

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 912**

21 Número de solicitud: 201230729

51 Int. Cl.:

**C07K 14/195** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**14.05.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**18.11.2013**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (100.0%)  
Ciudad Universitaria de Cantoblanco, C/ Einstein, 3  
28049 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**BERENGUER CARLOS, José;  
HIDALGO HUERTAS, Aurelio;  
FERRERAS PUENTE, Eloy Roberto y  
TORRES, Leticia Luciana**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Polipéptido termoestable con actividad penicilina acilasa, variantes del mismo y sus aplicaciones**

57 Resumen:

Polipéptido termoestable con actividad penicilina acilasa, variantes del mismo y sus aplicaciones. Se describe un polipéptido termoestable con actividad penicilina acilasa y variantes funcionalmente equivalentes del mismo, un procedimiento para su obtención y su empleo en la producción de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA).

**ES 2 429 912 A2**

**DESCRIPCIÓN**

Polipéptido termoestable con actividad penicilina acilasa, variantes del mismo y sus aplicaciones.

**CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a un polipéptido termoestable con actividad penicilina acilasa, variantes del mismo y a sus aplicaciones.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 La penicilina acilasa (PAC) es una de las enzimas más relevantes en la industria farmacéutica. Participa en la producción de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), que se usa posteriormente en la síntesis química de nuevas lactamas con mayor eficacia clínica. Las PACs pertenecen a la familia de hidrolasas de nucleófilos N-terminal, cuyos miembros experimentan un proceso de maduración complejo. En este proceso, se sintetiza la pre-pro-proteína como un polipéptido que se transloca al periplasma con la eliminación simultánea del péptido señal. La pro-proteína resultante se autoproteoliza entonces en el periplasma, produciendo el polipéptido que constituye la sub-unidad  $\beta$  y un segundo polipéptido. Éste, 15 sufre una segunda proteólisis y genera el polipéptido que constituye la sub-unidad  $\alpha$  y descubriendo el sitio activo mediante la eliminación de un péptido espaciador. La precisión del proceso de maduración es extremadamente relevante para la funcionalidad de la enzima heterodimérica final (sub-unidades polipeptídicas  $\alpha$  más  $\beta$ ).

20 Industrialmente, la penicilina G acilasa (PGA) de *Escherichia coli* es la enzima más utilizada, ya sea recombinante o nativa. Aunque la temperatura óptima para la hidrólisis de la penicilina G es de 50°C, dicha enzima PGA de *E. coli* pierde estabilidad por encima de 30°C y debe usarse en forma inmovilizada para incrementar su actividad. Otras PGA descritas con superior estabilidad son las de *Alcaligenes faecalis* (AfaePGA,  $t_{1/2}$  de 15 min a 55°C), *Bacillus badius* ( $t_{1/2}$  de 20 min a 55°C) y *Achromobacter xylosoxidans* ( $t_{1/2}$  de 55 min a 55°C). Su termoestabilidad surge de diferentes motivos tales como puentes disulfuro adicionales, más puentes salinos o pares iónicos enterrados adicionales, respectivamente. Sin embargo, la eficiencia del proceso catalítico industrial podría mejorarse enormemente mediante el uso de 25 enzimas con una vida media más larga en las condiciones de reacción regularmente usadas.

30 Las enzimas aisladas de termófilos extremos (termozimas) muestran una temperatura óptima similar a la de la velocidad de crecimiento máxima de su organismo de procedencia. Además, las termozimas presentan una resistencia a la desnaturalización química provocada, por ejemplo, por disolventes orgánicos, detergentes o pH, superior al promedio. En términos generales, la fermentación del huésped termófilo natural no es económicamente viable debido a los requisitos nutritivos y de energía del proceso, y se prefiere habitualmente la expresión de la proteína de interés en un sistema heterólogo. Sin embargo, la expresión recombinante de proteínas de termófilos en mesófilos supone frecuentemente un desafío. De hecho, se estima que menos del 20% de los ORF (del inglés "Open reading frame" o marco abierto de 35 lectura) de cualquier genoma de hipertermófilo o termófilo extremo puede expresarse y dar lugar a un polipéptido correctamente plegado en *E. coli*. Las estrategias para mejorar el plegamiento de termozimas expresadas de manera recombinante en *E. coli* incluyen el crecimiento del huésped a una temperatura superior, replegamiento de la proteína desnaturalizada en presencia de cofactores o co-expresión con chaperonas de *E. coli*.

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

**COMPENDIO DE LA INVENCION**

45 Los autores de la presente invención han clonado y sobreexpresado satisfactoriamente el gen *pac* de *Thermus thermophilus* (*Tth*) en células de *E. coli* bajo el control de un promotor del bacteriófago T7. La proteína recombinante producida ha sido caracterizada bioquímicamente como una penicilina K acilasa, con una temperatura óptima de reacción de 75°C. Por tanto, dicha proteína puede actuar como un catalizador extremadamente estable adecuado para la producción industrial de penicilinas semisintéticas.

50 Por tanto, en un aspecto la invención se relaciona con un polipéptido con actividad penicilina acilasa que comprende la SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, con la condición de que dicho polipéptido no es el polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión que comprende

- (i) un polipéptido A que comprende un polipéptido según la invención y

(ii). un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B es un polipéptido diferente a dicho polipéptido A.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido o una proteína de fusión proporcionados por la presente invención.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica que comprende un polinucleótido proporcionado por la presente invención.

En otro aspecto la invención se relaciona con un vector que comprende un polinucleótido o una construcción génica proporcionada por la presente invención. En una realización particular, dicho vector es un vector de expresión.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un organismo que comprende un polinucleótido, una construcción génica, o un vector, proporcionados por la presente invención. En una realización particular, dicho organismo es un organismo mesófilo, por ejemplo, una bacteria mesófila.

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para obtener un polipéptido o una proteína de fusión proporcionados por la presente invención que comprende cultivar un organismo proporcionado por esta invención que comprende un polinucleótido proporcionado por la presente invención bajo condiciones que permiten la producción de dicho polipéptido o dicha proteína de fusión, y, si se desea, recuperar dicho polipéptido o proteína de fusión. En una realización particular, dicho organismo es un organismo mesófilo, por ejemplo, una bacteria mesófila.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) que comprende poner en contacto una penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del átomo de nitrógeno, con un polipéptido o con una proteína de fusión proporcionados por la presente invención bajo condiciones que permitan la hidrólisis de dicha penicilina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido proporcionado por la presente invención.

## 25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1. Presencia de la proteína PAC en células de *Tth* (*Thermus thermophilus*). Se separaron las proteínas totales de células de *Tth* de las cepas HB27 y NAR1 mediante SDS-PAGE y se determinó individualmente la presencia de sub-unidades  $\alpha$ -PAC y  $\beta$ -PAC mediante ensayos de inmunotransferencia de tipo Western.

30 Figura 2. Ubicación subcelular de *Tth*PAC. Se tomaron imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de cultivos exponenciales de la cepa mutante *Tth* HB27  $\Delta$ pac que albergaba las fusiones de proteínas  $\beta$ -glicosidasa-sGFP utilizada como marcador citosólico (A),  $\Delta$ Sp*Tth*PAC-sGFP (B), *Tth*PAC-sGFP (C) o Sp*Tth*PAC-sGFP (D).

