia señal.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado, que comprende: una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% con el polinucleótido de la SEC ID N° 3, en la que dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene actividad lacasa que oxida la lignina en condiciones de pH superior o igual a 8 y conserva actividad lacasa durante al menos aproximadamente 5 minutos a una temperatura superior o igual a 60 °C tiene un pH de reacción óptimo  $\text{pH} \geq 8,0$  para la oxidación de siringaldazina (SGZ) a temperatura ambiente y/o tiene un pH de reacción óptimo de 8,0 para la oxidación de



35 (Mediador 71) a temperatura ambiente.

En el presente documento también se proporcionan procedimientos para mediar la oxidación de un sustrato fenólico o aromático como se describe en la reivindicación 10. En algunas realizaciones, el mediador es



5 En algunas realizaciones,, el sustrato fenólico o aromático también está en contacto con un mediador seleccionado del grupo que consiste en ácido violúrico; 2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxiftalimida, 3-Hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); y ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB); o cualquier combinación de los mismos.

10 En el presente documento también se proporcionan procedimientos de deslignificar una composición que comprende lignina, que comprende poner en contacto dicho sustrato fenólico con el polipéptido aislado de la reivindicación 1.

15 La invención también proporciona un procedimiento de oxidación de una composición que comprende una fibra, que comprende poner en contacto dicha composición con el polipéptido aislado de la reivindicación 1.

La invención también proporciona un procedimiento de blanqueo de una composición que comprende pulpa o papel, que comprende poner en contacto la composición con el polipéptido aislado de la reivindicación 1.

#### **Breve descripción de las figuras**

20 La **Figura 1** es un gráfico que muestra el consumo de oxígeno (nmol/ml) en el tiempo, indicativo de la oxidación del Mediador 71 a pH 8 por la lacasa de *Trametes versicolor* medido como se describe en el Ejemplo 5.

La **Figura 2** es un gráfico que muestra el consumo de oxígeno (nmol/ml) en el tiempo, indicativo de la oxidación del Mediador 71 a pH 8 por la lacasa BD22449 medido como se describe en el Ejemplo 5.

La **Figura 3** es un gráfico que muestra el consumo de oxígeno (nmol/ml) en el tiempo, indicativo de la oxidación del Mediador 71 a pH 8 por la lacasa BD22865 medido como se describe en el Ejemplo 5.

25 La **Figura 4** es un gráfico que muestra la actividad relativa de *Trametes versicolor* (triángulos), BD22449 (rombos) y BD22865 (cuadrados) sobre el Mediador 71 a los pH indicados, a temperatura ambiente, medida como se describe en el Ejemplo 5.

30 Las **Figuras 5A-5C** son gráficos que muestran la actividad residual de *Trametes versicolor* (triángulos), BD22449 (rombos) y BD22865 (cuadrados) sobre 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) tras tratamiento durante los tiempos indicados a 50 °C (Figura 5A), a 60 °C (Figura 5B) y a 70 °C (Figura 5C), medida como se describe en el Ejemplo 6.

La **Figura 6** muestra la cinética de la oxidación del Mediador 71 por la lacasa BD22449 (cuadrados) y por la lacasa BD22865 a pH 8, a temperatura ambiente, medida como se describe en el Ejemplo 7.

#### **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

35 En el presente documento se proporcionan lacasas, polinucleótidos que codifican estas enzimas, mediadores para la lacasa u otras reacciones de oxidación y procedimientos de uso de las lacasas y mediadores.

40 Las lacasas catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y otros compuestos aromáticos con una reducción concomitante del oxígeno en agua (Malmström, B. G, "Early and more recent history in the research on multi-copper oxidases" en Multi-copper oxidases, ed Messerschmidt, A. (1997), World Scientific, Singapore). Como se usa en el presente documento, el término "lacasa" abarca cualquier polipéptido o enzima que tiene actividad lacasa, por ejemplo la oxidación y/o despolimerización de la lignina y/o la oxidación de 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxiftalimida, 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina;

1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; siringaldazina, antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolina-6-sulfónico) (ABTS), dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); y ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB); ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO), dimetoxifenol o ácido dihidroxifumárico (DHF) o compuestos equivalentes..

### Polipéptidos

Algunas realizaciones proporcionan polipéptidos que tienen actividad lacasa, es decir "polipéptidos de lacasa", tales como polipéptidos que comprenden polipéptidos de la SEC ID N° 4, o variantes de los mismos, es decir variantes de lacasa. "Variante polipeptídica de lacasa" significa un polipéptido de lacasa activa como se ha definido anteriormente o más adelante que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80 % con una secuencia polipeptídica de lacasa de longitud completa como se divulga en el presente documento (p. ej., SEC ID N° 4 o variantes de la misma) o cualquier fragmento de una secuencia polipeptídica de lacasa como se divulga en el presente documento. Dichas variantes polipeptídicas de la lacasa incluyen, por ejemplo, polipéptidos de lacasa en los que se añaden, o delecionan, uno o más residuos de aminoácidos, en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos de lacasa de longitud completa. Habitualmente, una variante polipeptídica de la lacasa tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 81 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 82 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 83 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 84 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 85 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 86 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 87 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 88 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 89 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 90 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 91 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 92 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 93 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 94 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 95 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 96 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 97 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 98 % y como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 99 %, con una secuencia polipeptídica de lacasa de longitud completa como se divulga en el presente documento (p. ej., la SEC ID N° 4) o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia polipeptídica de lacasa de longitud completa como se divulga en el presente documento. Normalmente, los polipéptidos variantes de lacasa tienen una longitud de al menos aproximadamente 10 aminoácidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 20 aminoácidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 30 aminoácidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 40 aminoácidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 50 aminoácidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 60 aminoácidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 70 aminoácidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 80 aminoácidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 90 aminoácidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 100 aminoácidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 150 aminoácidos o más.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a las secuencias polipeptídicas de lacasa identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de lacasa específica, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede realizar de varias formas dentro de la experiencia en la técnica usando, por ejemplo, software informático disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para alinear las secuencias, incluidos los algoritmos necesarios para alcanzar la alineación máxima a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se están comparando. No obstante, para los fines del presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa

informático de comparación de secuencia ALIGN-2, en el que el código fuente complete para el programa ALIGN-2 está disponible tal como se describe en el presente documento. El programa informático de comparación de secuencia ALIGN-2 es de Genentech, Inc. y el código fuente ha sido archivado con la documentación del usuario en la Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el número de registro de Copyright de EE.UU.

TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público por Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede recopilarse a partir del código fuente proporcionado en la Tabla I siguiente. El programa ALIGN-2 se recopilará para uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de la secuencia de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A a, o con, o contra, una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, redactarse como una secuencia de aminoácidos dada A o tiene comprende un determinado % de identidad de la secuencia de aminoácidos con, o contra, una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción X/Y.

en la que X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como pares idénticos por el programa de alineación de la secuencia ALIGN-2 en que la alineación del programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad de secuencia de aminoácidos usando este procedimiento, en el presente documento se demuestra un procedimiento para calcular el % de identidad de secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designada "Proteína de comparación con la secuencia de aminoácidos designada lacasa, en la que "lacasa" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de lacasa hipotético de interés, "Proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido frente al que se está comparando el polipéptido de la "lacasa" de interés, y "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes residuos de aminoácidos hipotéticos.

A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de la secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2. No obstante, los valores de % de identidad de la secuencia de aminoácidos también se pueden obtener como se describe más adelante usando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul y col., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda en WU-BLAST-2 se establecen en los valores predeterminados. Los no fijados en valores predeterminados, es decir, los parámetros ajustables, se fijan con los siguientes valores: Ciclo de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125; umbral de palabra (T)= 11 y matriz de puntuación= BLOSUM62. Cuando se usa WU-BLAST-2, un valor del % de identidad de secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de residuos de aminoácidos idénticos entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la lacasa de interés que tiene una secuencia derivada del polipéptido de la lacasa y la secuencia de aminoácido de comparación de interés (es decir, la secuencia frente a la cual se compara el polipéptido de la lacasa de interés, que puede ser un polipéptido variante de la lacasa) determinado por WU-BLAST-2 por (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido de la lacasa de interés. Por ejemplo, en la afirmación de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos A que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con la secuencia de aminoácidos B, la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido lacasa de interés.

El porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos también se puede determinar usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y col., Nucleic Acids Res 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenerse del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se han fijado en valores predeterminados, incluidos, por ejemplo, sin enmascarar) sí, hebra = todos, apariciones previstas= 10, longitud mínima de complejidad baja = 15/5, valor 3 de múltiples pasos = 0,01, constante para múltiples pasos = 25, disminución para alineación final con huecos = 25 y matriz de puntuación BLOSUM62.

En situaciones en las que se usa NCBI-BLAST2 para comparaciones de la secuencia de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A a, o con, o contra, una

secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, redactarse como una secuencia de aminoácidos dada A o tiene comprende un determinado % de identidad de la secuencia de aminoácidos con, o contra, una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción X/Y.

5 En la que X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como pares idénticos por el programa de alineación de secuencia NCBI-BLAST2 en la alineación del programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

10 Opcionalmente, la variación es mediante la sustitución de al menos un aminoácido con otro aminoácido en uno o más de los dominios del polipéptido. Guías para determinar que residuo de aminoácidos se puede insertar, sustituir o delecionar sin afectar de forma adversa a la actividad deseada se pueden encontrar comparando la secuencia del polipéptido con la de las moléculas proteicas homólogas conocidas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de homología alta. Sustituciones de aminoácidos puede ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir sustituciones conservadoras de aminoácidos. Opcionalmente, las inserciones o las deleciones pueden estar en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y analizando en las variantes resultantes la actividad exhibida por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

15 En realizaciones concretas, las sustituciones conservadoras de interés se muestran debajo del titular de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones tienen como resultado un cambio en la actividad biológica, se introducen en los productos seleccionados más cambios sustanciales, denominadas sustituciones de ejemplo mostradas más adelante, o como se describen más adelante en referencia a clases de aminoácidos.

<u>Residuo</u>	Sustituciones	Sustituciones
<u>original</u>	<u>de ejemplo</u>	<u>preferidas</u>
Ala (A)	val ;leu; ile	val
Arg (R)	lys ; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; He; ala; tyr	leu

<u>Residuo</u>	Sustituciones	Sustituciones
<u>original</u>	<u>de ejemplo</u>	<u>preferidas</u>
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe;ala; norleucina	leu

5 Realizaciones preferidas proporcionan variantes de lacasa de la SEC ID N° 4 que tienen una o más sustituciones de aminoácidos de modo que los residuos en las posiciones 162, 163, 164, 166, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 208, 210, 212, 213, 214, 215, 216, 218, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 351, 352, 353, 354, 452, 454, 470, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 540, 541, 542, 545, 546, 547, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 597, 598, 599, 603, 604, 605, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 616, 618, 619, o 620, o cualquier combinación de las mismas, en la SEC ID N° 4 se cambian a cualquier otro aminoácido.

10 En algunas realizaciones, las variantes de lacasa carecen de secuencias señal. Por ejemplo, se proporcionan variantes de lacasa de la SEC ID N° 4 que carecen o contienen su secuencia señal asociada, o péptido señal. El péptido señal asociado para la SEC ID N° 4 se ha identificado provisionalmente como los residuos 1-26. No obstante, cabe destacar que el límite en C-terminal del péptido señal puede variar, aunque con mayor probabilidad en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier lado del límite en C-terminal del péptido señal como se ha identificado inicialmente en el presente documento, en el que el límite en C-terminal del péptido señal puede identificarse conforme a los criterios usados de forma rutinaria en la técnica para identificar dicho tipo de elemento de secuencia de aminoácidos (p. ej., Nielsen y col., Prot. Eng. 10: 10:1-6 (1997) y von Heinje y col., Nucl. Acids Res., 14, 4683-4690 (1986)) Además, también se reconoce que, en algunos casos, la escisión de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es completamente uniforme, que da como resultado más de una especie secretada. En consecuencia, algunas realizaciones proporcionan estos polipéptidos y los polinucleótidos que los codifican. Para los fines de la presente solicitud, el péptido señal del polipéptido de la lacasa de SEC ID N° 4 se extiende desde los aminoácidos 1 a X de la SEC ID N° 4, en la que X es cualquier aminoácido de 1 a 31 de la SEC ID N° 4 y variantes de los mismos. Formas maduras de las variantes de la SEC ID N° 4 proporcionadas en el presente documento son polipéptidos que comprenden los aminoácidos X a 660 de la SEC ID N° 4, en la que X es cualquier aminoácido de 1 a 31 de la SEC ID N° 4.

25 En algunas realizaciones, los polipéptidos variantes proporcionados en el presente documento tienen mayor actividad de lacasa en comparación con el homólogo silvestre, pro ejemplo la SEC ID N° 4 en condiciones especificadas. En algunas realizaciones, los polipéptidos variantes tienen menor actividad en comparación con el homólogo silvestre en condiciones especificadas. En algunas realizaciones, la actividad de la lacasa variante está alterada de un modo tal que exhibe actividad aumentada en un conjunto de condiciones y actividad disminuida en otro conjunto de condiciones. Ejemplos no limitantes de actividades que pueden estar alteradas en las variantes de lacasa en comparación con sus homólogos silvestres proporcionados en el presente documento incluyen pH óptimo, termoestabilidad, potencial redox y cinética enzimática. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las variantes de lacasa exhiben mayor actividad a pH 7, pH 8, pH 9, pH 10 o superior o cualquier número entremedias, en comparación con el homólogo silvestre, por ejemplo la SEC ID N° 4. En algunas realizaciones, las variantes de lacasa exhiben mayor termoestabilidad en comparación con el homólogo silvestre, por ejemplo la SEC ID N° 4. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la variante de lacasa retiene actividad durante un mayor periodo de tiempo, por ejemplo 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 60 minutos o más a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, en comparación con el homólogo silvestre, pro ejemplo la SEC ID N° 2 o la SEC ID N°: 4. En algunas realizaciones, variante de lacasa exhibe mayor potencial redox en comparación con el homólogo silvestre, pro ejemplo la SEC ID N° 4.

En realizaciones preferidas, los polipéptidos de lacasa y las variantes polipeptídicas de lacasa divulgados en el presente documento exhiben una actividad óptima a pH alcalino, por ejemplo a aproximadamente pH 7,25, pH 7,5,

pH 7,75, pH 8,0, pH 8,25, pH 8,5, pH 8,75, pH 9,0, pH 9,25, pH 9,5, pH 9,75, pH 10, pH 10,25, pH 10,5, pH 10,75, pH 11, pH 11,25, pH 11,5, o superiores. Por ejemplo, las lacasas o variantes de lacasa pueden tener un pH alcalino óptimo para la oxidación de mediadores, tales como compuestos de Fórmula I o Fórmula II, tratados más adelante, o cualquier mediador conocido o que se descubra en el futuro, por ejemplo ácido violúrico; 2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxiftalimida, 3-Hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); y ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB) y similares. Preferentemente, las lacasas y variantes de lacasa pueden oxidar los mediadores con potenciales redox mayores, tales como ácido violúrico, TEMPO, Mediador 71 (descrito en el presente documento), más mediadores con potenciales redox mayores a pH 8 y superior.

Preferentemente, los polipéptidos de lacasa y variantes de polipéptidos de lacasa son termoestables y retienen actividad lacasa a temperaturas superiores a 22 °C, por ejemplo superiores a aproximadamente 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C o superiores. En algunas realizaciones, los polipéptidos de lacasa retienen actividad lacasa durante al menos aproximadamente 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 35 minutos, 40 minutos, 45 minutos, 50 minutos, 60 minutos, 70 minutos, 80 minutos, 90 minutos, 100 minutos o más o cualquier número entremedias a temperaturas superiores a aproximadamente 22 °C, por ejemplo a aproximadamente 65 °C, 70 °C, 80 °C, o superiores.

#### Polinucleótidos

En el presente documento también se proporcionan polinucleótidos de lacasa. Como se usa en el presente documento, "polinucleótidos de lacasa" se refieren a polinucleótidos que codifican polipéptidos de lacasa. Por ejemplo, polinucleótidos de lacasa incluyen polinucleótidos que comprenden las secuencias de la SEC ID N° 3, o variantes o fragmentos de las mismas.

"Polinucleótido variante de lacasa" o "secuencia de ácido nucleico variante de lacasa" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de lacasa activa como se define más adelante y que tiene una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 80 % con una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica de lacasa de longitud completa como se divulga en el presente documento, una secuencia polipeptídica de lacasa de longitud completa que carece del péptido señal como se divulga en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido de lacasa, con o sin el péptido señal, como se divulga en el presente documento, o cualquier otro fragmento o secuencia polipeptídica de lacasa de longitud completa se divulga en el presente documento. Habitualmente, un polinucleótido variante de la lacasa tendrá una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 80 %, como alternativa una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 81 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 82 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 83 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 84 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 85 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 86 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 87 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 88 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 89 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 90 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 91 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 92 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 93 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 94 %, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 95%, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 96%, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 97%, como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 98% y como alternativa una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 99%, con una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica de lacasa de secuencia nativa de longitud completa como se divulga en el presente documento o cualquier otro fragmento o secuencia polipeptídica de lacasa de longitud completa como se divulga en el presente documento.

Habitualmente, los polinucleótidos variantes de la lacasa tienen una longitud de al menos aproximadamente 30

nucleótidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 60 nucleótidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 90 nucleótidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 120 nucleótidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 150 nucleótidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 180 nucleótidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 210 nucleótidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 240 nucleótidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 270 nucleótidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 300 nucleótidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 450 nucleótidos. como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 600 nucleótidos, como alternativa una longitud de al menos aproximadamente 900 nucleótidos o más.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a las secuencias de ácido nucleico que codifican la lacasa identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácido nucleico de lacasa de interés, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico se puede realizar de varias formas dentro de la experiencia en la técnica usando, por ejemplo, software informático disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). No obstante, para los fines del presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de ácido nucleico se generan usando el programa informático de comparación de secuencia ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencia ALIGN-2 es de Genentech, Inc. y el código fuente ha sido archivado con la documentación del usuario en la Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el número de registro de Copyright de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público por Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede recopilarse a partir del código fuente proporcionado en la Tabla I siguiente. El programa ALIGN-2 se recopilará para uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de la secuencia de ácido nucleico, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico dada C a, o con, o contra, una secuencia de ácido nucleico dada D (que puede, como alternativa, redactarse como una secuencia de ácido nucleico dada C o tiene comprende un determinado % de identidad de la secuencia de ácido nucleico con, o contra, una secuencia de ácido nucleico dada D) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción  $W/Z$ .

en la que W es el número de residuos de nucleótidos puntuados como pares idénticos por el programa de alineación de la secuencia ALIGN-2 en que la alineación del programa de C y D, y en la que Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D a C. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad de secuencia de ácido nucleico, Tablas 4 y 5, demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico designada "ADN de comparación" con la secuencia de ácido nucleico designada "ADN de lacasa", en la que "ADN de lacasa" representa una secuencia de ácido nucleico de codificación de OspA de interés hipotética, "ADN de comparación" representa la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico frente a la que se está comparando la molécula de ácido nucleico "ADN de lacasa" de interés, y "N", "L" y "V" representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos.

A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de la secuencia de ácido nucleico usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2. No obstante, los valores de % de identidad de la secuencia de ácido nucleico también se pueden obtener como se describe más adelante usando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul y col., *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda en WU-BLAST-2 se establecen en los valores predeterminados. Los no fijados en valores predeterminados, es decir, los parámetros ajustables, se fijan con los siguientes valores: ciclo de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125; umbral de palabra (T)= 11 y matriz de puntuación= BLOSUM62. Cuando se usa WU-BLAST-2, un valor del % de identidad de secuencia de ácido nucleico se determina dividiendo (a) el número de nucleótidos idénticos entre la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la lacasa de interés que tiene una secuencia derivada de la secuencia nativa del ácido nucleico que codifica el polipéptido de la lacasa y la molécula de ácido nucleico de comparación de interés (es decir, la secuencia frente a la cual se compara la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la lacasa de interés, que puede ser un

polinucleótido variante de la lacasa) determinado por WU-BLAST2 por (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la lacasa de interés. Por ejemplo, en la afirmación de “una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico A que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con la secuencia de ácido nucleico B, la secuencia de ácido nucleico A es la molécula de ácido nucleico de comparación de interés y la secuencia de ácido nucleico B es la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de lacasa de interés.

El porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico también se puede determinar usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y col., *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenerse del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se han fijado en valores predeterminados, incluidos, por ejemplo, sin enmascarar) sí, hebra = todos, apariciones previstas= 10, longitud mínima de complejidad baja = 15/5, valor de múltiples pasos = 0,01, constante para múltiples pasos = 25, disminución para alineación final con huecos = 25 y matriz de puntuación BLOSUM62.

En situaciones en las que se usa NCBI-BLAST2 para comparaciones de la secuencia de ácido nucleico, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico dada C a, o con, o contra, una secuencia de ácido nucleico dada D (que puede, como alternativa, redactarse como una secuencia de ácido nucleico dada C o tiene comprende un determinado % de identidad de la secuencia de ácido nucleico con, o contra, una secuencia de ácido nucleico dada D) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción  $W/Z$  .

en la que W es el número de nucleótidos puntuados como pares idénticos por el programa de alineación de la secuencia NCBI-BLAST2 en que la alineación del programa de C y D, y en la que Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D a C..

Se pueden realizar variaciones en la secuencia de los polipéptidos descritos en el presente documento usando, por ejemplo, cualquiera de las técnicas y guías para mutaciones conservadoras y no conservadoras establecidas en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5,364,934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido que tiene como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido en comparación con el polipéptido de secuencia nativa,

En otras realizaciones, polinucleótidos variantes de lacasa son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de lacasa activa y que pueden hibridar, preferentemente en condiciones de lavado e hibridación rigurosas, con secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de lacasa de longitud completa como se divulga en el presente documento, Los polipéptidos variantes de lacasa pueden ser aquéllos que están codificados por un polinucleótido variante de lacasa.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la "Rigurosidad" de las reacciones de hibridación y, en general, es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sales. En general, sondas más largas requiere temperaturas más altas para un apareamiento adecuado, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas menores. En general, la hibridación depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para volver a aparearse cuando las hebras complementarias están presentes en un ambiente pro debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de la homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor es la temperatura relativa que se puede usar. Como resultado se deduce que temperaturas relativas más altas tenderían a hacer más rigurosas las condiciones de reacción, mientras que las temperaturas menores lo harían a menos rigurosas. Para detalles adicionales y una explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel, y col., *Current protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

“Condiciones rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad”, como se define en el presente documento, pueden identificarse como aquéllas que: (1) emplean resistencia iónica baja y temperatura de lavado alta, por ejemplo cloruro sódico 0,015M/citrato sódico 0,0015M/dodecilsulfato sódico al 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo formamida al 50 % (v/v) con seroalbúmina bovina al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75M, citrato sódico 0,075M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1 %, 5x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1 % y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C,

con lavados a 42 °C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50 % a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C.

“Condiciones moderadamente rigurosas” se pueden identificar como las descritas por Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de condiciones de hibridación y de la solución de lavado (p. ej., temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación moderadamente rigurosas es la incubación durante toda la noche a 37 °C en una solución que comprende: Formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por cizallamiento, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37 – 50°C. El experto en la técnica reconocerá como ajusta la temperatura, la fuerza iónica etc., según sea necesario para adaptar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

Polinucleótidos variantes de lacasa se generan usando cualquier técnica conocida para los expertos en la técnica, tal como mutagénesis por saturación, evolución dirigida optimizada o similares. La Gene Site Saturation Mutagenesis™, o "GSSM™ incluye un procedimiento que usa cebadores de oligonucleótidos degenerados para introducir mutaciones puntuales en un polinucleótido, descrito con detalle en la patente de EE.UU. nº 6.673.552. La evolución dirigida optimizada incluye un procedimiento para reensamblar fragmentos de secuencias de ácido nucleico relacionadas, por ejemplo genes relacionados, y se explican con detalle en la patente de EE.UU. nº 6.361.974 y la solicitud de patente de EE.UU. número de serie 09/332.835.

“Aislado”, cuando se usa para describir los diversos polipéptidos divulgados en el presente documento, significa el polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Un ácido nucleico “aislado”, como un ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado de la lacasa u otro ácido nucleico que codifica un polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico que codifica un polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado es otra distinta en forma o situación en la que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido aislados se distinguen de la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido específico en cuanto a que existe en las células naturales. No obstante, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado incluye moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido contenidas en células que habitualmente expresan el polipéptido, en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

#### Vectores y células huésped

Los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento también se pueden proporcionar en vectores de expresión y vehículos de clonación. Los vectores de expresión y los vehículos de clonación pueden comprender partículas víricas, baculovirus, fagos, plásmidos, fósmidos, cromosomas bacterianos artificiales, ADN viral (p. ej., vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, seudorabia y derivados de SV40), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levaduras, cromosomas artificiales de levaduras y cualquier otro vector específico para huéspedes específicos de interés (tales como Bacillus, Aspergillus y levaduras)- Los vectores pueden incluir secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Los expertos en la técnica conocen un número elevado de vectores adecuados y comercialmente disponibles. Entre los ejemplos de vectores se incluyen: bacterianos: vectores pQE (Qiagen), plásmidos pBluescript, vectores pNH, (vectores lambda-ZAP (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); Eucariotas: pXTI, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). No obstante se puede usar otro plásmido u otro vector siempre que sea replicable y viable en la célula huésped. Con las realizaciones descritas en el presente documento se pueden emplear vectores de número de copias bajo o de número de copias alto. El vector de expresión puede comprender un promotor, un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias adecuadas para amplificar la expresión. Los vectores de expresión en mamíferos pueden comprender un origen de replicación, cualquier sitio de unión al ribosoma, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias no transcritas al lado del extremo 5'. En algunos aspectos, las secuencias de ADN liberadas de los sitios de corte y empalme y de poliadenilación de SV40 se pueden usar para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos. En un aspecto, los vectores de expresión contienen uno o más genes de marcadores seleccionables para permitir la selección de células huésped que contienen el vector. Dichos marcadores seleccionables incluyen genes que codifican la dihidrofolato reductasa o genes que confieren resistencia a neomicina para cultivos celulares eucariotas y genes que confieren resistencia a tetraciclina o ampicilina para cultivos en *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*. Se pueden seleccionar regiones promotoras de cualquier gen deseado usando vectores de cloranfenicol transferasa (CAT) u otros vectores con marcadores seleccionables. Los vectores para expresar el

polipéptido o fragmento del mismo en células eucariotas también pueden contener potenciadores para incrementar los niveles de expresión. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación, pb 100 a 270, el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado tardío del origen de la replicación, y los potenciadores de adenovirus.

5 Las secuencias de ácido nucleico divulgadas en el presente documento se pueden insertar en un vector mediante diversos procedimientos. En general, la secuencia se puede unir a la posición deseada del vector tras la digestión del inserto y el vector con las endonucleasas de restricción adecuadas. Como alternativa se pueden ligar los extremos romos tanto del inserto como del vector. En la técnica se conocen diversas técnicas de clonación, por ejemplo como se describen en Ausubel y Sambrook. Dichos procedimientos y otros se consideran dentro del  
10 alcance de los expertos en la técnica. El vector puede estar en forma de un plásmido, una partícula viral o un fago. Otros vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, derivados de SV40; plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral, tal como de vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar y seudorrabia. En, por ejemplo, Sambrook, se describen diversos vectores de clonación y expresión para usar con huéspedes procariontes y eucariotas. Se puede usar cualquier vector siempre que sea replicable y viable en la célula huésped. Vectores bacterianos concretos que se pueden usar incluyen los plásmidos comercialmente disponibles que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), GEMI (Promega Biotec, Madison, WI, USA) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pD10, phiX174, pBluescriptFM II KS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 y pCM7. vectores eucariotas concretos incluyen pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL (Pharmacia). Los expertos en la técnica conocen  
20 varios vectores de expresión en hongos y son útiles en las realizaciones descritas en el presente documento, por ejemplo los descritos en Campbell y col. Fungal Genetics Newsl. 36:79-81. No obstante se puede usar cualquier otro vector siempre que sea replicable y viable en la célula huésped.

25 Los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento se pueden expresar en casetes de expresión, vectores o virus y expresarse de forma transitoria o estable en células y semillas de plantas. Un ejemplo de sistema de expresión transitorio usa sistemas de expresión episomal, por ejemplo el ARN viral del virus del mosaico de la coliflor (CNMV) generado en el núcleo por transcripción de un minicromosoma episomal que contiene ADN superenrollado, véase, por ejemplo, Covey (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1633-1637. Como alternativa, las  
30 secuencias de codificación, es decir todas o subfragmentos de secuencias de los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento, se pueden insertar en el genoma de una célula huésped vegetal y se convierten en una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Los transcritos sentido o antisentido se pueden expresar de este modo. Un vector que comprende las secuencias (p. ej., promotores o regiones de codificación) de los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento pueden comprender un gen marcador que confiera un fenotipo seleccionable sobre una célula vegetal o una semilla. Por ejemplo, el marcador seleccionable puede codificar resistencia a biocidas, particularmente resistencia a antibióticos, tales como resistencia a kanamicina, G418, bleomicina, higromicina, o resistencia a un herbicida, tal como resistencia a clorosulfurón o a Basta. Los vectores de expresión capaces de expresar ácidos nucleicos y proteínas en plantas son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, vectores de *Agrobacterium* spp., virus X de la patata (véase, por ejemplo, Angell (1997) EMBO J. 16:3675-3684), virus del mosaico del tabaco (véase, por ejemplo, Casper (1996) Gene 173 :69-73), virus del tomate de árbol (véase, por ejemplo, Hillman (1989) Virology 169:42-50), virus del grabado del tabaco (véase, por ejemplo, Dolja (1997) Virology 234:243-252), virus del mosaico dorado de la judía (véase, por ejemplo, Morinaga (1993) Microbiol Immunol. 37:471-476), virus del mosaico de la coliflor (véase, por ejemplo, Cecchini (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10: 1094-110 1), el elemento transposón Ac/D del maíz (Spm) (véase, por ejemplo, Rubin (1997) Mol. Cell. Biol. 17:6294-6302; Kunze (1996) Curro Top. Microbiol. Immunol. 204: 161-194), y el elemento transposón del mutador supresor del maíz (Spm) (véase, p. ej., Schlappi (1996) Plant Mol. Biol. 32:717-725); y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación para que pueda mantenerse en dos organismos, por ejemplo en células de mamífero o de insecto para su expresión y en un huésped procarionte para clonación y amplificación. Además, para integrar los  
45 vectores de expresión, el vector de expresión puede contener al menos una secuencia homóloga a la del genoma de la célula huésped. Puede contener dos secuencias homólogas que flanquean a la construcción de expresión. El vector de integración se puede dirigir a un locus específico en la célula huésped seleccionando la secuencia homóloga adecuada para incluir en el vector. Las construcciones para integrar vectores se conocen bien en la técnica.

55 Los vectores de expresión divulgados en el presente documento pueden incluir también un gen de un marcador seleccionable para permitir la selección de cepas bacterianas que se han transformado, por ejemplo genes que hacen a la bacteria resistente a fármacos tales como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, neomicina y tetraciclina. Los marcadores seleccionables pueden también incluir genes biosintéticos, tales como los que están

en las vías biosintéticas de histidina, triptófano y leucina. Los términos "vector" y "casete de expresión", como se usan en el presente documento, se pueden usar de forma intercambiable y hacer referencia a una secuencia de nucleótidos que sea capaz de afectar a la expresión de un ácido nucleico, por ejemplo un ácido nucleico mutado de la invención. Los casetes de expresión pueden incluir al menos un promotor unido operablemente a la secuencia que codifica el polipéptido y, opcionalmente, a otras secuencias, por ejemplo señales de terminación de la transcripción. Factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión también se pueden usar, por ejemplo potenciadores. "Operablemente unido", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de un promotor cadena arriba de una secuencia de ADN, de modo que el promotor media la transcripción de la secuencia de ADN. Por tanto, los vectores de expresión también pueden incluir plásmidos, vectores de expresión virus recombinantes, cualquier forma de vector de "ADN desnudo" recombinante y similares. Un "vector" comprende un ácido nucleico que puede infectar, transfeccionar, transducir, transitoria o permanentemente, una célula. Se reconocerá que un vector puede ser un ácido nucleico diana, o un ácido nucleico en complejo con proteína o lípido. El vector comprende opcionalmente ácidos nucleicos virales o bacterianas y/o proteínas y/o membranas (p. ej., una membrana celular, una cubierta lipídica vírica etc.). Los vectores incluyen, entre otros, replicones (p. ej., replicones de ARN, bacteriófagos) a los que se pueden unir fragmentos de ADN y replicarse. Por tanto, los vectores incluyen, entre otros, ARN o ADN lineal o circular autónomo o autorreplicante (p. ej., plásmidos, virus, y similares, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.217.879), e incluye plásmidos de expresión y de no expresión.

La secuencia de ADN se puede insertar en el vector mediante diversos procedimientos. En general, la secuencia de ADN se une en la posición deseada del vector tras la digestión del inserto y el vector con las endonucleasas de restricción adecuadas. Como alternativa se pueden ligar los extremos romos tanto del inserto como del vector. En Ausubel y col. se divulgan varias técnicas de clonación *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Inc. 1997 y Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Dichos procedimientos y otros se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula viral o un fago. Otros vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, derivados de SV40; plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral, tal como de vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar y seudorrabia. En, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed.*, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989) se describen diversos vectores de clonación y expresión para usar con huéspedes procariotas y eucariotas.