35 Figura 3. Inmunodetección de *Tth*PAC en la fracción de membrana. Se analizó la presencia de las sub-unidades  $\alpha$ -PAC y  $\beta$ -PAC y de la proteína periplásmica DrpA en la fracción de membrana (MB), la fracción soluble (SB) y la fracción periplásmica (PE) de cuerpos multicelulares *Tth* NAR1  $\Delta$ slpA mediante ensayos de inmunotransferencia de tipo Western.

40 Figura 4. Solubilización de la membrana interna de *Tth* e inmunodetección de *Tth*PAC. Se inmunodetectó PAC en membranas aisladas de *Tth* HB27 tras un tratamiento de 30 min con sarkosyl (N-lauroilsarcosinato de sodio), a 37°C. T, membranas totales; P, fracción de membrana insoluble tras el tratamiento con detergente; SB, fracción de proteínas solubles tras el tratamiento con detergente. SlpA, marcador de proteína de la membrana externa; Nqo6, marcador de proteína de la membrana interna.

45 Figura 5. Ensayos de accesibilidad de tripsina. Se inmunodetectaron las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  de *Tth*PAC en la cepa *Tth* NAR1  $\Delta$ slpA antes del tratamiento con tripsina (C), y tras una digestión con 1,2 mg/ml de tripsina (1) o con 5,5 mg/ml de tripsina (2). Se usó ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM para conseguir una solubilización parcial de la membrana externa. Se usó Nqo1 como marcador citoplasmático.

50 Figura 6. Ubicación subcelular de la proteína quimérica SpEco-PAC*Tth* en células de *Tth*. Se realizó la sobreexpresión en la cepa mutante  $\Delta$ pac *Tth*. Se realizó la inmunodetección de las sub-unidades  $\alpha$ -PAC y  $\beta$ -PAC en la fracción de proteínas solubles (SB) o en la fracción de membrana (MB). Se usó *Tth*PAC madurada en células de *Tth* como control (C).

Figura 7. Sobreexpresión de *TthPAC* en células *Tth* $\Delta$ *pac*. Se inmunodetectó la sub-unidad  $\beta$  de *TthPAC* en la cepa de tipo natural *Tth* HB27 (C+), en la cepa mutante *Tth* $\Delta$ *pac* transformada con pWURPAC (PAC) y en el mutante *Tth* $\Delta$ *pac* (C-).

Figura 8. Expresión heteróloga de la proteína quimérica Sp<sub>Eco</sub>-PAC<sub>Tth</sub> en células de *E. coli*. Se inmunodetectaron las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  de *TthPAC* en la fracción citoplasmática (paneles superior y medio) y en la fracción periplásmica (panel inferior) de células de *E. coli* de la cepa BL21 (1, A y G); cepa Rosetta-gami2 (2, B y H); cepa BL21 que co-expresa GroEL/ES y factor desencadenante (3, C y I), factor desencadenante solo (4, D y J), GroEL/ES (5, E y K) o DnaK/J y GrpE (6, F y L). Se purificaron parcialmente (+) o no (-) muestras de proteínas a partir de proteínas termolábiles de *E. coli* mediante una incubación de 20 min. a 65°C y después centrifugación.

Figura 9. Efecto de la co-expresión de chaperonas en la sobreproducción de *TthPAC* en células de *E. coli*. (A) Inmunotransferencia de tipo Western contra las sub-unidades  $\alpha$ - y  $\beta$ -*TthPAC*. Carril 1 (C), *TthPAC* madurada en células de *Tth*; carril 2, sobreexpresión de *TthPAC* sin co-expresión de chaperonas; carril 3 a 6, co-expresión de *TthPAC* con GroEL/ES-factor desencadenante (TF), TF solo, GroEL/ES y DnaK/J-GrpE, respectivamente. (B) Densidad óptica a 600nm (puntos), actividad específica (barras blancas) y volumétrica (barras grises) de *TthPAC* en ausencia (-) o presencia de chaperonas (GroEL/ES-TF, TF solo, GroEL/ES o DnaK/J-GrpE).

Figura 10. Eliminación de chaperonas tras la co-expresión con HIS<sub>6</sub>::*TthPAC*. Se co-expresó *TthPAC* con GroEL/ES en células de *E. coli* BL21. Se incubó la fracción de proteínas solubles total en ausencia (carriles 1-4) o en presencia de ATP 5 mM/ Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM (carriles 5-8) durante 2 h a 4°C. Con el fin de separar la *TthPAC* de la GroEL/ES desprendida a 0, 30, 45 ó 60 min., se realizó incubación a 65°C y después centrifugación. La inmunodetección de  $\beta$ -*TthPAC* muestra que la movilidad de esta sub-unidad (aproximadamente 60 kDa) se reduce cuando se elimina GroEL (también 60 kDa).

Figura 11. Efecto del calcio en la sobreproducción de *TthPAC* en células de *E. coli*. Se añadieron concentraciones de CaCl<sub>2</sub> hasta 50 mM a los medios LB al comienzo del cultivo de células de *E. coli*. Se evaluaron la maduración y actividad de *TthPAC*. (A) Inmunotransferencia de tipo Western contra las sub-unidades  $\alpha$ - y  $\beta$ -*TthPAC*. Carril 1-5, concentraciones de calcio crecientes; carril 6 (C), *TthPAC* madurada en células de *Tth*. (B) Densidad óptica a 600nm (círculos), actividad específica (cuadrados) y volumétrica (triángulos) de *TthPAC*.

Figura 12. Purificación de HIS<sub>6</sub>::*TthPAC*. Se sometieron las fracciones de proteína soluble total (carril 1), fracción no retenida de proteína (carril 2), elución de proteína con imidazol 5 mM (carril 3) y elución de proteína con imidazol 150 mM a SDS-PAGE y se tiñeron con azul brillante de Coomassie.

Figura 13. pH óptimo de HIS<sub>6</sub>::*TthPAC*. Se sometió a ensayo la actividad enzimática de *TthPAC* a 65°C en presencia de Penicilina K (PenK) 2,5 mM (A) o Penicilina G (PenG) 50 mM (B) y en tampón Britton-Robinson 20 mM a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9.

Figura 14. Temperatura de reacción óptima de HIS<sub>6</sub>::*TthPAC*. Se sometió a ensayo la actividad enzimática de *TthPAC* en MES 20 mM pH 5,5, en presencia de PenK 0,5 mM y en un intervalo de temperatura de desde 57,5 hasta 82,5°C.

Figura 15. Modelo de acoplamiento de PenK en el modelo de homología de *TthPAC*. Se muestra PenK y se detallan los aminoácidos de *TthPAC* esenciales para la unión del sustrato y la catálisis. La interacción del carbonilo de PenK con los átomos de N del hueco oxianiónico se significa con líneas discontinuas, y el bolsillo de unión del acilo está perfilado con rejilla.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente invención se ha clonado y sobreexpresado satisfactoriamente el gen *pac* de *T. thermophilus* (*Tth*) en células de *E. coli* bajo el control de un promotor de T7. Debido a la naturaleza de esta PAC y a su compleja maduración, crucial para alcanzar su conformación final heterodimérica funcional, la sobreexpresión de esta enzima en un huésped heterólogo mesófilo suponía un desafío. La proteína recombinante ha sido caracterizada bioquímicamente como una penicilina K acilasa, con una temperatura óptima de reacción de 75°C. Por tanto, dicha proteína puede actuar como un catalizador extremadamente estable a temperatura elevada adecuado para la producción industrial de penicilinas semisintéticas.

### Polipéptido de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido con actividad penicilina acilasa, en adelante "polipéptido de la invención", que comprende la SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente

del mismo, con la condición de que dicho polipéptido no es el polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2.