También se pueden producir células transformadas que comprenden una secuencia de ácido nucleico de las realizaciones descritas en el presente documento, por ejemplo una secuencia que codifica un polipéptido de lacasa o variante descrito en el presente documento, o un casete de expresión, por ejemplo un vector de los descritos en el presente documento. La célula huésped puede ser cualquiera de las células huésped familiares para los expertos en la técnica, incluidas células procariotas, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células de mamífero, células de insecto o células vegetales. Ejemplos de células bacterianas incluyen *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* o cualquier especie dentro de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* and *Staphylococcus*. Ejemplos de células de insectos incluyen *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Ejemplos de células de levaduras incluyen *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. Preferentemente, la célula huésped es una célula fúngica. Ejemplos de células fúngicas incluyen especies de *Aspergillus*, por ejemplo *A. niger*, especies de *Neurospora*, por ejemplo *N. crassa*, y similares. Ejemplos de células animales incluyen CHO, COS o melanoma de Bowes o cualquier línea celular de ratón o humana. La selección de un huésped adecuado entra dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Se conocen bien las técnicas para transformar una amplia variedad de especies de plantas superiores y se describen en la literatura técnica y científica. Por ejemplo, Weising (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477, la patente de EE.UU. nº 5.750.870. El vector se puede introducir en las células huésped usando cualquiera de diversas técnicas, incluidos transformación, transfección, transducción, infección viral, pistolas génicas o transferencia génica mediada por Ti. Procedimientos concretos incluyen transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-Dextrano, lipofección o electroporación (Davis, L., Dibner, M., Battey, L., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986)). En un aspecto, los ácidos nucleicos o vectores de la invención se introducen en las células para detección selectiva, por tanto, los ácidos nucleicos entran en las células de un modo adecuado para la posterior expresión del ácido nucleico. El procedimiento de introducción viene dictado en gran medida por el tipo de célula al que están dirigidos. Ejemplos de procedimientos incluyen precipitación en  $\text{CaPO}_4$ , fusión de liposomas, lipofección (p. ej., LIPOFECTIN<sup>TM</sup>), electroporación infección vírica etc. Los ácidos nucleicos candidatos pueden integrarse de forma estable en el genoma de la célula huésped (p. ej., con introducción de retrovirus) o pueden existir de forma transitoria o estable en el citoplasma (es decir, a través del uso de plásmidos tradicionales, usando secuencias reguladoras estándar, marcadores de selección etc.).

Las construcciones en las células huésped se pueden usar de un modo convencional para producir el producto

génico codificado por la secuencia recombinante. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos producidos por las células huésped que contienen el vector pueden estar glicosilados o no glicosilados. Los polipéptidos de la invención pueden también incluir o no un residuo de aminoácido metionina inicial. También se pueden usar sistemas de traducción sin células para producir un polipéptido de la invención. Los sistemas de traducción sin células pueden usar ARNm transcritos a partir de una construcción de ADN que comprende un promotor unido operablemente a un ácido nucleico que codifica el polipéptido o fragmento del mismo, en algunos aspectos, la construcción de ADN puede linealizarse antes de realizar una reacción de transcripción in Vitro. El ARNm transcrito se incuba después con un extracto de traducción sin células adecuado, tal como un extracto de reticulocitos de conejo, para producir el polipéptido deseado o fragmento del mismo. Los vectores de expresión pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas, tales como dihidrofolato reductasa, resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas, o tales como resistencia a tetraciclina o a ampicilina en *E. coli*. Las células huésped que contienen los polinucleótidos de interés, por ejemplo ácidos nucleicos de la invención, se pueden cultivar en medio nutriente convencional según sea adecuado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las usadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

También se divulgan procedimientos para sobreexpresar polipéptidos de lacasa recombinantes en una célula, que comprende expresar un vector que comprende un ácido nucleico divulgado en el presente documento, por ejemplo un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 50%, 51 %, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61 %, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71 %, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81 %, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más con la SEC ID N° 3 sobre una región de al menos aproximadamente 100 residuos, o más, como se ha descrito anteriormente.

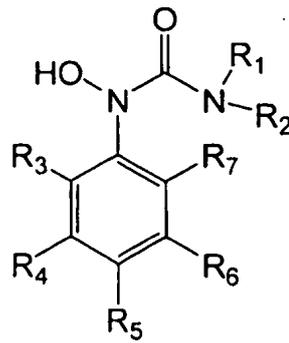
La expresión o sobreexpresión de los polipéptidos de lacasa se puede efectuar por cualquier medio, por ejemplo el uso de un promotor de actividad alta, un vector dicistrónico, o mediante amplificación génica del vector. Los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento se pueden expresar, o sobreexpresar, en cualquier sistema de expresión in Vitro o in vivo. Se puede emplear cualquier sistema de cultivo celular para expresar, o sobreexpresar, proteína recombinante, incluidos cultivos bacterianos, de insectos, de levaduras, fúngicos o de mamífero. La sobreexpresión se puede efectuar mediante la elección adecuada de promotores, potenciadores, vectores (p. ej., el uso de vectores replicones, vectores dicistrónicos (véase, por ejemplo, Gurtu (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 229:295-8), medios, sistemas de cultivo y similares. En un aspecto, se usa amplificación génica usando marcadores de selección, por ejemplo glutamina sintetasa (véase, p. ej., Sanders (1987) Dev. Biol. Stand. 66:55-63) en sistemas celulares para sobreexpresar los polipéptidos de la invención.

#### Mediadores

En algunos casos, las lacasas funcionan oxidando sustratos para dar un radical estabilizado que puede obtener un hidrógeno de otra molécula orgánica de modo que el sustrato inicial retorne al estado basal. En este caso, el sustrato basal se denomina mediador y el producto final de la reacción es la forma oxidada del segundo compuesto orgánico, por ejemplo oxidación de lignina. De acuerdo con esto, como se usa en el presente documento, el término "mediador" se refiere a cualquier compuesto que pueda ser oxidado por una lacasa y, a su vez, que pueda oxidar un sustrato orgánico.

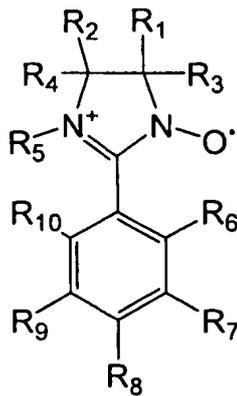
Algunos mediadores útiles en las realizaciones descritas en el presente documento son conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos no limitantes de mediadores conocidos son ácido violúrico; 2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxifalimida; 3-Hidroxi-3,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); y ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB). No obstante, se apreciará que los mediadores descubiertos en el futuro también son útiles en las realizaciones descritas en el presente documento.

Algunas realizaciones proporcionan los siguientes mediadores capaces de mediar en las reacciones de la lacasa, tales como compuestos de Fórmula I y Fórmula II.



(Fórmula I),

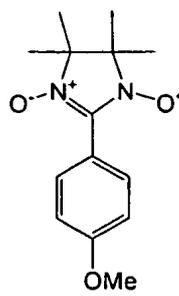
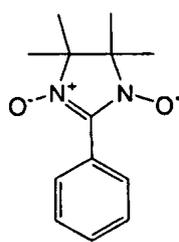
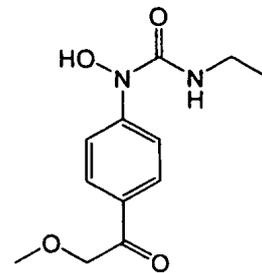
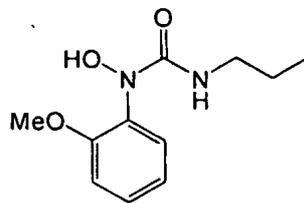
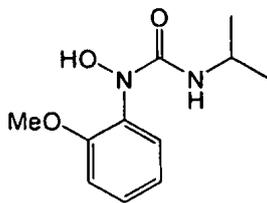
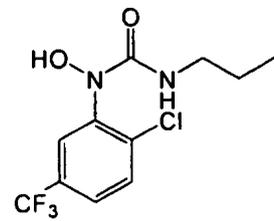
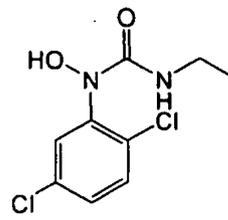
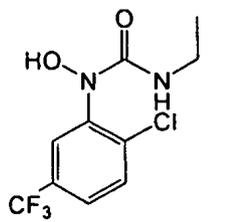
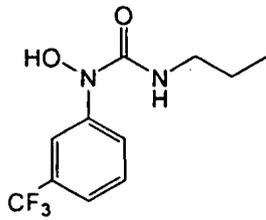
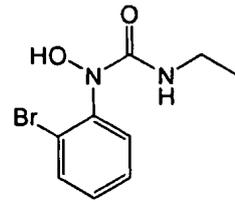
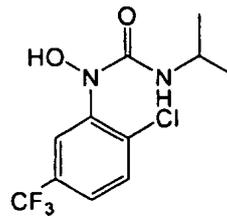
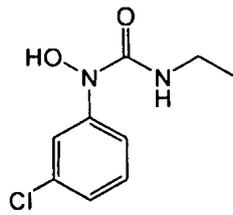
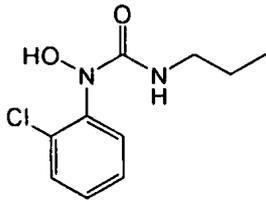
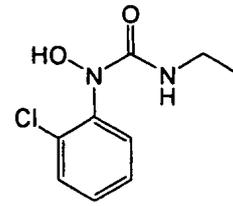
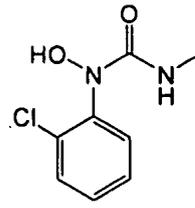
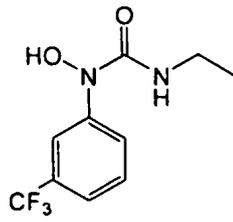
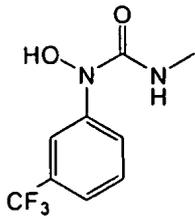
- 5 en la que de R<sub>1</sub> a R<sub>7</sub> se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, alquilo, arilo, hetarilo, fenilo, CF<sub>3</sub>, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O)OCH<sub>3</sub>, C(O)OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C(O)OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, C(O)OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, COOH, OCH<sub>3</sub>, OH, OCF<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NH(CH<sub>3</sub>), N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, Br y Cl.



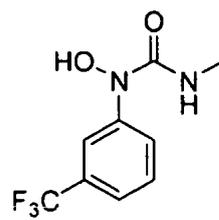
10

Fórmula (II), en la que de R<sub>1</sub> a R<sub>10</sub> se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, alquilo, arilo, fenilo, CF<sub>3</sub>, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O)OCH<sub>3</sub>, COOH, OCH<sub>3</sub>, OH, O-, OCF<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NH(CH<sub>3</sub>), N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, Br y Cl.

- 15 Mediadores preferidos incluyen los siguientes:

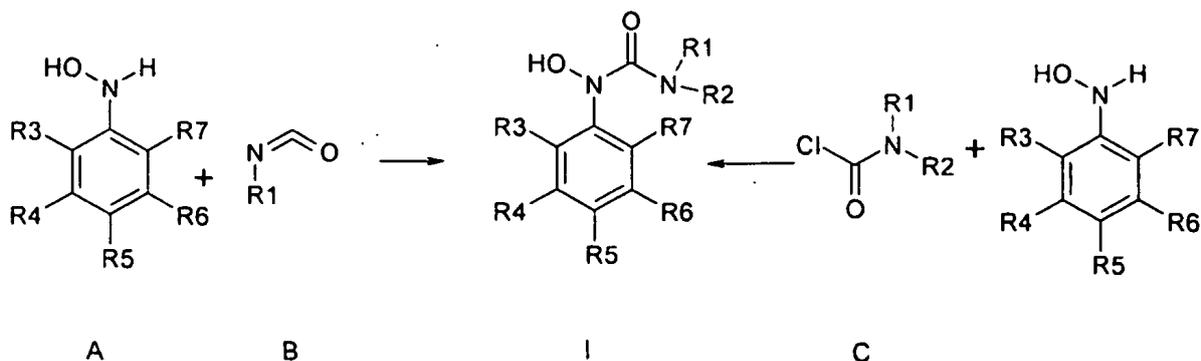


Más preferentemente

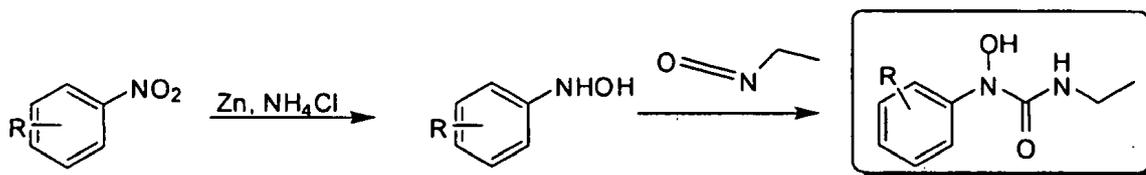


(Mediador 71).

Los mediadores divulgados en el presente documento se pueden sintetizar a partir de materiales de partida disponibles comercialmente, usando técnicas de síntesis química de rutina. Por ejemplo, se pueden sintetizar mediadores de fórmula I a partir de hidroxilaminas de la fórmula A haciendo reaccionar con un isocianato de fórmula B o cloruros de ácido carbámico de fórmula C, para dar hidroxilureas de fórmula I siguiendo procedimientos conocidos (p. ej., Crumbliss, J. Org. Chem. 1982(47) 1171; Tandon, J. Chem. Eng. Data. 1967(12) 143).



### 10 Ejemplo I



#### I. PREPARACIÓN DE N-(2-CLOROFENIL)HIDROXILAMINA:

15 Una suspensión de 2-cloronitrobenzono (50 g, 0,318 mol) y cloruro amónico (16,9 g, 0,318 mmol) en 636 ml de agua se calentó hasta 65 °C. A la mezcla se añadió, en porciones, cinc (60 g, 0,955 mol) durante 20 min y la temperatura se mantuvo a 70°C ~75°C. Después de agitar durante 10 min, la TLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla se filtró y se lavó con agua (~70° C). Al filtrado se añadió NaCl, después se enfrió hasta -10 ° C. Tras 1 hora, la mezcla se filtró y se lavó con petróleo y, después, se secó para dar la hidroxilamina deseada como un sólido blanco (35 g, 76,9%), que se usó en la siguiente etapa sin purificación. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO): δ ppm 8,36 (m, 2 H), 7,16 (s, 2 H), 6,79 (m, 2 H). 1

#### II. PREPARACIÓN DE 1-(2-CLOROFENIL)-3-ETIL-1-HIDROXIUREA:

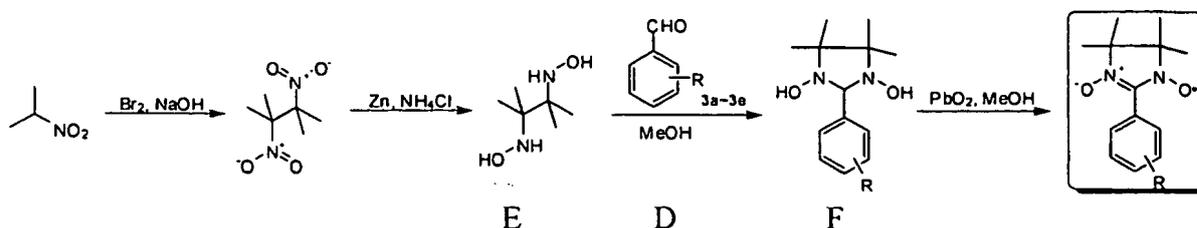
25 A una solución de la hidroxilamina (35 g, 0,244 mol) en 100 ml de CHCl<sub>3</sub> THF se añadió, gota a gota, el compuesto isocianato de etilo (17,3 g, 0,244 mmol) a -10°C. Tras la adición, la TLC mostró que la reacción se había completado. La solución se concentró y cristalizó en la hidroxilurea deseada como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,12 (a s, 1H), 7,55 (m, 2 H), 7,29 (m, 2 H), 3,27 (c, 2 H), 1,04 (t, 3 H).

La preparación de 1-(3-trifluorometilfenil)-3-etil-1-hidroxiurea siguió el mismo procedimiento.

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO): δ 10,40 (s, 1H), 7,91 (s, 1 H), 7,78 (m, 1 H), 7,46 (m, 2 H), 7,27 (m, 1 H), 3,13 (c, 2 H), 1,03 (t, 3 H).

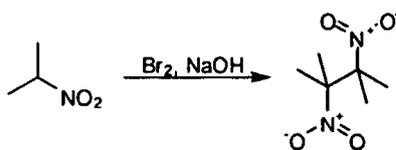
30 Los compuestos de Fórmula II se pueden sintetizar como se muestra en el Esquema II. Los carbaldehídos de Fórmula D se pueden hacer reaccionar con 1,—dos mediante procedimientos conocidos (p. ej., Wu y col.

Bioorganic & Medicinal Chemistry 14 (2006) 5711-5720):



5 Ejemplo 2:

### III. PREPARACIÓN DE 2,3-DIMETIL-2,3-DINITROBUTANO:



10

A -5 °C se añadió, gota a gota, Br<sub>2</sub> (29 ml, 0,55 mol) a la solución de 2-nitropropano (100 g, 1,12 mol) en 188 ml (6,0 mol/l) de NaOH acuoso. Se añadió etanol (371 ml) a la mezcla durante la agitación. La mezcla de reacción se agitó a 84 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción caliente se transfirió a 1160 ml de agua helada. Los cristales incoloros formados se recogieron mediante filtración para dar el compuesto deseado (82,56 g, 83%). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD): δ 1,7 (s, 3 H).

15

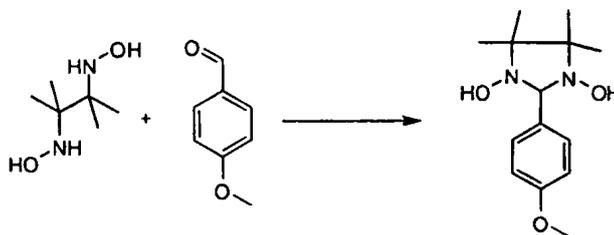
### IV. PREPARACIÓN DE 2,3-BIS(HIDROXILAMINO)-2,3-DIMETILBUTANO:



20

El compuesto 2,3-dimetil-2,3-dinitrobutano (82,56 g, 0,47 mmol) se disolvió en una mezcla de THF (1407 ml) y agua (235 ml). A esta solución enfriada hasta 8-10°C, se añadió en una porción polvo de Zn (126,9 g, 1,95 mol). Una solución de NH<sub>4</sub>Cl (202,1 g, 3,77 mol) en H<sub>2</sub>O (705 ml) se añadió, gota a gota, a esta suspensión, con agitación continua durante 1 hora a 10 °C y el matraz se almacenó en agua enfriada durante 16 horas. La suspensión se filtró y el precipitado se lavó cuidadosamente con THF (4 X 200 ml). Después, el precipitado se secó mediante tres lavados con éter dietílico y se recogió. La solución se evaporó al vacío hasta que dejó de destilarse THF. Después, la solución se protegió del aire y se añadieron carbonato sódico (235 g) y cloruro sódico (141 g) con enfriamiento. Se realizó extracción continua con cloroformo (1880 ml) durante 18 horas. El filtrado se concentró para dar el producto oleoso, después se añadió éter de petróleo a esta mezcla y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se filtró, se secó para dar un polvo blanco 12,8 g, rendimiento del 18,4 %. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO): 86,89 (s, 1H), 5,34 (m, 1 H), 0,96 (m, 3H).

30

**Preparación de 1,3-dihidroxi-2-(4-metoxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolidina**

- 5 Una solución de 2,3-bis(hidroxilamino)-2,3-dimetilbutano (1,3 g, 8,8 mmol) y 4-metoxi-benzaldehído (1,2 g, 8,8 mmol) en metanol (10 ml) se agitó a temperatura ambiente hasta que los reactantes hubieron desaparecido, indicado mediante TLC. Mediante filtración se obtuvo 2,3-Dihidroxi-2-(4-metoxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolidina, el filtrado se evaporó a presión reducida para dar la segunda cosecha del compuesto del título. Después, el compuesto combinado se lavó con éter de petróleo y se usó para la siguiente reacción (0,8 g, rendimiento del
- 10 34%). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$  7,63 (s, 1H), 7,32 (d, 1 H, J= 6,8), 6,87 (d, 1H, J = 5,8), 4,42 (s, 1 H), 3,72 (s, 3 H), 1,06 (s, 3 H), 1,02 (s, 3H).

**V. PREPARACIÓN DEL NITRONIL-N-ÓXIDO:**

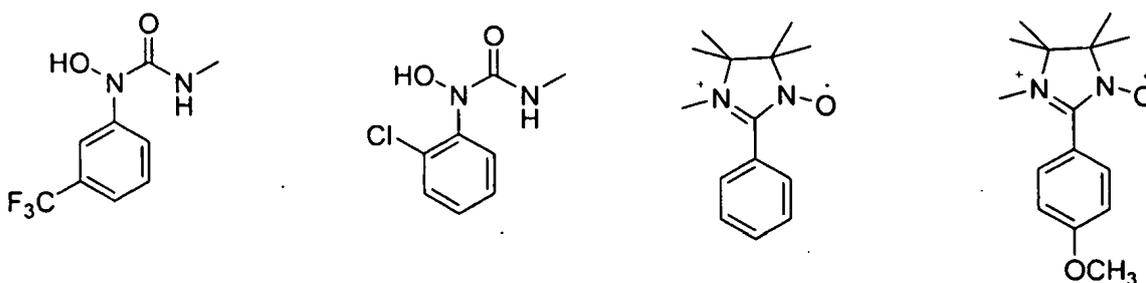
- 15 A temperatura ambiente, la suspensión de 0,8 g (3,0 mmol) de 1,3-dihidroxi-2-(4-metoxi-fenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolidina y 2,1 g de dióxido de plomo en 30 ml de metanol se agitó hasta que la mezcla de reacción se volvió de color azul. Tras la filtración, el filtrado se evaporó a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna. La fracción combinada se concentró y cristalizó tras la adición de un poco de éter de petróleo a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ . El producto cristalino de color azul oscuro tras lavar con un poco de éter de petróleo frío pesó 0,7 g (88 %).

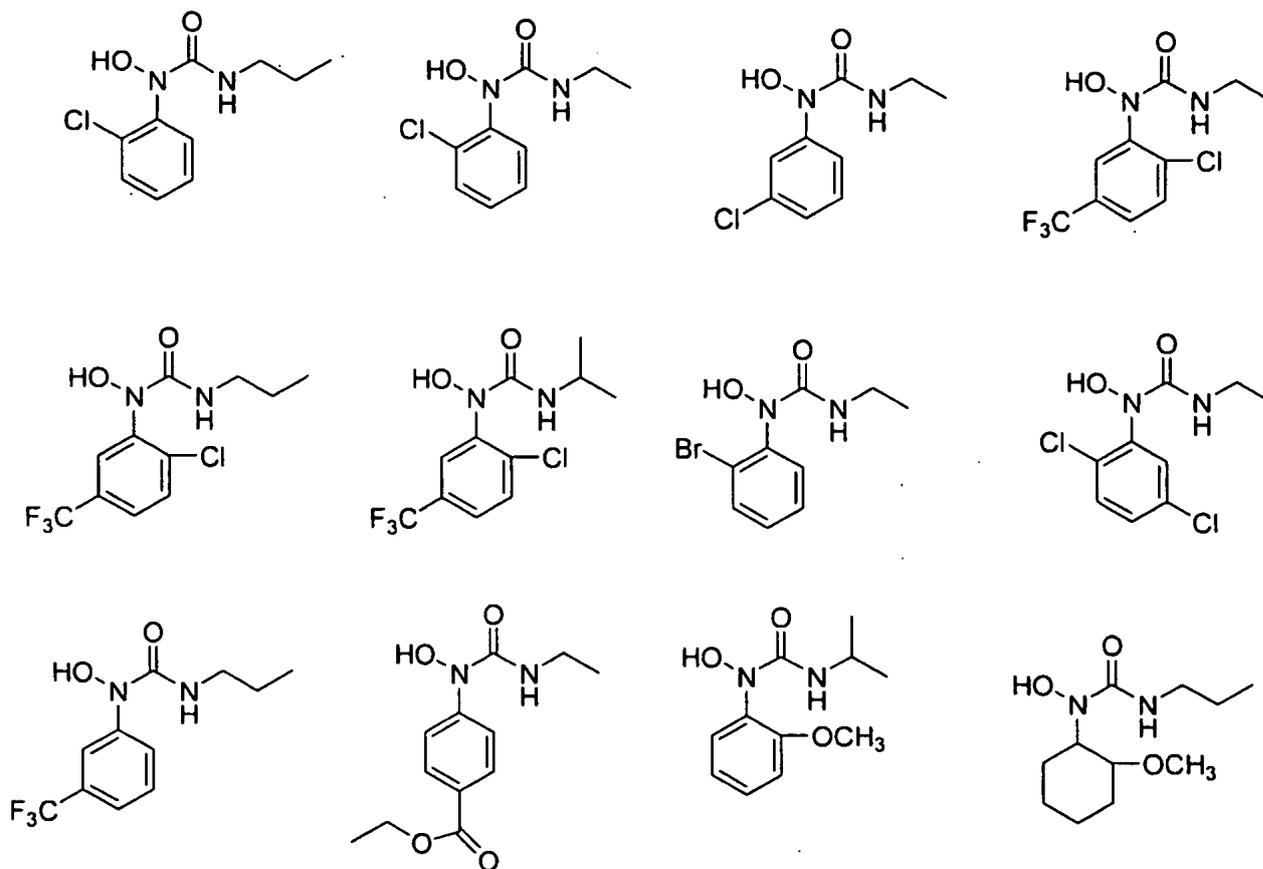
**Procedimientos**

- 20 En el presente documento se proporcionan procedimientos de tratamiento de papel o pulpa y/o destintado de papel. Por ejemplo, algunos procedimientos para los procesos de pulpa o papel para, por ejemplo, despolimerizar la lignina y prevenir la decoloración de la pulpa causada por las ligninas. El tratamiento de papel, pulpa y composiciones que contienen lignina se describe en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.179.021. 5.116.746.5.407.827.5.405.769.5.395.765. 5.369.024. 5.457.045. 5.434.071.5.498.534. 5.591.304. 5.645.686.
- 25 5.725.732. 5.759.840. 5.834.301. 5.871.730 6.057.438. 5.486.468 y 5.770.012.

En algunas realizaciones, una composición que comprende lignina (p. ej., pulpa de madera) se pone en contacto con al menos un compuesto de Fórmula I o Fórmula II en condiciones en las que la lignina se despolimeriza, se ablanda o de licúa. Preferentemente, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina se pone en contacto con uno de los compuestos siguientes, o con cualquier combinación de los mismos:

30





5 El experto en la técnica puede determinar fácilmente la concentración final del compuesto (p. ej., el compuesto de Fórmula I o Fórmula II). En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula I o Fórmula II se proporciona a una concentración final de 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM, 1 M, 2 M, 5 M o superior, o cualquier número entre ellos.

10 En algunas realizaciones, papel, la pulpa o la composición que contiene lignina también se puede poner en contacto con un mediador seleccionado de uno o más de los siguientes: ácido violúrico; 2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxifalimida, 3-Hidroxi3,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); y ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB); o cualquier combinación de los mismos.

15 Preferentemente, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina se tratan en condiciones alcalina, tal como a un pH de 7,25, 7,5, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9,0, 9,25, 9,5, 9,75, 10,0, 10,25, 10,5, 10,75, 11, o superior.

20 En algunas realizaciones, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina se tratan a temperaturas superiores a 22 °C, por ejemplo 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, o superiores, o cualquier número entre ellos. En realizaciones preferidas, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina se tratan a temperaturas superiores a 60 °C, tales como de 65 °C a 70 °C o superiores. De acuerdo con esto, en realizaciones, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina se tratan a una temperatura entre 65 °C y 75 °C, a un pH de 8 o superior, tal como a un pH de 9, 9,5 o 10 o más.

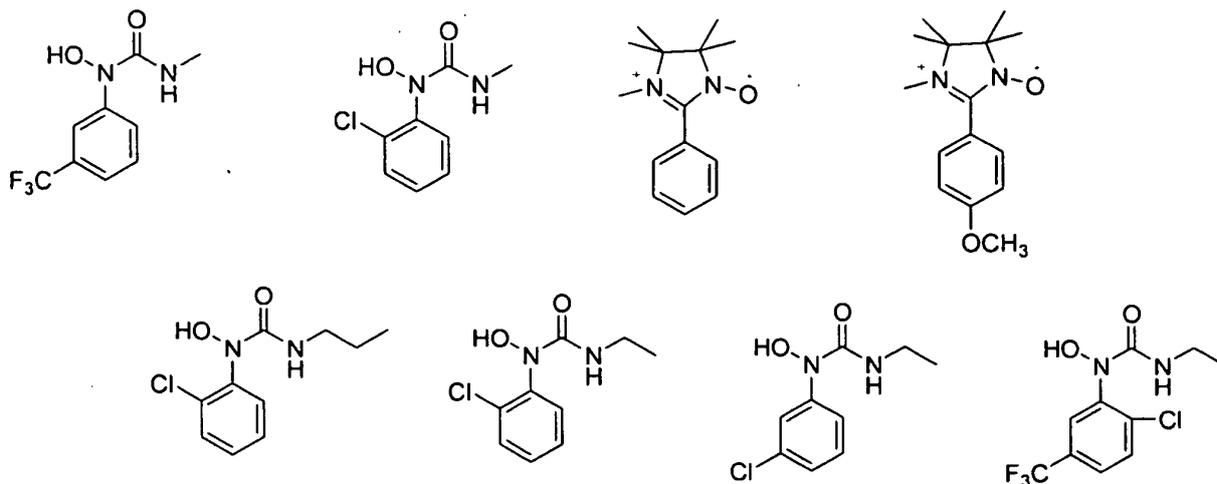
25 En algunas realizaciones, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina también se ponen en contacto con una lacasa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina también se ponen en contacto con un polipéptido de lacasa descrito en el presente documento, tal como un polipéptido de SEC ID N° 4 o variantes del mismo. No obstante, se apreciará que las lacasas conocidas

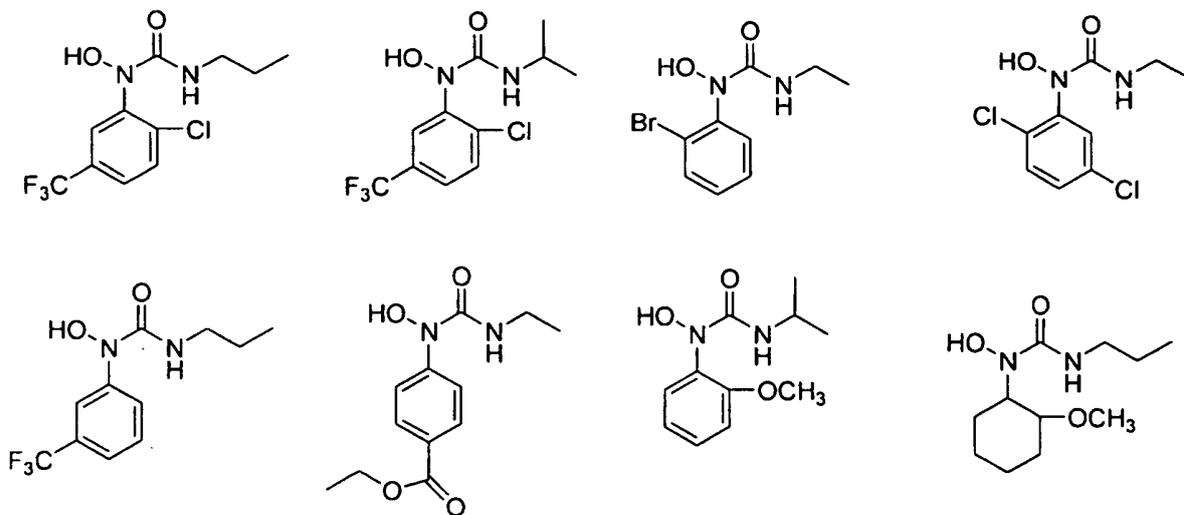
actualmente (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5,480,801 y la patente de EE.UU. número de serie 10/567,536 ) o de la SEC ID N° 2, o variantes de la misma, que se vayan a descubrir en el futuro, son útiles en los procedimientos descritos en el presente documento. Preferentemente, la lacasa es una lacasa alcalina termoestable.

5 En algunas realizaciones, el tratamiento del papel, la pulpa o la composición que contiene lignina también puede incluir el uso de cualquier combinación de otras enzimas, tales como catalasas, celulasas, endoglicosidasas, endo-beta-1,4-lacasas, amiloglucosidasas, isomerasas de glucosa, glicosiltransferasas, lipasas, fosfolipasas, lipoxigenasas, beta-lacasas, endo-beta-1,3(4)-lacasas, cutinasas, peroxidasas, amilasas, glucoamilasas, pectinasas, reductasas, oxidasas, descarboxilasas, fenoloxidasas, ligninasas, pululanasas, arabinasas, hemicelulasas, mananasas, xilolacasas, xilanasas, pectinacetilsterasas, ramnogalacturonanacetilsterasas, proteasas, peptidasas, proteinasas, poligalacturonasas, ramnogalacturonasas, galactanasas, pectina liasas, transglutaminasas, pectina metilesterasas, celobiohidrolasas y/o transglutaminasas.

15 Otras realizaciones proporcionan procedimientos de oxidar, degradar o romper la composición que contiene lignina poniendo en contacto la composición que contiene lignina con uno o más de los polipéptidos de lacasa divulgados en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición que contiene lignina se puede poner en contacto con un polipéptido que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el polipéptido de SEC ID N° 4 o cualquier variante de la misma.

20 En algunas realizaciones, la composición que comprende lignina (p. ej., pulpa de madera) también se pone en contacto con al menos un compuesto de Fórmula I o Fórmula II en condiciones en las que la lignina se despolimeriza, se ablanda o de licúa. Preferentemente, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina se pone en contacto con uno de los compuestos siguientes, o con cualquier combinación de los mismos:



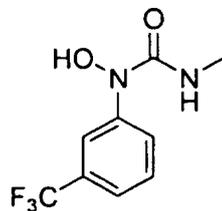


5 En algunas realizaciones, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina también se pueden poner en contacto con un mediador seleccionado de uno o más de los siguientes: ácido violúrico; 2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxifalimida, 3-Hidroxi3,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); y ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB); o cualquier combinación de los mismos.

10 Preferentemente, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina se tratan en condiciones alcalina, tal como a un pH de 7,25, 7,5, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9,0, 9,25, 9,5, 9,75, 10,0, 10,25, 10,5, 10,75, 11, o superior.

15 En algunas realizaciones, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina se tratan a temperaturas superiores a 22 °C, por ejemplo a aproximadamente 25 °C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, o superiores, o cualquier número entre ellos. En realizaciones preferidas, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina se tratan a temperaturas superiores a 60 °C, tales como de 65 °C a 70 °C o superiores. De acuerdo con esto, en realizaciones, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina se tratan a una temperatura entre 65 °C y 75 °C, a un pH de 8 o superior, tal como a un pH de 9, 9,5 o 10 o más.