El término “penicilina acilasa”, tal como aquí se emplea se refiere a una enzima de tipo hidrolasa que hidroliza penicilinas dando lugar a ácido 6-aminopenicilánico (6-APA).

- 5 La SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de la proteína PAC de *T. thermophilus* cepa HB27 (número de acceso Q72G76 de la base de datos Uniprot a fecha 17 de abril de 2012) carente de los 37 primeros aminoácidos del extremo N-terminal.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia Q72G76 de la base de datos Uniprot a fecha 17 de abril de 2012 y corresponde a la secuencia completa de la proteína PAC de *T. thermophilus* cepa HB27.

- 10 Tal como aquí se utiliza, la expresión “variante funcionalmente equivalente” aplicada a un polipéptido, tal como un polipéptido de la invención, implica que dicha variante (i) tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido, y, además, (ii) tiene la misma actividad o función que dicho polipéptido ( en este caso, actividad penicilina acilasa).

- 15 Una secuencia de aminoácidos es “sustancialmente homóloga” a una secuencia de aminoácidos determinada cuando presenta un grado de identidad de, al menos, un 70%, ventajosamente de, al menos, un 75%, típicamente de, al menos, un 80%, preferentemente de, al menos, un 85%, más preferentemente de, al menos, un 90%, aún más preferentemente de, al menos, un 95%, 96%, 97%, 98% ó 99%, respecto a dicha secuencia de aminoácidos determinada. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc.

- 25 De acuerdo con la presente invención, una variante funcionalmente equivalente ejerce la misma función o tiene la misma actividad que un polipéptido de la invención, en concreto, al menos, actividad penicilina acilasa.

- 30 La actividad penicilina acilasa de un polipéptido puede ser determinada mediante el empleo de métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia; a modo simplemente ilustrativo, no limitativo, la actividad penicilina acilasa de un polipéptido se puede determinar mediante el método colorimétrico de Kutzbach y Ravenbush (Kutzbach & Ravenbush, Hoppe-Seyler’s Physiol. Chem. 355, 45-531974); brevemente, dicho método colorimétrico de Kutzbach y Ravenbush consiste en que a las muestras a analizar se las añade una solución de ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzoico (NIPAB) 0,15 mM pH 7,5 en tampón fosfato sódico 50 mM; tras la reacción, la aparición de ácido 6-nitro-3-aminobenzoico se mide por espectroscopía a 405 nm. Alternativamente, también puede realizarse un ensayo incubando una muestra que contiene la penicilina acilasa inmovilizada con penicilina en tampón fosfato 50 mM pH 7,5 incubando a 50°C con agitación suave. La concentración del sustrato y los productos de la reacción se pueden analizar mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo compuesto por una bomba SP1000 (ThermoFinnigan), un detector UV1000 (ThermoFinnigan) y una columna C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Análisis Vínicos). La fase móvil empleada puede ser acetonitrilo:tampón fosfato 10 mM (25:75 v/v), pH 3 a un flujo de 1 ml/min y la detección se realiza a una longitud de onda de 254 nm. Otros métodos para determinar la actividad penicilina acilasa también pueden utilizarse, por ejemplo, el método fluorogénico descrito por Ninkovic y col. (Ninkovic M. et al., Analytical Biochemistry Volume 292, Issue 2, 15 May 2001, pp 228–233) o mediante el empleo de fluorescamina (Baker WL, Antimicrob Agents Chemother. 1983 January; 23(1): 26–30).

En una realización particular, el polipéptido de la invención es un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o está constituida por, la SEQ ID NO: 1, con la condición de que dicho polipéptido no es el polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2.

- 50 En otra realización particular, el polipéptido de la invención es una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o está constituida por, la SEQ ID NO: 1.

- 55 En otra realización particular, el polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende al menos una mutación puntual en relación con la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 1, que consiste en la sustitución de un aminoácido por otro; dicha sustitución puede ser conservativa (cuando un aminoácido es sustituido por otro de características similares) o no conservativa. En una realización concreta, dicho polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y, al menos, una mutación puntual en un aminoácido presente en dicha

secuencia de aminoácidos, en donde dicha mutación comprende la sustitución de un aminoácido presente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 por otro aminoácido, en donde dicho aminoácido presente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo formado por la leucina en posición 151 (Leu 151), la serina en posición 152 (Ser 152), la leucina en posición 242 (Leu 242) y/o la isoleucina en posición 275 (Ile 275); en una realización más concreta, el aminoácido que sustituye al aminoácido presente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 es un aminoácido aromático, es decir, un aminoácido cuya cadena lateral posee un anillo aromático, por ejemplo, fenilalanina, triptófano o tirosina; en una realización aún más concreta, dicho aminoácido aromático es fenilalanina. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos polipéptidos de la invención que comprenden la SEQ ID NO: 1 y una o más mutaciones puntuales en algunos aminoácidos incluyen los polipéptidos identificados en la Tabla 6 (Ejemplo 9).

Las posiciones de los aminoácidos sustituidos por otros (mutaciones puntuales) se refieren a su localización en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En ocasiones, en esta descripción, se hace referencia a la posición de dichos aminoácidos teniendo en cuenta las posiciones correspondientes de las sub-unidades alfa y beta de la proteína PAC anteponiendo al aminoácido y su posición el símbolo alfa ( $\alpha$ ) o beta ( $\beta$ ) según se refiera a la sub-unidad alfa ( $\alpha$ -PAC) o beta ( $\beta$ -PAC), respectivamente. En concreto, la sub-unidad alfa se sitúa entre el aminoácido en posición 1 y el aminoácido en posición 218 en la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 1, mientras que la sub-unidad beta se sitúa entre el aminoácido en posición 219 y el aminoácido en posición 739 en la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Un experto en la materia entenderá que mediante el alineamiento de secuencias es posible identificar un residuo concreto de la sub-unidad alfa o beta de la proteína PAC de *T. thermophilus* en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Así, la leucina en posición 188 de la sub-unidad  $\alpha$ -PAC corresponde a la leucina en posición 151 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; la serina en posición 189 de la sub-unidad  $\alpha$ -PAC corresponde a la serina en posición 152 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; la leucina en posición 24 de la sub-unidad  $\beta$ -PAC corresponde a la leucina en posición 242 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; y la isoleucina en posición 57 de la sub-unidad  $\beta$ -PAC corresponde a la isoleucina en posición 275 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

El término “mutación puntual” tal como aquí se utiliza, se refiere a sustituciones que se producen a nivel de polipéptidos (o polinucleótidos que expresan dichos polipéptidos) producidas a nivel de un único aminoácido o triplete que lo codifica.

Existen diversas técnicas conocidas por un experto en la materia para generar mutaciones puntuales. Un ejemplo ilustrativo, no limitativo, de un método para generar mutaciones puntuales se basa en la mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica es bien conocida en el estado de la técnica (Adelman JP et al., (1983) DNA;2:183-93). En la mutagénesis mediada por oligonucleótidos, la secuencia de ADN que codifica un determinado polipéptido (nativa) es alterada mediante hibridación de un oligonucleótido que comprende la secuencia que codifica la mutación deseada, con un ADN molde. Dicho ADN molde consiste, por ejemplo, en un ADN de cadena simple que contiene la secuencia nativa o inalterada. Tras la hibridación, una ADN polimerasa se encarga de sintetizar la segunda cadena complementaria del molde que, de este modo, incorporará la mutación seleccionada en el ADN de la secuencia nativa. Dichos oligonucleótidos suelen ser de, al menos, 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido optimizado debería tener entre 12 y 15 nucleótidos totalmente complementarios al ADN molde a ambos lados de la mutación, de tal manera que se asegure que el oligonucleótido hibridará adecuadamente al molde de ADN de cadena simple. Los nucleótidos se sintetizan utilizando técnicas conocidas en el estado de la técnica.