20 Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto que comprende lignina se pone en contacto con el polipéptido de la SEC ID N° 4 o variantes del mismo, y



(Mediador 71) en condiciones alcalinas, por ejemplo a pH 8 o superior. En algunas realizaciones, el tratamiento procede a una temperatura de 55°C - 70°C-

25 Otras realizaciones se refieren a procedimientos de oxidar un sustrato fenólico o aromático. El sustrato fenólico se puede poner en contacto con un compuesto de Fórmula I o II. En realizaciones preferidas, uno o más de los siguientes: ácido violúrico; 2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-

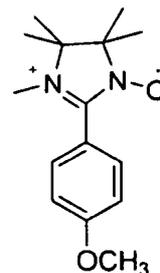
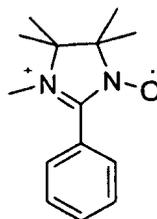
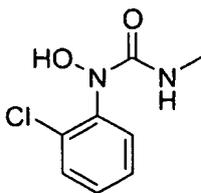
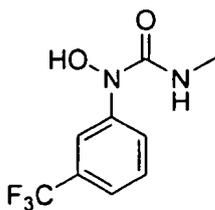
hidroxiftalimida, 3-Hidroxi3,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); y ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB); o cualquier combinación de los mismos.

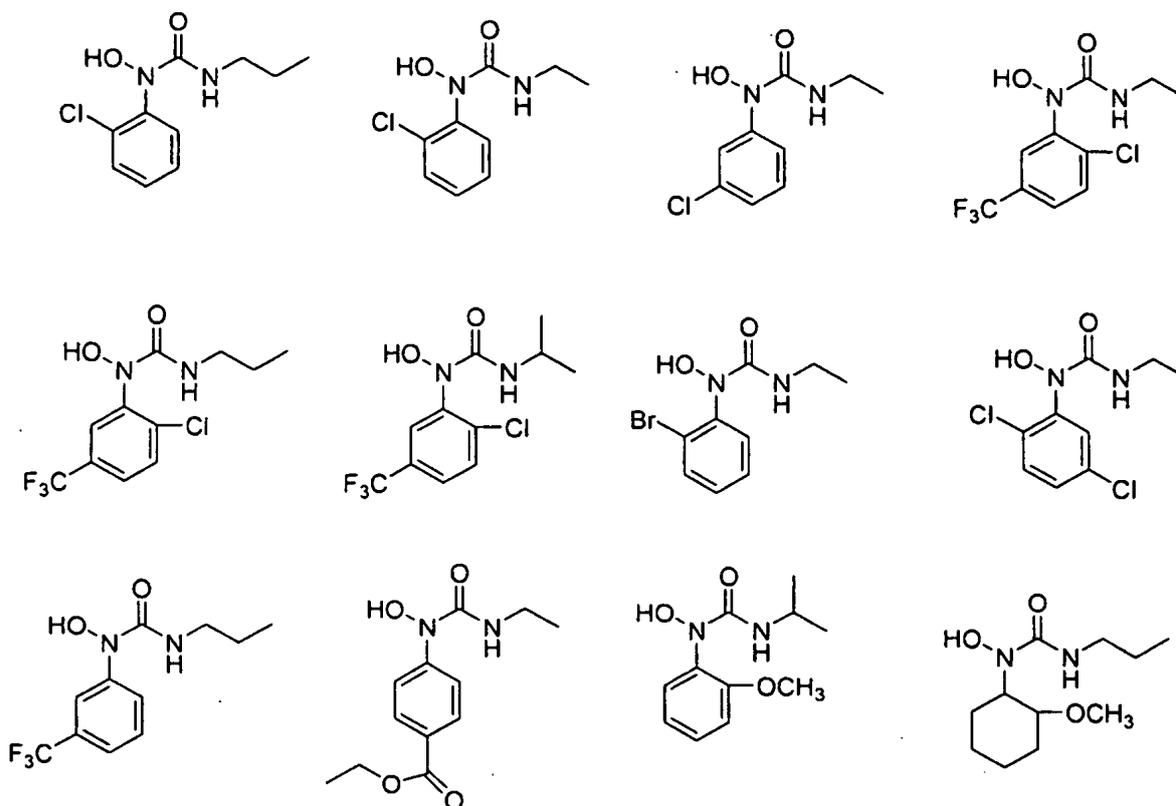
5 Preferentemente, el sustrato fenólico se trata en condiciones alcalina, tal como a un pH de 7,25, 7,5, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9,0, 9,25, 9,5, 9,75, 10,0, 10,25, 10,5, 10,75, 11, o superior.

10 En algunas realizaciones, el sustrato fenólico se trata a temperaturas superiores a 22 °C, por ejemplo a 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, o superiores, o cualquier número entre ellos. En realizaciones preferidas, el sustrato fenólico se trata a temperaturas superiores a 60 °C, tal como 65 °C a 70 °C o superiores. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, el sustrato fenólico se trata a una temperatura entre 65 °C y 75 °C, a un pH de 8 o superior, tal como a un pH de 9, 9,5 o 10 o más.

15 En el presente documento también se proporcionan procedimientos para oxidar una composición que contiene fibra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición que contiene fibra se puede poner en contacto con un polipéptido que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el polipéptido de SEC ID N° 4 o cualquier variante del mismo.

En algunas realizaciones, la composición que comprende fibra también se pone en contacto con al menos un compuesto de Fórmula I o Fórmula II. Preferentemente, la composición que contiene fibra se pone en contacto con uno de los compuestos siguientes, o con cualquier combinación de los mismos:





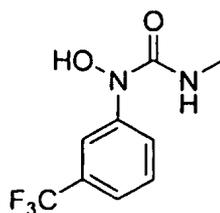
5 En algunas realizaciones, la composición que contiene fibra también se puede poner en contacto con un mediador seleccionado de uno o más de los siguientes: ácido violúrico; 2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxifalimida, 3-Hidroxi3,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); y ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB); o cualquier combinación de los mismos.

10 Preferentemente, la composición que contiene fibra se trata en condiciones alcalinas, tal como a un pH de 7,25, 7,5, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9,0, 9,25, 9,5, 9,75, 10,0, 10,25, 10,5, 10,75, 11, o superior.

15 En algunas realizaciones, la composición que contiene fibra se trata a temperaturas superiores a 22 °C, por ejemplo 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, o superiores, o cualquier número entre ellos. En realizaciones preferidas, la composición que contiene fibra se trata a temperaturas superiores a 60 °C, tales como de 65 °C a 70 °C o superiores. De acuerdo con esto, en realizaciones, el papel, la pulpa o la composición que contiene lignina se tratan a una temperatura entre 65 °C y 75 °C, a un pH de 8 o superior, tal como a un pH de 9, 9,5 o 10 o más.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto que comprende fibra se pone en contacto con el polipéptido de la SEC ID N° 4 o variantes del mismo, y

20



(Mediador 71) en condiciones alcalinas, por ejemplo a pH 8 o superior. En algunas realizaciones, el tratamiento procede a una temperatura de 55°C - 70°C-

5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de una unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de dicho intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en dicho intervalo indicado, entra dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden incluirse de forma independiente en los intervalos más pequeños y también entran dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o los dos límites incluidos también están incluidos en la invención.

10 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la presente invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen procedimientos y materiales ilustrativos representativos.

Habiendo descrito la presente invención en general, la misma se entenderá mejor con referencia a determinados ejemplos específicos, que se incluyen en el presente documento con fines ilustrativos únicamente y no se pretende que sean limitantes a menos que se especifique lo contrario.

#### Ejemplo 1: Aislamiento de genes de lacasa fúngica

20 El ejemplo siguiente describe el aislamiento de genes de lacasa fúngica. Se obtuvo un conjunto de cepas fúngicas de un ambiente de pH alto (pH  $\geq$  8). Se construyó un árbol filogenético usando secuencias de ácido nucleico disponibles para el público, así como secuencias genómicas determinadas a partir del conjunto de cepas fúngicas. El árbol filogenético de secuencias de Cu-oxidasa SWISSPROT™ Pfam HMM y predicciones génicas de genomas fúngicos muestra cinco clados principales: lacasas de *Viridiplantae*, varias funciones de varias fuentes, lacasas de Ascomycetos, lacasas de Artrópodos y lacasas de Basidiomycetos.

25 Se usaron alineaciones de secuencia para identificar secuencias conservadas de subclados de Ascomycetos y Basidiomycetos, que incluye *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium verticillioides* y *Botrytis cinerea* 1. Los cebadores degenerados diseñados basados en las secuencias conservadas para amplificar fragmentos de ADN en el intervalo de 0,5-1 kilobases (kb). Se aisló el ADN cromosómico de cepas fúngicas usando protocolos de rutina y se usó como molde en reacciones de PCR con los cebadores degenerados.

30 Los productos de PCR en el intervalo de tamaño de 0,5-1 kilobases (kb) se clonaron y secuenciaron para conformar la amplificación de los fragmentos génicos de lacasa. Los fragmentos de ADN que se ha confirmado que son genes de lacasa se extendieron con varias amplificaciones de PCR adicionales usando técnicas de biología molecular de rutina para obtener genes de longitud completa. El análisis de la secuencia se realizó para determinar supuestos genes de lacasa de longitud completa, codones de iniciación/terminación y uniones de intrón/exón. Un total de 36 genes de lacasa de longitud completa se descubrieron de aislamientos de Ascomycetos y 5 genes lacasa de longitud completa de aislamientos de Basidiomycetos.

35 Las secuencias se alinearon usando el algoritmo BLAST frente a la base de datos no redundante del NCBI. Los pares de puntuación alta (HSP) correspondían aproximadamente a los exones que se alinearon bien con secuencias de lacasa conocidas por el público y se extendieron manualmente o truncaron hasta los límites correctos de exón/intrón. Los exones que faltaban en el extremo 5' del gen se buscaron mediante inspección visual de las 3 traducciones del marco de la secuencia del clon para identificar el codón de iniciación más probable.

40 Los posibles genes de lacasa de *Cochliobolus*, *Fusarium* y *Botrytis* localizados en el clado de Ascomycetos se usaron para análisis posterior.

Ejemplo 2: Subclonación y expresión de lacasa

Las secuencias de codificación para las lacasas candidatas determinadas anteriormente se clonaron en un vector de expresión que es capaz de integrarse en el genoma de *Aspergillus niger* mediante recombinación homóloga, de un modo tal que las secuencias de codificación estuvieran unidas operablemente a un promotor de glucoamilasa.

5 Tras transformación en protoplastos mediada por PEG, los transformantes que contenían el casete de expresión se seleccionaron usando un marcador seleccionable también presente en el vector. Las secuencias del péptido señal nativo de los genes de lacasa se indujeron en la construcción.

10 Tras la verificación de la secuencia, las construcciones se usaron para transformar *Aspergillus niger*, seleccionando en medio de regeneración selectivo para el uso de acetamida como única fuente de nitrógeno. Seis transformantes de cada candidato se sembraron en medio selectivo para colonias sencillas y se cultivaron durante cinco días a 30 °C. Después, una única colonia de cada cepa se sembró en agar dextrosa de patata (PDA) para colonias sencillas, tras lo cual se seleccionó una colonia y se sembró para crecimiento confluyente en PDA (que incluía CuSO<sub>4</sub> 0,5 mM en el PDA usado para la esporulación). Para cada transformante se recuperó una suspensión de esporas y se usó para inocular cultivos de inicio con CSL-Seclina. Después de crecimiento durante la noche, los cultivos iniciales se usaron para inocular matraces con deflectores CSM/MES. Los cultivos CSM/MES se cultivaron a 30 °C durante cinco días.

20 Para verificar que los transformantes de *Aspergillus* expresaban y secretaban una proteína con actividad lacasa, las muestras de sobrenadante del cultivo se analizaron para determinar la capacidad de oxidar el ácido 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) a pH 5,2. Brevemente, una muestra de 1 ml del cultivo se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos. A 180 µl de ABTS 1 mM en acetato sódico 50 mM a pH 5,3 se añadieron 20 µl del sobrenadante del cultivo en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La actividad lacasa se mide siguiendo el Δ de la A420 nm/min con un espectrofotómetro. Una unidad de ABTS es la cantidad de lacasa que da como resultado 1 cambio de unidad de absorbancia en un minuto. Los transformantes que proporcionaron el mayor rendimiento de lacasa en el sobrenadante se usaron para análisis posteriores.

25 Ejemplo 3: Determinación del pH óptimo en siringaldazina mediante lacasas candidatas

Para determinar el pH óptimo de las lacasas expresadas en *Aspergillus*, las lacasas se analizaron para determinar su actividad en un mediador de bajo potencial redox siringaldazina (SGZ) en un intervalo de pH de 4-11 a temperatura ambiente. Los índices iniciales para cada lacasa en SGZ se midieron a temperatura ambiente a un intervalo de pH de 4-11. La oxidación de SGZ se determinó en tampón de Britten-Robinson, a pH 5,0 a 11,0, con etanol al 10 % (procedente de la solución de reserva de SGZ) monitorizando el cambio de absorbancia a 530 nm con un coeficiente de extinción de 65 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Bauer y Rupe, 1971, Analytical Chemistry 43: 421-425) a temperatura ambiente. La actividad lacasa usando SGZ como sustrato se analizó mezclando 800 µl de tampón de ensayo (CuSO<sub>4</sub> 40 µM – acetato sódico 25 mM, pH 5,5) con 20 µl de sobrenadante del cultivo aislado como se describe en el Ejemplo 2 y 60 µl de siringaldazina 0,28 mM en etanol al 50%. La absorbancia a 530 nm se midió en el tiempo en un espectrofotómetro UV-VIS.

35 Se analizaron más de treinta lacasas. La mayoría de las lacasas candidatas analizadas mostró la actividad más alta en un intervalo ácido (pH<sub>opt</sub> 4 - 6). No obstante, dos lacasas (BD22449 de *Cochliobolus heleroslrophus* y BD22865 de *Fusarium verlicillioides*) exhibieron un pH<sub>opt</sub> ≥ 8 sobre SGZ. Las dos lacasas se analizaron adicionalmente.

40 Ejemplo 4: Oxidación de TEMPO, ácido violúrico y HBT por las lacasas candidatas

Las lacasas que exhibían un pH<sub>opt</sub> ≥ 8 sobre SGZ como se describe en el Ejemplo 3 se caracterizaron además analizando su capacidad para oxidar 2, 2, 6, 6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO) a pH 8 a temperatura ambiente. Brevemente, 50 µl de los sobrenadantes del cultivo de ensayo aislados como se describe en el Ejemplo 2 se incubaron con 950 µl de TEMPO (1 mM en tampón Britton-Robinson a pH 8) a 22°C en un instrumento de medición de oxígeno OXYTHERM™ (Hansatech, Inglaterra). El consumo de oxígeno se midió en el tiempo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

50 BD22449 (SEC ID N° 2) no mostró oxidación de TEMPO a pH 8 a temperatura ambiente. BD22865 (SEC ID N° 4) mostró oxidación de TEMPO con un índice de consumo de oxígeno de 250 nmol/min/mg. También se analizó la capacidad de BD22865 (SEC ID N° 4) para oxidar mediadores con potenciales redox mayores, tales como ácido violúrico y 1-hidroxibenzotriazol (HBT) a pH 8 a temperatura ambiente. Brevemente, 50 µl de BD22865 los sobrenadantes del cultivo aislados como se describe en el Ejemplo 2 se incubaron con 950 µl de ácido violúrico (1 mM en tampón Britton-Robinson a pH 8) o HBT 1 mM en tampón Britton-Robinson a pH 8 a 22°C en un instrumento de medición de oxígeno OXYTHERM™. El consumo de oxígeno se midió como se ha descrito en lo

que antecede. La SEC ID N° 4 (BD22865) pudo oxidar tanto el ácido violúrico como el HBT con índices de consumo de oxígeno de 150 nmol/min/mg y 100 nmol/min/mg, respectivamente, en las condiciones descritas en el presente documento. Estos resultados indican que BD22865 es una lacasa con alto potencial redox y BD22449 es una lacasa con potencial redox medio.

#### 5 Ejemplo 5: Oxidación de los mediadores capaces de oxidar la lignina

(3-(3'-trifluorometilfenil)-3-hidroxi-1-metilurea), "Mediador 71", es capaz de designificar la pulpa. El Mediador 71 se identificó como el mediador 71 más eficiente a pH 5 y pH 8. BD22449 (SEC ID N° 2), BD22865 (SEC ID N° 4) y la lacasa de *Trametes versicolor* (usada como control) se analizaron para determinar su capacidad para oxidar el mediador 71 a pH 8 usando electrodo de oxígeno. Brevemente, 50 µl de los sobrenadantes del cultivo aislados de BD22449 o BD22865 como se describe en el Ejemplo 2 se incubaron con 950 µl del Mediador 71 disueltos en tampón Britton-Robinson hasta una concentración final de 1 mM a pH 8. El consumo de oxígeno se midió a temperatura ambiente en un instrumento de medición de oxígeno OXYTHERM™ en el tiempo como se ha descrito anteriormente. Los resultados de los experimentos se muestran en las **Figuras 1, 2 y 3**. La lacasa de *Trametes* no oxidó el mediador 71 a pH 8, mientras que las lacasas BD22449 y BD22865 tenían actividades específicas de 677 nmol/min/mg y 1350 nmol/min/mg, respectivamente (actividades específicas para la preparación de lacasa, no para la proteína purificada).