El polipéptido de la invención es estable bajo determinadas condiciones. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “estable” se refiere a la capacidad del polipéptido de mantener su actividad, en este caso la actividad penicilina acilasa, en una condición determinada, por ejemplo, temperatura o pH entre otras.

El polipéptido de la invención es termoestable, es decir, es estable a temperatura elevada. En una realización particular, el polipéptido de la invención es estable a una temperatura comprendida entre 57,5°C y 82,5°C, lo que permite ejercer su actividad penicilina acilasa en un amplio intervalo de temperatura; así, en una realización particular, la temperatura óptima de actividad penicilina acilasa del polipéptido de la invención es de 75°C aproximadamente. El término “temperatura óptima”, en el sentido utilizado en esta descripción, se refiere a la temperatura en la que la actividad penicilina acilasa del polipéptido de la invención es máxima, es decir, hidroliza la mayor cantidad de sustrato por unidad de tiempo.

El polipéptido de la invención es estable dentro de un amplio intervalo de pH, tanto ácido como básico y neutro. En una realización particular, el polipéptido de la invención es estable a un pH comprendido entre 3 y 9, lo que permite ejercer su actividad penicilina acilasa en un amplio intervalo de condiciones y pH. El término “pH óptimo”, en el sentido utilizado en esta descripción, se refiere al valor de pH en el que la actividad penicilina acilasa del polipéptido de la invención es máxima, es decir, hidroliza la mayor cantidad de sustrato por unidad de tiempo.

En una realización particular, el pH óptimo de actividad penicilina acilasa del polipéptido de la invención es de aproximadamente 4 cuando el sustrato es penicilina K (PenK). En otra realización particular, el pH óptimo de actividad penicilina acilasa del polipéptido de la invención es de aproximadamente 8 cuando el sustrato es penicilina G (PenG).

La determinación de la temperatura o pH óptimos puede realizarse mediante ensayos convencionales basados en medir la actividad penicilina acilasa a distintas temperaturas o pHs, según corresponda, seleccionándose aquel valor de temperatura o pH en el que se produce la hidrólisis máxima de sustrato por unidad de tiempo.

El polipéptido de la invención tiene actividad penicilina acilasa y, por tanto, hidroliza una penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del átomo de nitrógeno.

El término “penicilina”, tal como aquí se utiliza, incluye un grupo de antibióticos producidos por hongos del género '*Penicillium*', o producidos de forma semisintética, que se usan para combatir infecciones bacterianas sensibles a esos fármacos. En general, las penicilinas actúan inhibiendo la biosíntesis de peptidoglicano que constituye la pared celular de las bacterias durante el proceso de multiplicación, con lo que se debilita la pared bacteriana y se favorece la lisis o destrucción de la bacteria. La molécula de penicilina consiste en un núcleo de 6-APA en el que se distinguen dos anillos, un anillo tiazolidínico y un anillo  $\beta$ -lactámico, común a todas las penicilinas, y, además, una cadena lateral unida a dicho núcleo que es donde radica la diferencia entre los diferentes tipos de penicilina. La estructura general de la penicilina se representa en la Tabla 1.

El término “6-APA”, tal como aquí se utiliza, se refiere al ácido (2S,5R,6R)-6-amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico o ácido 6-aminopenicilánico [nº CAS 1203-85-6], un compuesto químico que constituye el núcleo fundamental de las penicilinas. El 6-APA está compuesto por un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. La presencia de cadenas laterales diferentes en posición 6 del 6-APA da lugar a los distintos tipos de penicilinas que difieren entre sí según el tipo de cadena lateral unida al 6-APA y muestran distintas propiedades antibacterianas. La estructura general de 6-APA se representa en la Tabla 1.

El término “anillo penam”, tal como aquí se utiliza se refiere a una estructura que consiste en un anillo beta lactámico fusionado a una tiazolidina. Un “anillo beta lactámico” es una estructura lactámica con un anillo heterocíclico que consiste en tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno. Un “anillo tiazolidínico” es una estructura con un anillo heterocíclico de cinco miembros saturado que contiene un átomo de azufre y un átomo de nitrógeno. La fórmula del anillo penam se muestra en la Tabla 1.

Una “penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del átomo de nitrógeno”, tal como se emplea en la presente invención, se refiere a una penicilina que contiene un grupo carboxamida (R- CO-NH-) unido a la posición 6 del anillo penam a través del átomo de nitrógeno.

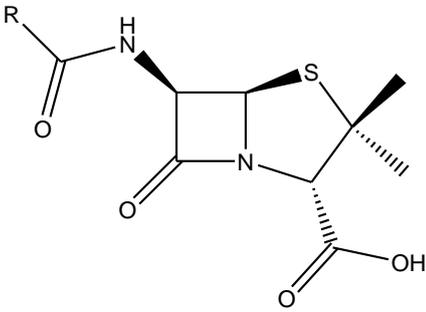
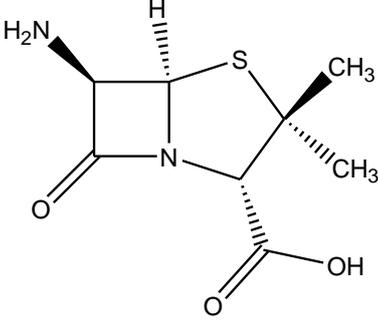
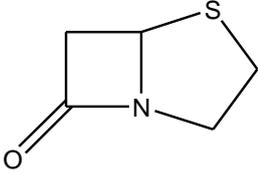
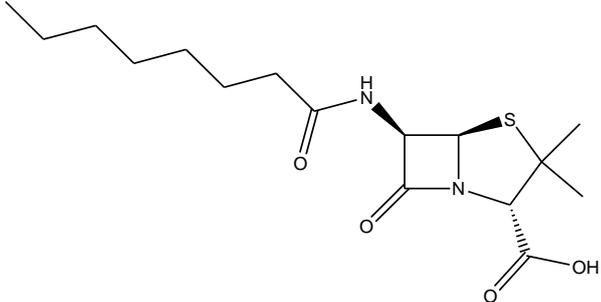
Un “grupo carboxamida”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un grupo funcional de fórmula general R-CO-NH-, donde R es alquilo, alqueno, ariloxialquilo o arilalquilo. El término “alquilo” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada saturada, lineal o ramificada, que puede tener entre uno y doce átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, pentilo, heptilo, etc. El término “alqueno” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada insaturada, lineal o ramificada, que contiene al menos un doble enlace y que puede tener entre dos y doce átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, 3-pentenilo, etc. El término “ariloxialquilo” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada saturada, lineal o ramificada, que puede tener entre uno y doce átomos de carbono, sustituido por uno o más grupos arilo (Ar-O-), y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, fenoximetilo, etc. El término “Ar” o “arilo” incluye radicales de anillo único y de múltiples anillos tanto separados como condensados; los grupos arilo típicos contienen desde 1 hasta 3 anillos separados o condensados y desde 6 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono por anillo, por ejemplo, fenilo, etc. El término “arilalquilo” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada saturada, lineal o ramificada, que puede tener entre uno y doce átomos de carbono, sustituido por uno o más grupos arilo, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, fenilmetilo, etc.

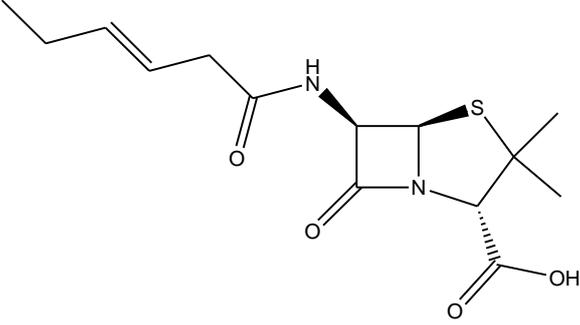
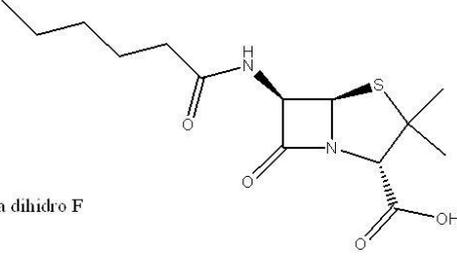
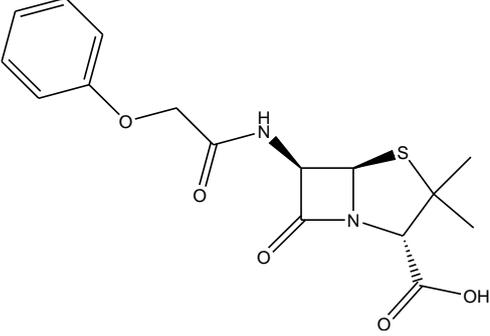
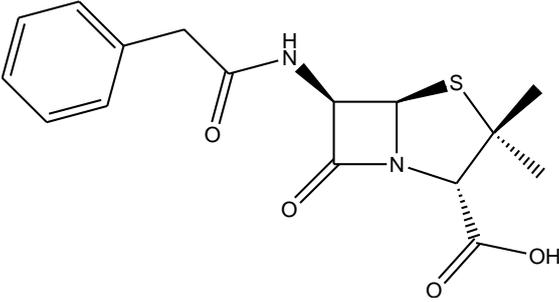
El término “hidrofóbico”, tal como aquí se utiliza, se refiere, en general, a que “rechaza” el agua; en general, los grupos hidrofóbicos son grupos no polares y, los compuestos que contienen dichos grupos hidrofóbicos o no polares son menos solubles en agua que los compuestos que contienen grupos polares.

5

Tabla 1

## Estructura general de las penicilinas, 6-APA, anillo penam, penicilinas K, F, dihidro F, V y G

Estructura general de las penicilinas	
6-APA (ácido 6-amino penicilánico) [Nº CAS 1203-85-6]	
Anillo penam	
Penicilina K [Nº CAS 525-97-3]	

<p>Penicilina F [Nº CAS 118-53-6]</p>	 <p>The structure shows the penicillin nucleus (a fused beta-lactam and thiazolidine ring system) with a 5-phenylacetamido group at the 6-position and a 2-phenylacetamido group at the 2-position. The 6-position is also substituted with a methyl group and a carboxylic acid group.</p>
<p>Penicilina dihidro F</p>	<p>Penicilina dihidro F</p>  <p>The structure is identical to Penicilina F, but the double bond in the beta-lactam ring is saturated, indicating the dihydro form.</p>
<p>Penicilina V [Nº CAS 87-08-1]</p>	 <p>The structure shows the penicillin nucleus with a 6-phenylacetamido group and a 2-phenylacetamido group. The 6-position is also substituted with a methyl group and a carboxylic acid group.</p>
<p>Penicilina G [Nº CAS 61-33-6]</p>	 <p>The structure shows the penicillin nucleus with a 6-phenylacetamido group and a 2-phenylacetamido group. The 6-position is also substituted with a methyl group and a carboxylic acid group.</p>

5 Dos parámetros importantes en el estudio de las reacciones catalizadas por enzimas son la velocidad máxima ( $V_{max}$ ), a la que una enzima es capaz de trabajar y la constante de afinidad ( $K_m$ , concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima) que expresa la relación de afinidad que tiene una enzima y su sustrato. Valores bajos de  $K_m$  indican que el complejo enzima-sustrato está unido muy fuertemente. Otro parámetro importante es  $K_{cat}$  (constante catalítica) que se refiere al número de moléculas de sustrato convertidas en producto, por centro activo y por unidad de tiempo.

10 Por tanto, sustratos preferidos para las enzimas son aquellos para los que los valores de  $K_m$  son bajos y los valores de  $K_{cat}$  altos en comparación con un sustrato por el que no muestra afinidad.

En una realización particular, dicha penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del átomo de nitrógeno se selecciona del grupo formado por penicilina K, penicilina dihidro F, penicilina F, penicilina V y penicilina G (Tabla 1).

#### Proteína de fusión de la invención

15 El polipéptido de la invención puede formar parte de una proteína de fusión. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión, en adelante “proteína de fusión de la invención”, que comprende:

- i) un polipéptido A que comprende un polipéptido de la invención, y
- ii) un polipéptido B, donde dicho polipéptido B es un polipéptido diferente a dicho polipéptido A.

20 El término “polipéptido”, tal como aquí se usa, se refiere a una cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, independientemente de su longitud, e incluye tanto cadenas de aminoácidos de 10 o menos aminoácidos (en algunas publicaciones identificados como “oligopéptidos”) como cadenas de aminoácidos de más de 10 aminoácidos.

25 El polipéptido B puede estar unido a cualquier extremo del polipéptido A. Así, en una realización particular, el extremo amino terminal del polipéptido B está unido al extremo carboxilo terminal del polipéptido A, mientras que, en otra realización particular, el extremo carboxilo terminal del polipéptido B está unido al extremo amino terminal del polipéptido A. Ambos polipéptidos A y B pueden estar unidos directamente entre sí, o bien a través de un péptido espaciador (linker) entre dichos polipéptidos A y B. La proteína de fusión puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la expresión de un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión en células hospedadoras apropiadas.

30 El polipéptido A comprende un polipéptido de la invención, cuyas características ya han sido mencionadas y se incorporan aquí por referencia.

35 El polipéptido B es un polipéptido “diferente” al polipéptido A, es decir, es un polipéptido distinto al polipéptido A; en este sentido, en una realización particular, el polipéptido B es un polipéptido diferente a un polipéptido de la invención, mientras que, en otra realización particular, el polipéptido B es un polipéptido de la invención pero diferente al polipéptido de la invención concreto comprendido en el polipéptido A en una proteína de fusión de la invención determinada. Prácticamente cualquier polipéptido puede ser utilizado como polipéptido B en la proteína de fusión de la invención, siempre y cuando cumpla la condición de que es diferente del polipéptido A. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de polipéptidos que pueden ser utilizados como polipéptido B en la presente invención incluyen péptidos señal de secreción extracelular, polipéptidos útiles para aislar y/o purificar proteínas, etc.