Después, se determinó el pH<sub>opt</sub> para la catálisis de la oxidación del Mediador 71 para cada lacasa. Brevemente, 50 µl de los sobrenadantes del cultivo aislados de BD22449 o BD22865 como se describe en el Ejemplo 2 se incubaron con 950 µl del Mediador 71 disueltos en tampón Britton-Robinson hasta una concentración final de 1 mM a pH 5, 6, 7, 8, 9, o 10. El consumo de oxígeno en 20 minutos se determinó a temperatura ambiente en un instrumento de medición de oxígeno OXYTHERM™ en el tiempo como se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentaron en la **Figura 4**. Tanto BD22865 como BD22849 exhibieron oxidación óptima del Mediador 71 a pH 8. Por el contrario, la lacasa de *Trametes* no tenía actividad sobre el Mediador 71 a pH 7 o superior.

#### 25 Ejemplo 6: Termotolerancia de las lacasas fúngicas

Las lacasas BD22449 y BD22865, identificadas y caracterizadas en los Ejemplos 1-5 anteriores, se analizaron para determinar la termotolerancia. Brevemente, cada lacasa se analizó a 50 °C, 60 °C y 70 °C durante 0-60 minutos, en los que se midió la actividad residual sobre ABTS. Los sobrenadantes de los cultivos de *Aspergillus* que expresan BD22449 (SEC ID N° 2) y BD22865 (SEC ID N° 4) se aislaron como se describe en el Ejemplo 2. Los sobrenadantes se incubaron a 50°C, 60°C o 70°C durante 1 min, 5 min, 10 min, 30 min y 60 min. Para cada punto de tiempo, la oxidación de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) por la lacasa se midió usando un instrumento de medición de oxígeno OXYTHERM™.

Los resultados se muestran en las Figuras 5A-C. Tanto las lacasas BD22449 (SEC ID N° X) como BD22865 (SEC ID N° X) toleraron bien una exposición a calor a 50 °C durante una hora, pero la lacasa de *Trametes* se alteró algo (datos no mostrados). A 60 °C, BD22449 no se alteró durante una hora. BD22865 tenía una semivida a 60 °C de ~40min y la lacasa de *Trametes* de < 5 min. Una exposición a 70 °C desnaturalizó rápidamente las tres lacasas.

BD22449 permaneció aproximadamente un 100 % activa tras una hora a 60 °C, que probablemente es la temperatura más alta a la que estaría expuesta una lacasa en la etapa D(0) (punto más probable de aplicación de lacasa). BD22865 permaneció aproximadamente un 40% de activa tras una hora a 60 °C; no obstante, tenía aproximadamente el doble de actividad específica sobre el Mediador 71 en comparación con BD22449.

#### 40 Ejemplo 7: Cinética de la actividad de la lacasa fúngica

Se determinó la cinética de la catálisis de la oxidación del Mediador 71 por las lacasas fúngicas descritas anteriormente. Usando el instrumento de medición de oxígeno OXYTHERM™ se midieron los índices de consumo de oxígeno a pH 8 a temperatura ambiente por BD22449 (SEC ID N° 2) y BD22865 (SEC ID N° 4) en diferentes concentraciones del mediador. Los resultados se muestran en la **figura 6**.

Ambas lacasas obedecían la cinética de Michaelis-Menten (o saturación). Ambas lacasas mostraron una cinética de saturación similar con respecto a la concentración del mediador 71: K<sub>M</sub> en el Mediador 71 fue ~ 500 µM para ambas lacasas. El índice máximo se consiguió a concentraciones del mediador superiores a ~ 2,5 mM y la K<sub>M</sub> fue de aproximadamente 500 µM para ambas lacasas principales. La K<sub>M</sub> para el oxígeno no se midió, pero a concentraciones del mediador superiores a 1 mM, ambas lacasas consumían con eficiencia todo el oxígeno en la cámara de reacción de electrodos de oxígeno. Esto indica una K<sub>M</sub> submicromolar sobre el oxígeno para ambas lacasas, ya que se oxidan 4 moléculas mediadoras por molécula de oxígeno y la concentración de oxígeno de

partida en la cámara de reacción era ~250 µM

Ejemplo 8: Deslignificación de la pulpa de madera con lacasa y mediador

5 Las lacasas BD22449 y BD22865, identificadas y caracterizadas en los ejemplos 1-5 anteriores, se analizaron para determinar la deslignificación de la pulpa de madera con el mediador 71. Brevemente, 1 gramo de pulpa de madera blanda se trató con 3 ml de cultivo de sobrenadante de BD22449 o BD22865 como se describe en el Ejemplo 2 con 50 mg del Mediador 71 a una consistencia del 5 % en tampón borato a pH 8 a 22 °C. Al tratamiento de lacasa/mediador le siguió la etapa de extracción con NaOH al 2,5 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2 % a 75 °C. De la pulpa tratada se fabricaron hojas de papel a mano y el incremento del brillo debido al tratamiento con lacasa/mediador se midió usando Brightmeter Micro S-5 (Technidyne Corp. New Albany, Indiana, EE.UU.). El incremento del brillo obtenido con BD22449 y BD22865 con el Mediador 71 fue ~ 30 % (datos no mostrados).

Ejemplo 9: Oxidación de C6 en glucopiranosido con lacasa y mediador

15 La lacasa BD22865, identificada y caracterizada en los ejemplos 1-5 anteriores, se analiza para determinar la oxidación de glucopiranosido con el mediador TEMPO. 14,25 unidades de ABTS de BD22865 se incuban en TEMPO 12 mM, 1 mg/ ml de glucopiranosido en tampón borato 50 mM a pH 8 durante 16 horas a 22 °C. La mezcla de reacción se diluye a 1:100 y se somete a cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en una columna C18 Agilent usando H<sub>2</sub>O:acetonitrilo (60:40) como fase de carrera a una velocidad de 1 ml/min. La formación del glucopiranosido oxidado debido al tratamiento con lacasa/TEMPO se detecta identificando la forma carboxilato en espectros CLEM/EM.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VERENIUM CORPORATION

Janne Samuli Kerovu

Sylke Haremza

Oliver Koch

25 Tilo Habicher

Dan Robertson

Greace DeSantis

Ryan McCann

Peter Luginbuhl

30

<120> LACASAS PARA BIOBLANQUEO DE PULPA

<130> DIVERSA.014VPC

35 <140> PCTUS0719124

<141> 2007-09-20

<150> 60/824,402

<151> 2006-09-01

ES 2 380 605 T3

<160> 4

<170> FastSEQ para la versión 4.0 de Windows

5

<210> 1

<211> 2105

<212> DNA

<213> Cochliobolus heterotrophus

10

<400> 1

```

atggtctctt caatttcgag ggtgggttacc gcccttgggc ttcttttgcc cactgtcact 60
tcatctggtg tacctcataa aagtctcgcc cccagaacac cggaggttcc ttggaagaac 120
actggtctct tcagtgagaca cagcaaacga caaggatag agactgcctg taatcatggt 180
ccagaatcaa gaggatgctg gattgacgac ttcaacatcg acaccgacat ggatggtgaa 240
tggccagata ctgaaagac agtcaagtat cacctgacca tcaccaatac cactggagct 300
ccagacgggt ttgaaaggcc gatggtcttg attaatggcc aataccagg accagtaagt 360
gctgtgttaa aatgccaata attcttttct aatgagtcac agactattac tgccgactgg 420
ggagatgttc tagagatcac agttaccaat ggccttgaaa acaacggtag aggtatacat 480
tggcacggtc tgaggcaact cgggacaaaac gaacaagatg gcgtaaatgg tatcactgaa 540
tgcccaatcg caccgggtga ctccaagctc tacagattca aagcaactca atatggcact 600
accgtaagta tcacacactg tgtgtgtatg acatgtttcc ggaagacggc taaccgctac 660
agtgtatca ctgcactac tcgggtgagc atgggtgacgg catcgtgggt cctctgatca 720
tcaaaggacc ctcaacggcg aactacgata ttgatcttgg cgctttccca atgactgact 780
ggtttcacgc aaccaccttc accgtcaacg ctgcagccgt tcatgaaat ggcctccaa 840
ctgctgacaa tgtccttgc aatggctcca tgacctcatc ttttggcggc aagtacgccc 900
aaacgatcct aactccggga aaatctcact tgctgcgttt gatgaacggt ggtattaaca 960
actaccttca tgtcggctc gatgggcctc agttccaggc catttcggct gatttcacgc 1020
ccattgaacc tttctacagc gacagcttgg tccttgcagt cggttaagttg aaccgaagtt 1080
gtgtccagat gcaagcccgt tttgtttatc acaacatcgt tctgtgtgac gacaccccgg 1140
ccacgagaat gtagtcaaaa tagccactgt tgatgaacgt ttcactaaca acgtcgccag 1200
gtcaacggta tgaagtcac atcaacgcaa ctgaagctgt gggcaactac tggctacgtg 1260
ttggtaccgg cggtaactgc gacgggtcca atgccaatgc agcaaatatc aggagtatct 1320
tccgatatgc tggcgctcca actgaagacc cagacacgac tggttcgctt ccgtcgggct 1380
gctacgatga ggatgttga ccctatgcc aagacgactgt tcctcaggag atgcccgaac 1440
agttgagcgt gggcttcaac cctaactgga ctagtacgt gacgcaaat caggtctgg 1500
tccaatggct cgtcaacggc aatcccatgg cagttgatct tgaagtcct actctgcagt 1560
cgggtgttga tggcaatgt acctacggaa acaaccgcca cgtgtttgca gtcgacgaga 1620

```

```

aacaccaagt aagtcgtccc ctgtacttag tactgtttaa tggtcattaa caaaggcttc 1680
agtggcaata ttgggtcatc caacaaaaca gttctaacc accacttctt caccatcc 1740
acctccacgg ccacgacttc tacgtcctcg cacaggctga aaacgcagtc tggaacggag 1800
atatttcaac cctgaagacg gacaacccca tccgtcggga cacggccgat cttcccgtg 1860
gaggctactt ggtccttgc ttcgagtcgg acaaccctgg cgcagggctt atgactgcc 1920
acatcccctt ccacgttgc gccggctcgc gtgtccagtt cctcgagcgc gaatccgaaa 1980
tcaaggccca agatggatgc gcagagatgc acaggacatg tgctaactgg cagtcagggc 2040
gctacaagta ccatcccaat ggcaccttgc tccccgggta ctctggtcta cgtcgtcgca 2100
actaa 2105

```

15

ES 2 380 605 T3

<210> 2

<211> 601

5 <212> PRT

<213> Cochliobolus heterostrophus

<400> 2

```

Met Val Ser Ser Ile Ser Arg Val Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Leu
 1      5      10      15
Pro Thr Val Thr Ser Ser Val Val Pro His Lys Ser Leu Ala Pro Arg
 20      25      30
Thr Pro Glu Val Pro Trp Lys Asn Thr Gly Leu Phe Ser Gly His Ser
 35      40      45
Lys Arg Gln Gly Tyr Glu Thr Ala Cys Asn His Gly Pro Glu Ser Arg
 50      55      60
Gly Cys Trp Ile Asp Asp Phe Asn Ile Asp Thr Asp Met Asp Val Glu
 65      70      75      80
Trp Pro Asp Thr Gly Lys Thr Val Lys Tyr His Leu Thr Ile Thr Asn
 85      90      95
Thr Thr Gly Ala Pro Asp Gly Phe Glu Arg Pro Met Phe Leu Ile Asn
 100     105     110
Gly Gln Tyr Pro Gly Pro Thr Ile Thr Ala Asp Trp Gly Asp Val Leu
 115     120     125
Glu Ile Thr Val Thr Asn Gly Leu Glu Asn Asn Gly Thr Gly Ile His
 130     135     140
Trp His Gly Leu Arg Gln Leu Gly Thr Asn Glu Gln Asp Gly Val Asn
 145     150     155     160
Gly Ile Thr Glu Cys Pro Ile Ala Pro Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Arg
 165     170     175
Phe Lys Ala Thr Gln Tyr Gly Thr Thr Trp Tyr His Ser His Tyr Ser
 180     185     190
Val Gln Tyr Gly Asp Gly Ile Val Gly Pro Leu Ile Ile Lys Gly Pro
 195     200     205
Ser Thr Ala Asn Tyr Asp Ile Asp Leu Gly Ala Phe Pro Met Thr Asp
 210     215     220
Trp Phe His Ala Thr Thr Phe Thr Val Asn Ala Ala Ala Val His Ala
 225     230     235
Asn Gly Pro Pro Thr Ala Asp Asn Val Leu Val Asn Gly Ser Met Thr
 245     250     255
Ser Ser Phe Gly Gly Lys Tyr Ala Glu Thr Ile Leu Thr Pro Gly Lys
 260     265     270
Ser His Leu Leu Arg Leu Met Asn Val Gly Ile Asn Asn Tyr Leu His
 275     280     285
Val Gly Leu Asp Gly His Gln Phe Gln Val Ile Ser Ala Asp Phe Thr
 290     295     300
Pro Ile Glu Pro Phe Tyr Thr Asp Ser Leu Val Leu Ala Val Gly Gln
 305     310     315     320
Arg Tyr Glu Val Ile Asn Ala Thr Glu Ala Val Gly Asn Tyr Trp
 325     330     335
Leu Arg Val Gly Thr Gly Gly Asn Cys Asp Gly Pro Asn Ala Asn Ala
 340     345     350
Ala Asn Ile Arg Ser Ile Phe Arg Tyr Ala Gly Ala Pro Thr Glu Asp

```

10

ES 2 380 605 T3

		355					360					365				
Pro	Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Leu	Pro	Ser	Gly	Cys	Tyr	Asp	Glu	Asp	Val	
	370					375					380					
Val	Pro	Tyr	Ala	Lys	Thr	Thr	Val	Pro	Gln	Glu	Met	Pro	Glu	Gln	Leu	
385						390				395					400	
Ser	Val	Gly	Phe	Asn	Pro	Asn	Trp	Thr	Ser	Asp	Val	Thr	Gln	Asn	Gln	
				405					410					415		
Gly	Leu	Val	Gln	Trp	Leu	Val	Asn	Gly	Asn	Pro	Met	Ala	Val	Asp	Leu	
			420					425					430			
Glu	Val	Pro	Thr	Leu	Gln	Ser	Val	Leu	Asp	Gly	Asn	Val	Thr	Tyr	Gly	
		435					440					445				
Asn	Asn	Arg	His	Val	Phe	Ala	Val	Asp	Glu	Lys	His	Gln	Trp	Gln	Tyr	
450					455						460					
Trp	Val	Ile	Gln	Gln	Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	Pro	Leu	Pro	His	Pro	Ile	
465					470				475						480	
His	Leu	His	Gly	His	Asp	Phe	Tyr	Val	Leu	Ala	Gln	Val	Glu	Asn	Ala	
				485					490					495		
Val	Trp	Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	Thr	Leu	Lys	Thr	Asp	Asn	Pro	Ile	Arg	
			500					505					510			
Arg	Asp	Thr	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Tyr	Leu	Val	Leu	Ala	Phe	
		515					520					525				
Glu	Ser	Asp	Asn	Pro	Gly	Ala	Trp	Leu	Met	His	Cys	His	Ile	Pro	Phe	
530					535						540					
His	Val	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Val	Gln	Phe	Leu	Glu	Arg	Glu	Ser	Glu	
545				550					555						560	
Ile	Lys	Ala	Gln	Asp	Gly	Tyr	Ala	Glu	Met	His	Arg	Thr	Cys	Ala	Asn	
				565					570					575		
Trp	Gln	Ser	Trp	Arg	Tyr	Lys	Tyr	His	Pro	Asn	Gly	Ile	Leu	Phe	Pro	
			580					585					590			
Gly	Asp	Ser	Gly	Leu	Arg	Arg	Arg	Asn								
		595					600									