40 En una realización particular de la proteína de fusión de la invención, dicho polipéptido B es un péptido señal de secreción extracelular, es decir, una secuencia que permite la secreción de dicha proteína de fusión al medio extracelular. Un “péptido señal de secreción extracelular”, tal como aquí se define, es un péptido que comprende, o que consiste en, una secuencia señal que se encuentra de forma natural asociada a una proteína distinta al polipéptido de la invención que se desea expresar. Así, la presente invención contempla el uso de secuencias señal derivadas de cualquier péptido secretado, incluyendo tanto aquellas secuencias señal pertenecientes al mismo organismo en donde se expresa la proteína de fusión de la invención pero cuya función es promover la secreción al medio de proteínas distintas al polipéptido de la invención, así como secuencias señal que derivan de otros microorganismos y que se encargan de promover la secreción al medio de cualquier enzima. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de secuencias señal de *E. coli*, incluyen la proteína MBP (“maltose-binding protein”), la proteína de unión a ribosa BBP (“ribose-binding protein”), la fosfatasa alcalina y el péptido señal OmpA así como otras

secuencias señal que pueden ser identificadas usando los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gallicioti, G. et al. *J. Membrane Biology*, 183:175-182).

En otra realización particular, dicho polipéptido B es un polipéptido útil para aislar y/o purificar proteínas. En general, dicho polipéptido útil para aislar y/o purificar proteínas estará situado en una región de la proteína de fusión de la invención que no afecte adversamente a la funcionalidad del polipéptido de la invención. Prácticamente cualquier polipéptido que pueda ser utilizado para aislar y/o purificar una proteína de fusión (denominados genéricamente “péptidos etiqueta” o “tag”) puede estar presente en dicha proteína de fusión de la invención. A modo ilustrativo, no limitativo, dicho polipéptido útil para aislar y/o purificar una proteína, tal como una proteína de fusión, puede ser, por ejemplo, una cola de argininas (Arg-tag), una cola de histidinas (His-tag), FLAG-tag, Strep-tag, un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag, SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, etc. (Terpe K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2003), 60:523-525),  $\beta$ -galactosidasa, VSV-glicoproteína, etc. En una realización particular y preferida de la proteína de fusión de la invención, dicho polipéptido B comprende una cola de polihistidinas.

Polinucleótido de la invención y construcción génica, vector y organismo que comprenden dicho polinucleótido de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido, en adelante “polinucleótido de la invención”, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención o una proteína de fusión de la invención. Por simplicidad, salvo que se indique lo contrario, bajo la denominación “polinucleótido de la invención” se incluye tanto el polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención, es decir, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente del mismo (e.g., las variantes indicadas en la Tabla 6), con la condición de que dicho polipéptido no es el polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2, así como un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica, en adelante “construcción génica de la invención”, que comprende un polinucleótido de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, en adelante “vector de la invención”, que comprende un polinucleótido de la invención o una construcción génica de la invención. En una realización particular, dicho vector es un vector de expresión.

Un “vector de expresión”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una construcción de ADN replicativo utilizado para expresar un polinucleótido de la invención e incluye una unidad transcripcional que comprende un ensamblaje de (1) elemento/s genético/s que tienen un papel regulatorio en la expresión génica, por ejemplo, promotores, operadores o “enhancers” (aumentadores), operativamente unidos a (2) un polinucleótido de la invención que es transcrito a ARN mensajero y traducido a polipéptido o proteína de fusión y (3) secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción y traducción.

Preferentemente, la invención contempla el uso de vectores que puedan ser propagados en organismos mesófilos, preferentemente, en bacterias mesófilas.

En una realización particular de la invención, cuando el organismo es procariota, por ejemplo, una bacteria, vectores adecuados según la invención incluyen, por ejemplo, los vectores pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 (Messing, 1983. *Meth. in Enzymology* 101:20-77; Vieira y Messing, 1982. *Gene* 19:259-268), Bluescript (Stratagene, La Jolla, California) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCRI, RP4, pNH8A, pNH16a, pNH18a. En otra realización particular, cuando dicha bacteria es *E. coli*, el vector de expresión es el plásmido pET, en particular, el plásmido pET28a. Los genes clonados en dicho plásmido se transcriben bajo el control del promotor del bacteriófago T7, cuando se activa la T7 RNA polimerasa en la célula huésped. La expresión se induce con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido), el cual remueve al represor del operador para que se lleve a cabo la transcripción y se promueva la expresión del polipéptido o proteína de fusión de la invención.

La elección de un promotor y otro/s elemento/s regulatorios generalmente varía en función de la célula huésped utilizada. Promotores adecuados en el contexto de la presente invención incluyen promotores constitutivos que promueven la expresión de las secuencias asociadas a ellas de forma constante y promotores inducibles, que requieren de un estímulo externo para promover la transcripción de las secuencias asociadas a ellos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de promotores útiles para la puesta en práctica de la presente invención incluyen:

- promotores constitutivos, tales como, por ejemplo, el promotor de la alcohol deshidrogenasa (ADH1), el promotor del factor de elongación 1 alfa (TEF) y el promotor del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa (TPI), el promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa (GPK), el promotor MRP7; y
- 5 - promotores inducibles, tales como, por ejemplo, el promotor de la metalotioneína (CUP1) cuya expresión se regula mediante adición de cobre al medio de cultivo, el promotor del gen que codifica el gen FUS1 o el gen FUS2, cuya expresión se activa en presencia de feromonas (el factor  $\alpha$ ) según se describen en US5063154, el promotor TET cuya expresión se regula en presencia de tetraciclinas, los promotores GAL1-10, GALL, GALS que se activan en presencia de galactosa, el promotor VP16-ER, inducible por estrógenos, y el promotor de la fosfatasa (PH05) cuya expresión se activa en presencia de fosfato y el promotor de la proteína de choque térmico HSP150, cuya expresión se activa a elevada temperatura.

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

En una realización más particular, dicho promotor es un promotor inducible, preferentemente, un promotor inducible por IPTG.

20 La invención también contempla el uso de aumentadores de la expresión del polinucleótido de la invención.

Los vectores que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, típicamente, un origen de replicación, un gen de resistencia a antibióticos, un origen de replicación en bacterias (necesario para la propagación en bacterias), sitios múltiples de clonaje, y un marcador genético. El marcador genético es, habitualmente, un gen que confiere resistencia a un antibiótico o, alternativamente, un marcador auxotrófico. Así, genes marcadores útiles en el contexto de la presente invención incluyen por ejemplo el gen de resistencia a la neomicina, que confiere resistencia al aminoglucósido G418; el gen de la higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a higromicina; el gen *odc*, que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa (2-(difluorometil)-DL-ornitina (DFMO)); el gen de la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia a metrotexato; el gen de la puromicina-N-acetil transferasa, que confiere resistencia a puromicina; el gen *ble*, que confiere resistencia a zeocina; el gen de la adenosina deaminasa que confiere resistencia a 9-beta-D-xilofuranosil adenina; el gen de la citosina deaminasa, que permite a las células crecer en presencia de N-(fosfonacetil)-L-aspartato; timidina kinasa, que permite a las células crecer en presencia de aminopterina; el gen de la xantina-guanina fosforibosiltransferasa, que permite a las células crecer en presencia de xantina y ausencia de guanina, etc. Otros marcadores auxotróficos que se pueden usar según la presente invención, son los genes *trp1*, *ura3*, *leu2*, *his3* o *lys2*, que complementan defectos genéticos en las células que los portan, lo que permite a dichas células crecer en ausencia de triptófano, uracilo, leucina, histidina y lisina, respectivamente

El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar organismos susceptibles de ser transformados, transfectados o infectados por dicho vector. Dichos organismos pueden ser procariontes o eucariotes, ventajosamente organismos mesófilos, por ejemplo, bacterias mesófilas. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos organismos (organismos huéspedes) que pueden ser utilizados en la presente invención incluyen células procariontes o células eucariotes, tales como levaduras (e.g., *Pichia*), hongos, etc.; no obstante, los organismos preferidos son microorganismos procariontes, ventajosamente mesófilos.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un organismo, en adelante "organismo de la invención", que comprende un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención o un vector de la invención. Dicho organismo puede ser procarionte o eucariote, ventajosamente un organismo mesófilo, por ejemplo, una bacteria mesófila. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos organismos incluyen levaduras (e.g., *Pichia*), hongos, etc., preferentemente, organismos mesófilos, aún más preferentemente, bacterias mesófilas (e.g., *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, etc.).

Dicho organismo de la invención puede obtenerse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante transformación, transfección o infección con un vector de la invención.

55 En una realización particular, la invención proporciona un organismo mesófilo, en ocasiones identificado en esta descripción como "organismo mesófilo de la invención", que comprende un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención o un vector de la invención. Un "organismo mesófilo",

- tal como aquí se utiliza, es un organismo cuya temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 20°C y 45°C. Prácticamente cualquier organismo, preferentemente procariota, cuya temperatura óptima de crecimiento está comprendida dentro de ese intervalo de temperatura puede ser utilizado en la puesta en práctica de la presente invención, por ejemplo, organismos procariotas, tales como bacterias mesófilas. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de bacterias mesófilas que pueden ser utilizadas según la presente invención, incluyen bacterias Gram negativas, por ejemplo, cepas de *Escherichia spp.* (e.g., *E. coli*, etc.), cepas de *Salmonella spp.* (e.g., *S. typhimurium*, etc.), cepas de *Pseudomonas spp.* (e.g., *P. aeruginosa*, *P. putida*, etc.), etc., que pueden ser transformadas con una construcción génica de la invención o con un vector de la invención, tal como un vector de expresión proporcionado por esta invención. En una realización preferida, dicha bacteria es *E. coli*. Ejemplos ilustrativos de cepas de *E. coli* que pueden ser empleadas según la invención incluyen las cepas BL21 (DE3), DH10B y DH5 $\alpha$ . Alternativamente, se pueden emplear bacterias Gram positivas, tales como *Bacillus spp.* o *Streptomyces spp.*
- Dicho organismo mesófilo de la invención puede obtenerse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante transformación, transfección o infección con un vector de la invención.

#### Procedimiento de obtención del polipéptido de la invención y de la proteína de fusión de la invención

- El polipéptido de la invención, así como la proteína de fusión de la invención, se pueden obtener mediante diversos métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, mediante el empleo de técnicas de ADN recombinante. De hecho, tanto el polinucleótido de la invención como el vector de la invención pueden ser utilizados para producir el polipéptido de la invención o la proteína de fusión de la invención.

- Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para producir un polipéptido de la invención, o una proteína de fusión de la invención, en adelante "procedimiento de la invención", que comprende crecer un organismo de la invención bajo condiciones que permiten la producción de dicho polipéptido de la invención o de dicha proteína de fusión de la invención. En una realización particular, dicho organismo de la invención es un organismo mesófilo. Las condiciones para crecer dicho organismo de la invención y producir dicho polipéptido de la invención o dicha proteína de fusión de la invención dependerán del organismo utilizado y son conocidas por los expertos en la materia, quienes podrán efectuar las modificaciones oportunas para optimizar el cultivo de dicho organismo.

- Las características del "organismo de la invención" y de "organismo mesófilo" han sido definidas anteriormente y se incorporan aquí por referencia.

- Para la obtención del polipéptido de la invención, o la proteína de fusión de la invención, mediante la tecnología del ADN recombinante pueden utilizarse métodos conocidos en el estado de la técnica (Sambrook, J., et al., 2001 Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.). Así, a modo de ejemplo ilustrativo no limitativo, un organismo de la invención, tal como, por ejemplo, un organismo mesófilo de la invención, puede obtenerse mediante la transformación de un organismo determinado con el polinucleótido de la invención, la construcción génica o el vector de la invención. En una realización preferida la transformación de dicho organismo se lleva a cabo mediante choque térmico en presencia de ión cálcico (Ca<sup>2+</sup>). El clon transformado se puede seleccionar mediante el crecimiento en placa en un medio que comprende un agente de selección, por ejemplo, un antibiótico. En caso de que dicho organismo haya sido transformado con el plásmido pET28, el agente de selección puede ser kanamicina. El crecimiento de un clon transformado seleccionado puede realizarse en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, agar LB (Luria Bertani) líquido a 37°C durante 12 horas. Para la producción del polipéptido de la invención, o de la proteína de fusión de la invención, un inóculo del cultivo anterior se crece en medio de cultivo, e.g., LB, suplementado con una fuente de ión cálcico, e.g., cloruro cálcico (CaCl<sub>2</sub>) y en el caso de co-expresión con chaperonas expresadas en vectores con el promotor araB (e.g., pKJE7, pGro7, pG-KJE8) puede añadirse L-arabinosa para inducir su expresión. Los organismos transformados se mantienen en agitación a temperatura apropiada hasta que se alcanza la cantidad deseada, por ejemplo, una densidad óptica a 600 nm aproximada de 0,6  $\pm$  0,5. La inducción de la expresión del polipéptido de la invención o de la proteína de fusión de la invención dependerá del tipo de promotor empleado; así, en una realización particular, se usa preferentemente IPTG cuando el promotor es inducible por IPTG. Tras la inducción de la expresión el cultivo se mantiene durante un periodo de tiempo apropiado, a la temperatura adecuada, bajo agitación (opcional).

- Si se desea, el polipéptido de la invención, o la proteína de fusión de la invención, pueden ser aislados y, opcionalmente, purificados, por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Por tanto, en una realización particular, el procedimiento de la invención comprende, además, la etapa de aislamiento y, opcionalmente, purificación, del polipéptido de la invención o de la proteína de fusión de la invención. Esta etapa de aislamiento y, opcionalmente, purificación, puede realizarse por métodos convencionales tal como se ha mencionado previamente.

Prácticamente cualquier método conocido en la técnica puede ser utilizado para aislar y, si se desea, purificar, el polipéptido de la invención o la proteína de fusión de la invención, del interior celular o del medio de cultivo. Si la proteína se produce en el interior de la célula (organismo), es necesario lisar las células para liberar las proteínas de la invención. Así, en caso de que dicho organismo sea una bacteria, ésta se puede lisar por diferentes métodos que incluyen tratamiento con álcalis o calor, detergentes iónicos o no iónicos y disolventes orgánicos, o sonicación. La elección del método de extracción dependerá de la especie bacteriana de que se trate de forma que el tratamiento debe modificarse según el organismo hospedador (e.g., especie bacteriana o estirpe), debido a la diferente composición de la pared celular de los distintos microorganismos. En una realización preferida, la lisis celular se lleva a cabo mediante sonicación.

En una realización preferida, el procedimiento de la invención comprende lisar el organismo de la invención en una solución que carece de inhibidores de serín proteasas, ya que el polipéptido de la invención o la proteína de fusión de la invención poseen una serina catalítica.

Una vez que el polipéptido de la invención o la proteína de fusión de la invención se encuentran en el medio, bien mediante liberación del interior celular bien porque el polipéptido de la invención, o la proteína de fusión de la invención, es secretado por la propia maquinaria de secreción del organismo de la invención, se pueden utilizar métodos convencionales para purificar dicho polipéptido de la invención o dicha proteína de fusión de la invención, incluyendo, sin limitarse a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, de interacción hidrofóbica, de filtración en gel, HPLC, etc.), métodos electroforéticos (isoelectroenfoque preparativo, electroforesis preparativa en geles de poli(acrilamida)-SDS, etc.), solubilidad diferencial (precipitación con sulfato amónico, etc.), ultracentrifugación preparativa en gradiente de sacarosa, etc.