<210> 3

<211> 1983

<212> ADN

5 <213> *Fusarium verticillioides*

<400> 3

ES 2 380 605 T3

atggctctca tcgagcgagt atggcacgcc tgcgtcagta tagtcgcatg gctaacaatg 60  
 tggccacat ctccatccac ctctaccaa catccccttc gcccacaacca tcctcacact 120  
 cacattgaag accccagccc tggcttcctt atctttcatt ccccgccagg tgatcatgag 180  
 ttctctgcg agtaccaga aatgacaggc tttgtgcaat gttcaatccc agagaacaga 240  
 gaatgttggc tgagacatcc tgatgggcca gagttcaaca ttcatactaa ctatgagaac 300  
 tttgcgcaa aggggattat gaggcattat acgcttaata ttacggagag ttggtataat 360  
 gctgatgggc agaactttac ggaggcaaag ttgttcaatg gggagtatcc tgggccttgg 420  
 cttgaggctt gttggggaga tacgttcaac attaccgtca taaacagtat gaagaggaat 480  
 ggcacaagta ttcactggca cggcattcgt cagaaccaga ccatggacat ggatggtgtc 540  
 aatggcatca ctcagtgtcc tattgcgcca ggtgatagct tcagctatat cttcaacacg 600  
 acgcagtacg ggacgtcgtg gtatcatagc cactactctg tgcaatatgc agatggtctc 660  
 caaggcccca tcacaattca tggccctcaa tctgcacctt atgatgccc caagaggcca 720  
 ctgctcatga cagattggtc tcacgagagc gcattcagac tgctcttccc aggtctctaa 780  
 ttctccaaca agaccatcct tctcaacggc gcaggcaacg tctcccacta cggctacacc 840  
 ccaactctgc ctatccctga taactatgag ttatacttca acaaaactcc aaccgacaag 900  
 ccaactcgcc ccaagagata cctgctccgc ctgatcaata cttcatttga ctcaacactc 960  
 gtcttttcca ttgataacca ctggcttcag atcgtcactt cagatttcgt tcccattgag 1020  
 ccgtacttca atacgtcggg ttgataggt atcggccaaa ggtacaacgt catcgttgaa 1080  
 gctaatactc tgggcggtga tgtcaatgag attccagatg atggaaactt ctggataagg 1140  
 acgtgggtcg ctgatgcatg cggtatagcc ccaggaggag aaggctatga aaagaccggc 1200  
 atcctacgat acaaccactc cgacaaggct cttccatctt ctcaaccttg ggtcaacatc 1260  
 agcaaggctt gttctgatga gacttatact tgcgtgagac ccaagattcc gtggtatatc 1320

ggcccagcgg ccaatgctca gaatggtgag aggttcaatg ttacttttga tccaaacgcc 1380  
 aagaatacgc ctgagttcca ggaagagtat ccagtcgcta cgtttggctt tcagagacct 1440  
 ggccagaact ttagaccact gcagattaat tactctgacc ctggtatggt taccctggac 1500  
 gaaccgaggg atacttaccg gccgaagtgg gtgggtgatcc cggaagatta tactgagaaa 1560  
 gaatgggtgt actttgttct cacgatagaa ggaatcagtg cgcgtactgg cgctcatccg 1620  
 attcaccttc acggccatga cttcgtctct ctgcaacaag aagagaacca aacctacgac 1680  
 ccaagcaggc ttaacttgaa gcttgataat ccaccaagac gtgatgtcgt tctgctaccc 1740  
 cgcaatggct ttgtagtgat tgcgttcaag gccgataacc cgggtatctg gcttatgcac 1800  
 tgtcacattg cgcgccatgc ctctgaaggg ttggctatgc aggtcctgga gagacaggga 1860  
 gattcgaata agttgttccc tgttggatcg cccaatatga ttgaggcaga gagggtttgt 1920  
 aaagtttggg agacgtggat ggatggggag aaggatttct ttgagggtga ctctggtatt 1980  
 taa 1983

5 <210> 4

<211> 660

<212> PRT

<213> *Fusarium verticillioides*

10 <400> 4

ES 2 380 605 T3

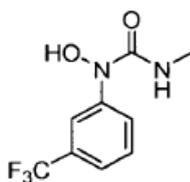
Met	Ala	Leu	Ile	Glu	Arg	Val	Trp	His	Ala	Cys	Val	Ser	Ile	Val	Ala
1				5					10					15	
Trp	Leu	Thr	Met	Trp	Pro	Thr	Ser	Pro	Ser	Thr	Ser	Tyr	Gln	His	Pro
			20					25					30		
Leu	Arg	Pro	Asn	His	Pro	His	Thr	His	Ile	Glu	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly
		35					40					45			
Phe	Pro	Ile	Phe	His	Pro	Pro	Pro	Gly	Asp	His	Glu	Phe	Leu	Cys	Glu
	50					55					60				
Tyr	Pro	Glu	Met	Thr	Gly	Phe	Val	Gln	Cys	Ser	Ile	Pro	Glu	Asn	Arg
65					70					75					80
Glu	Cys	Trp	Leu	Arg	His	Pro	Asp	Gly	Arg	Glu	Phe	Asn	Ile	His	Thr
				85					90					95	
Asn	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ala	Pro	Lys	Gly	Ile	Met	Arg	His	Tyr	Thr	Leu
			100					105					110		
Asn	Ile	Thr	Glu	Ser	Trp	Tyr	Asn	Ala	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe	Thr	Glu
		115					120					125			
Ala	Lys	Leu	Phe	Asn	Gly	Glu	Tyr	Pro	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Ala	Cys
	130					135					140				
Trp	Gly	Asp	Thr	Phe	Asn	Ile	Thr	Val	Ile	Asn	Ser	Met	Lys	Arg	Asn
145					150					155					160
Gly	Thr	Ser	Ile	His	Trp	His	Gly	Ile	Arg	Gln	Asn	Gln	Thr	Met	Asp
				165					170						175
Met	Asp	Gly	Val	Asn	Gly	Ile	Thr	Gln	Cys	Pro	Ile	Ala	Pro	Gly	Asp
			180					185					190		
Ser	Phe	Ser	Tyr	Ile	Phe	Asn	Thr	Thr	Gln	Tyr	Gly	Thr	Ser	Trp	Tyr
		195					200					205			
His	Ser	His	Tyr	Ser	Val	Gln	Tyr	Ala	Asp	Gly	Leu	Gln	Gly	Pro	Ile
	210					215					220				
Thr	Ile	His	Gly	Pro	Gln	Ser	Ala	Pro	Tyr	Asp	Ala	Thr	Lys	Arg	Pro
225					230					235					240
Leu	Leu	Met	Thr	Asp	Trp	Ser	His	Glu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Leu	Phe
				245					250						255
Pro	Gly	Ser	Gln	Phe	Ser	Asn	Lys	Thr	Ile	Leu	Leu	Asn	Gly	Ala	Gly
			260					265					270		
Asn	Val	Ser	His	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Pro	Thr	Leu	Pro	Ile	Pro	Asp	Asn
		275					280					285			
Tyr	Glu	Leu	Tyr	Phe	Asn	Lys	Thr	Pro	Thr	Asp	Lys	Pro	Thr	Arg	Pro
	290					295					300				
Lys	Arg	Tyr	Leu	Leu	Arg	Leu	Ile	Asn	Thr	Ser	Phe	Asp	Ser	Thr	Leu
305					310						315				320
Val	Phe	Ser	Ile	Asp	Asn	His	Trp	Leu	Gln	Ile	Val	Thr	Ser	Asp	Phe
				325						330					335

ES 2 380 605 T3

Val Pro Ile Glu Pro Tyr Phe Asn Thr Ser Val Leu Ile Gly Ile Gly  
 340 345 350  
 Gln Arg Tyr Asn Val Ile Val Glu Ala Asn Pro Leu Gly Gly Asp Val  
 355 360 365  
 Asn Glu Ile Pro Asp Asp Gly Asn Phe Trp Ile Arg Thr Trp Val Ala  
 370 375 380  
 Asp Ala Cys Gly Ile Ala Pro Gly Gly Glu Gly Tyr Glu Lys Thr Gly  
 385 390 395 400  
 Ile Leu Arg Tyr Asn His Ser Asp Lys Ala Leu Pro Ser Ser Gln Pro  
 405 410 415  
 Trp Val Asn Ile Ser Lys Ala Cys Ser Asp Glu Thr Tyr Thr Ser Leu  
 420 425 430  
 Arg Pro Lys Ile Pro Trp Tyr Ile Gly Pro Ala Ala Asn Ala Gln Asn  
 435 440 445  
 Gly Glu Arg Phe Asn Val Thr Phe Asp Pro Asn Ala Lys Asn Thr Pro  
 450 455 460  
 Glu Phe Gln Glu Glu Tyr Pro Val Ala Thr Phe Gly Leu Gln Arg Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Gln Asn Phe Arg Pro Leu Gln Ile Asn Tyr Ser Asp Pro Val Met  
 485 490 495  
 Phe His Leu Asp Glu Pro Arg Asp Thr Tyr Pro Pro Lys Trp Val Val  
 500 505 510  
 Ile Pro Glu Asp Tyr Thr Glu Lys Glu Trp Val Tyr Phe Val Leu Thr  
 515 520 525  
 Ile Glu Gly Ile Ser Ala Arg Thr Gly Ala His Pro Ile His Leu His  
 530 535 540  
 Gly His Asp Phe Ala Leu Leu Gln Gln Glu Glu Asn Gln Thr Tyr Asp  
 545 550 555 560  
 Pro Ser Arg Leu Asn Leu Lys Leu Asp Asn Pro Pro Arg Arg Asp Val  
 565 570 575  
 Val Leu Leu Pro Arg Asn Gly Phe Val Val Ile Ala Phe Lys Ala Asp  
 580 585 590  
 Asn Pro Gly Ile Trp Leu Met His Cys His Ile Ala Arg His Ala Ser  
 595 600 605  
 Glu Gly Leu Ala Met Gln Val Leu Glu Arg Gln Gly Asp Ser Asn Lys  
 610 615 620  
 Leu Phe Pro Val Gly Ser Pro Asn Met Ile Glu Ala Glu Arg Val Cys  
 625 630 635 640  
 Lys Val Trp Glu Thr Trp Met Asp Gly Glu Lys Asp Phe Phe Glu Gly  
 645 650 655  
 Asp Ser Gly Ile  
 660

## REIVINDICACIONES

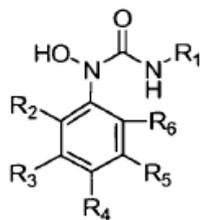
1. Un polipéptido aislado, que comprende: una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4, en la que dicho polipéptido aislado comprende actividad lacasa, oxida la lignina en condiciones de pH superior o igual a 8,0 y conserva actividad lacasa durante más de al menos 5 minutos a una temperatura superior o igual a 60 °C; y, además, tiene un pH de reacción óptimo  $\text{pH} \geq 8,0$  para la oxidación de siringaldazina (SGZ) a temperatura ambiente y/o tiene un pH de reacción óptimo de 8,0 para la oxidación de



(Mediador 71) a temperatura ambiente.

2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 que comprende al menos una sustitución de aminoácido, en el que la posición de la al menos una sustitución en la SEC ID N° 4 se selecciona del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 162, 163, 164, 166, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 208, 210, 212, 213, 214, 215, 216, 218, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 351, 352, 353, 354, 452, 454, 470, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 540, 541, 542, 545, 546, 547, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 597, 598, 599, 603, 604, 605, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 616, 618, 619 y 620, o cualquier combinación de los mismos.
3. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que carece de su péptido señal asociado.
4. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4
5. Un polinucleótido aislado, que comprende: una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% con la secuencia de la SEC ID N° 3, en la que dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene actividad lacasa, oxida la lignina en condiciones de pH superior o igual a 8,0 y conserva actividad lacasa durante más de al menos 5 minutos a una temperatura superior o igual a 60 °C; y que, además, tiene un pH de reacción óptimo  $\text{pH} \geq 8,0$  para la oxidación de SGZ a temperatura ambiente y/o tiene un pH de reacción óptimo de 8,0 para la oxidación del Mediador 71 a temperatura ambiente.
6. El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho polinucleótido aislado comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 4.
7. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 o el polinucleótido aislado de la reivindicación 5, en el que el polipéptido aislado o el polipéptido codificado tiene un pH de reacción óptimo de  $\geq 8,0$  para la oxidación de SGZ a temperatura ambiente.
8. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 o el polinucleótido aislado de la reivindicación 5, en el que el polipéptido aislado o el polipéptido codificado tiene un pH de reacción óptimo de 8,0 para la oxidación del Mediador 71 a temperatura ambiente.
9. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 o el polinucleótido aislado de la reivindicación 5, en el que el polipéptido aislado o el polipéptido codificado tiene un pH de reacción óptimo de  $\geq 8,0$  para la oxidación de SGZ a temperatura ambiente y un pH de reacción óptimo de 8,0 para la oxidación del Mediador 71.
10. Un procedimiento para mediar en la oxidación de un sustrato fenólico o aromático, que comprende: poner en contacto el sustrato fenólico con un mediador, en el que dicho mediador es un compuesto

representado por la Fórmula I o la Fórmula II, en el que la Fórmula I está representada por

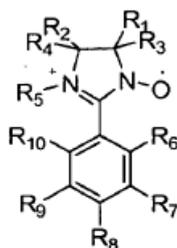


5

Fórmula (I)

en la que R<sub>1</sub> R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, alquilo, arilo, fenilo, CF<sub>3</sub>, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O)OCH<sub>3</sub>, COOH, OCH<sub>3</sub>, OH, O-, OCF<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NH(CH<sub>3</sub>), N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, Br y Cl, y en el que la Fórmula II está representado por

10



Fórmula II,

15

en la que R<sub>1</sub> R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub> se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, alquilo, arilo, fenilo, CF<sub>3</sub>, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O)OCH<sub>3</sub>, COOH, OCH<sub>3</sub>, OH, OCF<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NH(CH<sub>3</sub>), N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, Br y Cl, y que además comprende poner en contacto dicho sustrato fenólico o aromático con una lacasa seleccionada del grupo que consiste en:

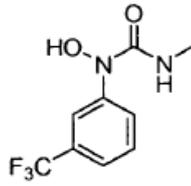
20

a) un polipéptido aislado que comprende la secuencia de SEC ID N° 4; y

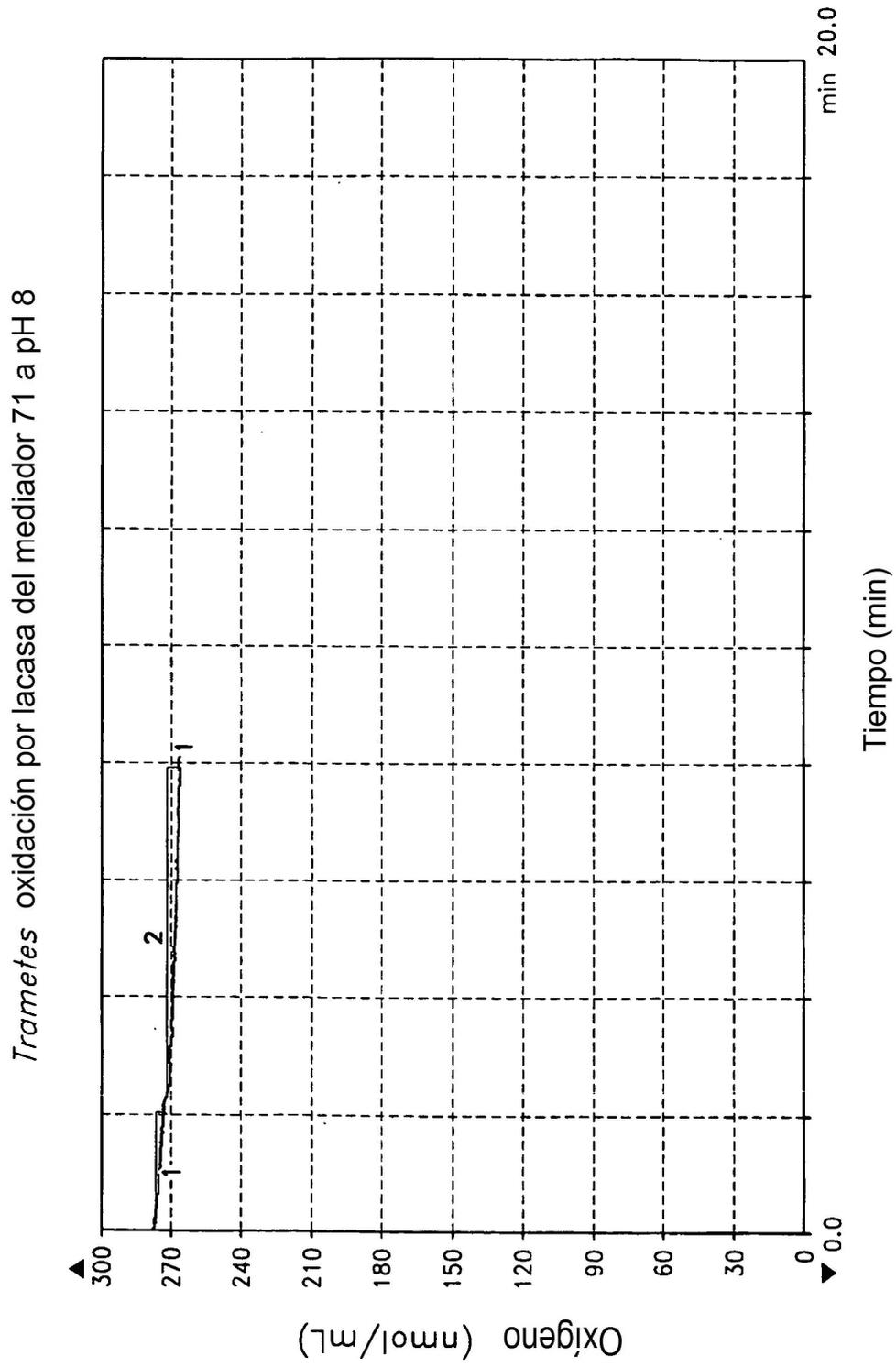
25

b) un polipéptido aislado que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con la SEC ID N° 4, en la que dicho polipéptido aislado comprende actividad lacasa, oxida la lignina en condiciones de pH superior o igual a 8,0 y conserva actividad lacasa durante más de al menos 5 minutos a una temperatura superior o igual a 60 °C; y que, además, tiene un pH de reacción óptimo pH ≥ 8,0 para la oxidación de SGZ a temperatura ambiente y/o tiene un pH de reacción óptimo de 8,0 para la oxidación del Mediador 71 a temperatura ambiente.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el mediador es



- 5
- 10
- 15
12. El procedimiento de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, que además comprende poner en contacto el sustrato fenólico o aromático con un mediador seleccionado del grupo constituido por: ácido violúrico; 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO); 1-hidroxibenzotriazol (HBT); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); siringaldazina; N-benzoil-N-fenil hidroxilamina (BPHA); N-hidroxiftalimida, 3-Hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4-ona; promazina; 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona; fenoxazina; antraquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; fenotiazina; antrona; antraceno; antrarufina; antrarobina; dimetoxifenol (DMP); ácido ferúlico; catequina; epicatequina; ácido homovanílico (HMV); y ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB); o cualquier combinación de los mismos.
  13. Un procedimiento de deslignificar una composición que comprende lignina, que comprende: poner en contacto dicho sustrato fenólico con el polipéptido aislado de la reivindicación 1.
  14. Un procedimiento de oxidar una composición que comprende fibra, que comprende: poner en contacto dicha composición con el polipéptido aislado de la reivindicación 1.
  15. Un procedimiento de blanqueo de una composición que comprende pulpa o papel, que comprende: poner en contacto dicha composición con el polipéptido aislado de la reivindicación 1.



*FIG. 1*

BD22559 oxidación por lacasa del mediador 71 a pH 8

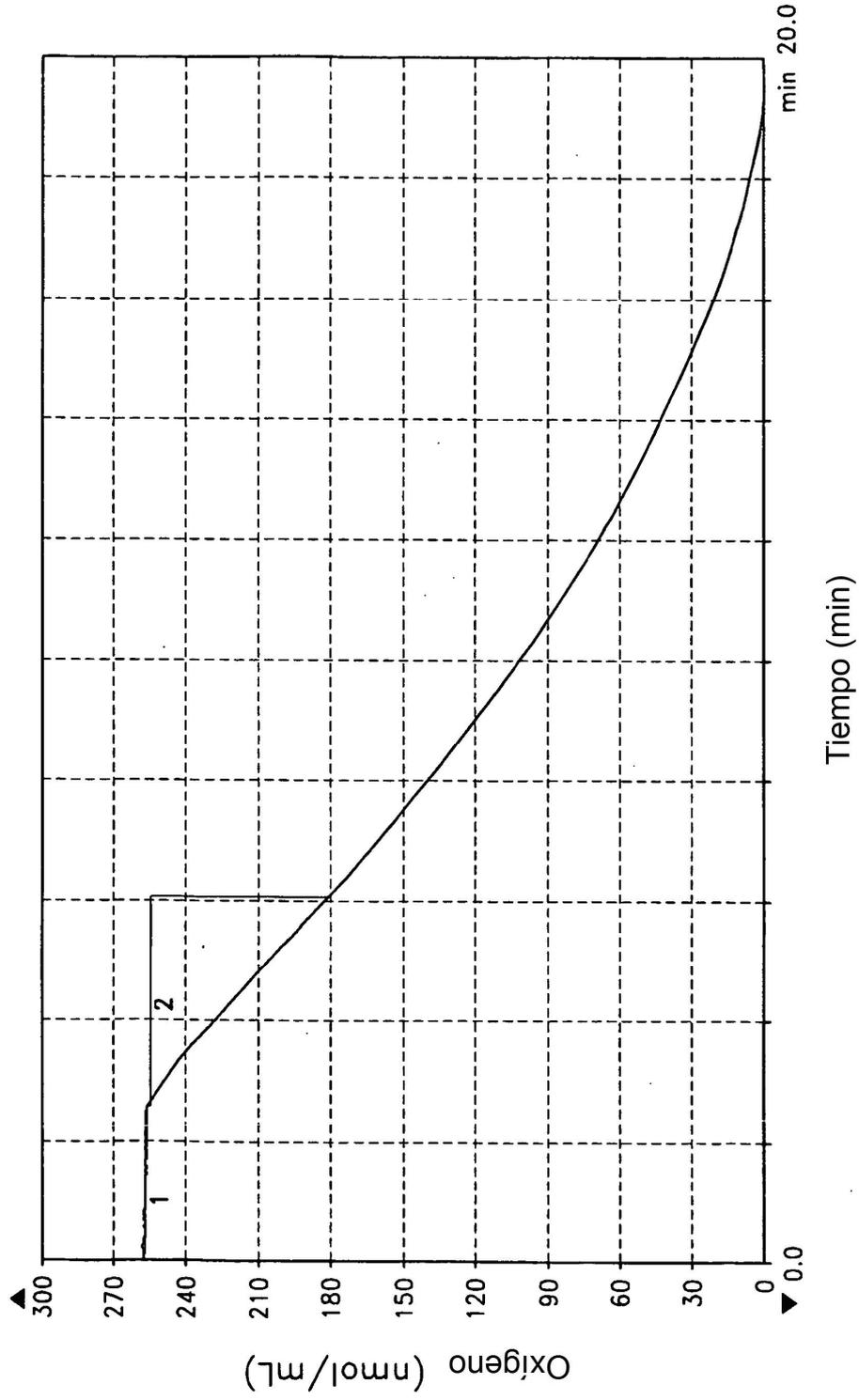
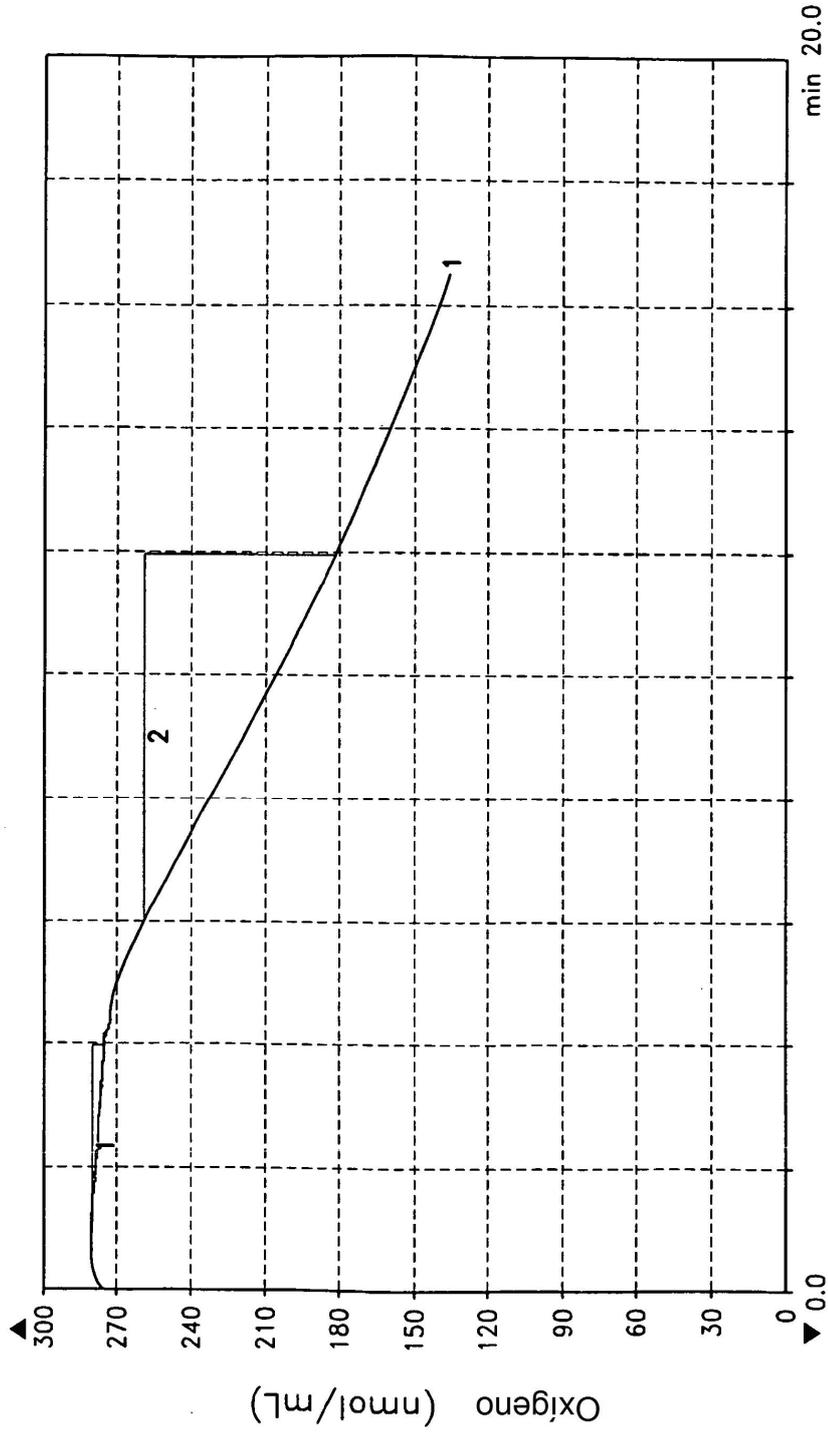


FIG. 2

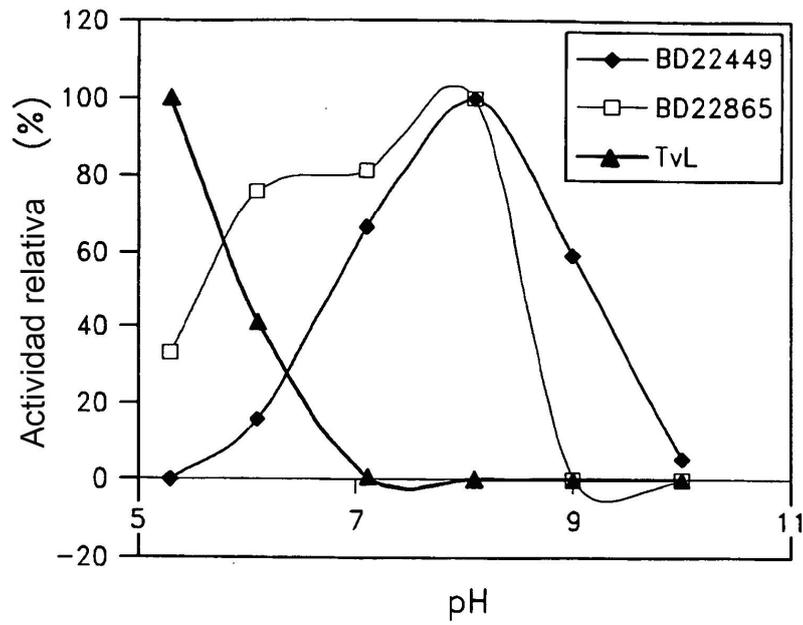
BD22865 oxidación por lacasa del mediador 71 a pH 8



Tiempo (min)

*FIG. 3*

perfiles de pH de la lacasa de Trametes, BD22449, y BD22865 sobre el mediador 71



*FIG. 4*

Exposiciones a calor y actividades ABTS residuales

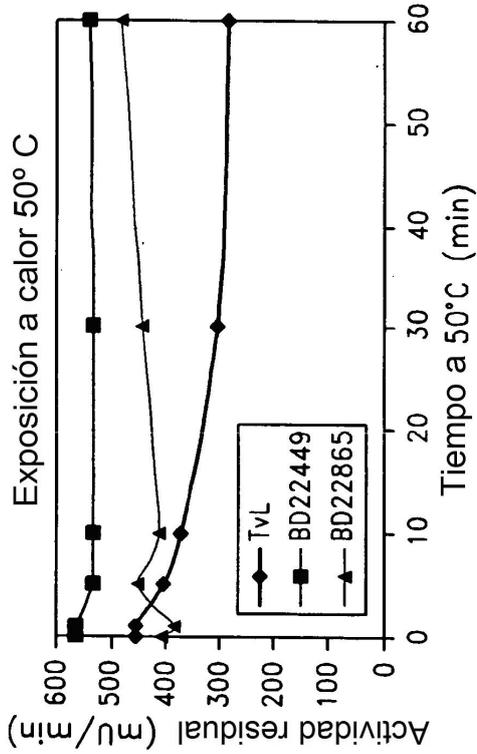


FIG. 5A

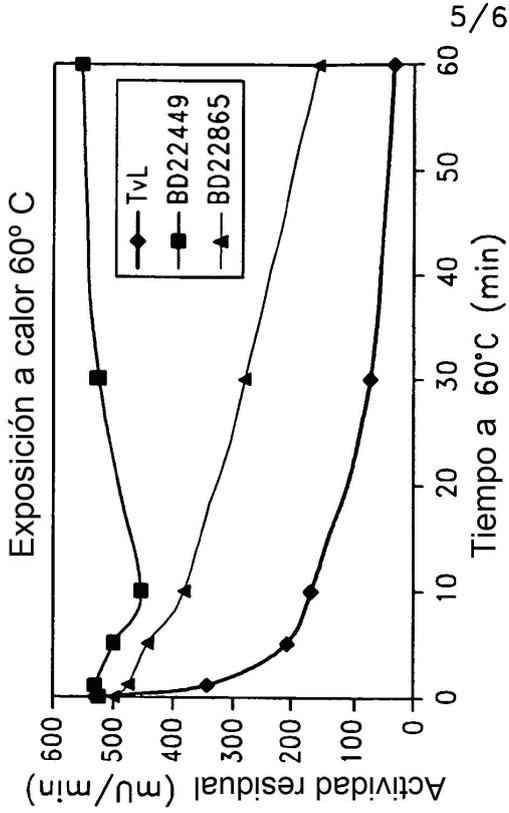


FIG. 5B

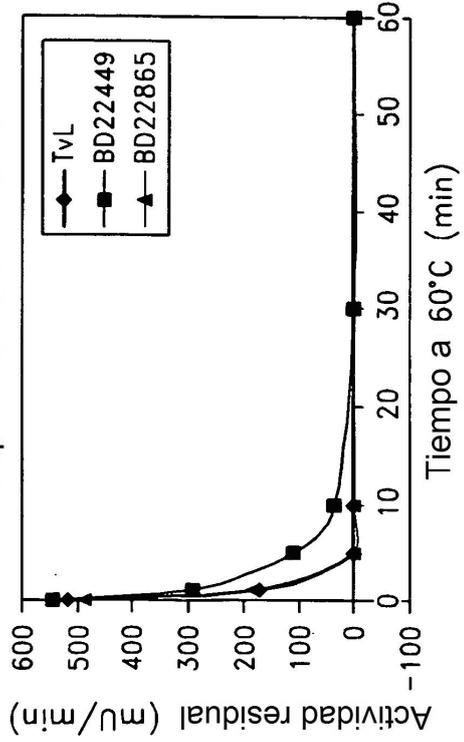


FIG. 5C

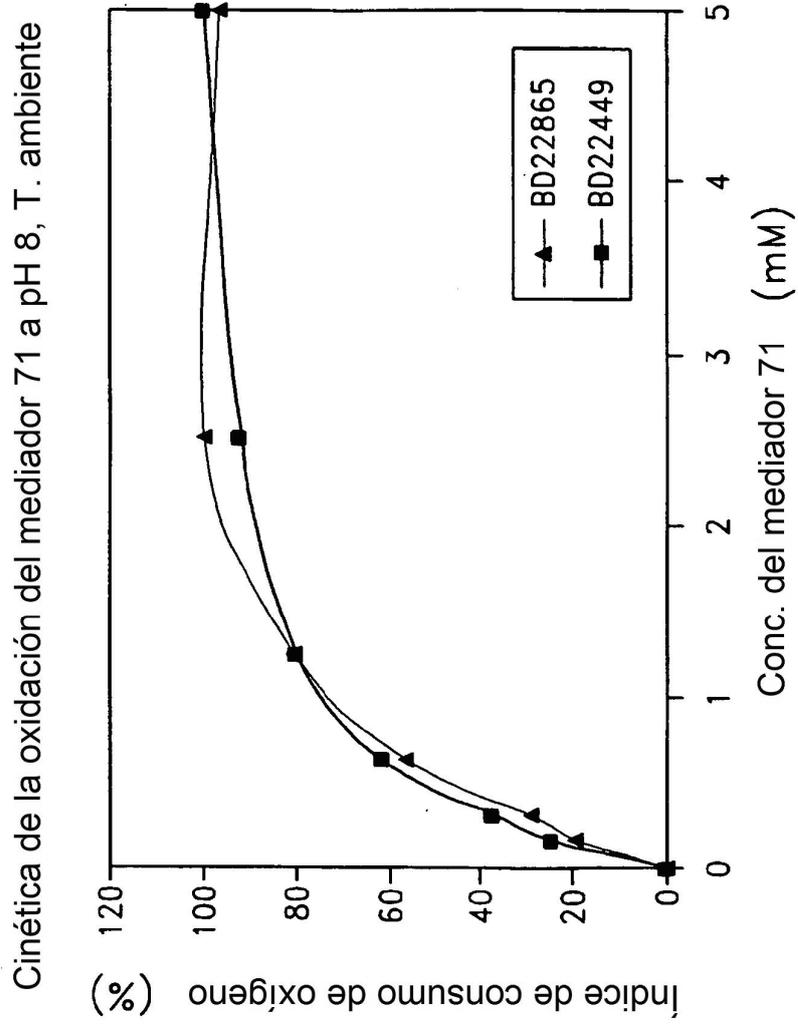


FIG. 6