En una realización preferida, al polipéptido de la invención se le ha añadido una cola de histidinas, o la proteína de fusión de la invención contiene una cola de histidinas, y, por tanto, la purificación se lleva a cabo mediante columnas que permiten retener sólo aquellos polipéptidos de la invención (o proteínas de fusión de la invención) que poseen una cola de histidina, por ejemplo, columnas con níquel o cobalto (Talon clontech).

Una vez que se ha alcanzado el grado deseado de pureza, lo que puede requerir más de un paso cromatográfico, es frecuente que sea necesario concentrar el polipéptido de la invención, o la proteína de fusión de la invención, o eliminar sales e iones que puedan ser perjudiciales para su posterior uso. En ese caso, se recurre a técnicas conocidas, tales como liofilización o ultrafiltración. Es recomendable recuperar y almacenar el polipéptido de la invención o la proteína de fusión de la invención en un tampón apropiado para conservar su funcionalidad, por ejemplo, en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 con  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  0,5 mM y NaCl 5 mM.

La presencia de aditivos estabilizadores, tales como polioles, interfiere con componentes en la mezcla de reacción de la actividad penicilina acilasa del polipéptido de la invención, o la proteína de fusión de la invención; por tanto, en una realización preferida, el polipéptido de la invención, o la proteína de fusión de la invención, se mantienen en una solución exenta de tales aditivos estabilizadores (e.g., polioles).

La determinación del grado de pureza del polipéptido de la invención, o de la proteína de fusión de la invención, se puede estimar mediante el valor de la actividad enzimática específica que se calcula dividiendo el número de unidades de actividad enzimática entre la cantidad de mg de proteína en un volumen determinado.

En una realización adicional, el procedimiento de la invención comprende la producción del polipéptido de la invención, o de la proteína de fusión de la invención, junto con proteínas del sistema de chaperonas.

Una “chaperona”, tal como aquí se utiliza, es una proteína encargada del plegamiento correcto de proteínas recién formadas. En una realización particular, las proteínas del sistema de chaperonas se seleccionan del grupo formado por DnaK/J, GrpE, factor desencadenante y GroEL/ES. En una realización más particular, las proteínas del sistema de chaperonas son DnaK/J y/o GrpE, mientras que, en otra realización particular, son GroEL/ES.

“DnaK”, tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a una proteína con número de acceso P0A6Y8 en la base de datos Uniprot a fecha 18 de abril de 2012.

“DnaJ”, tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a una proteína con número de acceso P08622 en la base de datos Uniprot a fecha 18 de abril de 2012. Las proteínas no plegadas se unen inicialmente a DnaJ y junto a DnaK se forma un complejo estable. DnaK junto a DnaJ puede unir y proteger los polipéptidos más largos.

“GrpE”, tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a una proteína con número de acceso P09372 en la base de datos Uniprot a fecha 18 de abril de 2012.

5 “Factor desencadenante”, tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a una proteína con número de acceso P0A850 en la base de datos Uniprot a fecha 18 de abril de 2012. Se trata de una chaperona de *E. coli* de 48 kDa, que actúa protegiendo la cadena nascente de una proteína y acelerando la isomerización peptidil-prolil cis trans.

10 “GroEL”, tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a una proteína con número de acceso P0A6F5 en la base de datos Uniprot a fecha 18 de abril de 2012. Se trata de una chaperona molecular de *E. coli* de 60 kDa que forma un complejo cilíndrico activo de 2 anillos que contienen 7 sub-unidades de GroEL cada uno. GroES junto con GroEL forman parte del complejo molecular llamado GroEL/GroES.

“GroES”, tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a una proteína con número de acceso P0A6F9 en la base de datos Uniprot a fecha 18 de abril de 2012. Se trata de una chaperona molecular de *E. coli* de 10 kDa que sirve de cubierta o tapa en los 2 extremos del complejo cilíndrico GroEL. El complejo GroEL/ES facilita el plegamiento proteico después de la terminación de la traducción.

15 Aunque el procedimiento de la invención se puede llevar a cabo en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , en una realización particular y preferida, el procedimiento de la invención se lleva a cabo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de cultivo. Dicho  $\text{Ca}^{2+}$  puede proceder de cualquier fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  apropiada, por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ , etc.; en este caso, el  $\text{Ca}^{2+}$  está presente a una concentración comprendida entre mayor que 0 y 50 mM, típicamente, a una concentración comprendida entre 1 y 40 mM, ventajosamente entre 5 y 25 mM, 20 preferentemente entre 8 y 15 mM; en una realización más particular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de cultivo es de 10 mM.

#### Método de obtención de 6-APA

25 El polipéptido de la invención, así como la proteína de fusión de la invención, tiene actividad penicilina acilasa (hidrólisis de penicilinas para obtener 6-APA) y es termoestable, por lo que puede utilizarse para producir penicilinas semisintéticas, ventajosamente, a temperatura elevada.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener 6-APA que comprende poner en contacto una penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del nitrógeno, con un polipéptido de la invención, o con una proteína de fusión de la invención, bajo condiciones que permitan la hidrólisis de dicha penicilina.

30 En una realización particular, dicha penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del nitrógeno es una penicilina que contiene un grupo funcional de fórmula general R-CO-NH-, donde R es alquilo, alquenoilo, ariloxialquilo o arilalquilo, en la posición 6 del anillo penam. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de penicilinas que pueden ser hidrolizadas mediante la acción de un polipéptido de la invención, o de una proteína de fusión de la invención, incluyen penicilina K, 35 penicilina F, penicilina dihidro F, penicilina V y penicilina G.

Los términos “6-APA”, “grupo carboxamida”, “hidrofóbico”, “penicilina K”, “penicilina F”, “penicilina dihidro F”, “penicilina V” y “penicilina G”, han sido definidos previamente en detalle en relación con el polipéptido de la invención y sus definiciones se incorporan aquí por referencia.

40 El método para obtener 6-APA proporcionado por la presente invención comprende poner en contacto una penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del nitrógeno, con un polipéptido de la invención, o con una proteína de fusión de la invención, bajo condiciones que permitan la hidrólisis de dicha penicilina. Dichas condiciones son conocidas por los expertos en la materia quienes pueden seleccionar las condiciones más apropiadas para cada caso, en función de la penicilina y el polipéptido de la invención, o proteína de fusión de la invención, 45 seleccionados.

La temperatura a la que puede realizarse la hidrólisis de la penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del nitrógeno, por acción del polipéptido de la invención, o de la proteína de fusión de la invención, puede variar dentro de un amplio intervalo el cual incluye el intervalo de temperatura en el que dicho polipéptido de la invención, o dicha proteína de fusión de la invención, es estable; no obstante, en una realización particular, dicha hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre aproximadamente 57,5°C y 82,5°C, típicamente entre 60°C y 75°C, por ejemplo, alrededor de 65°C aproximadamente.

En una realización particular, se describe la obtención de 6-APA mediante incubación, a 65°C, en tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,8, de penicilina K, penicilina F, penicilina dihidro F, penicilina V o penicilina G, con 0,5-10 µg de un polipéptido de la invención, durante 5-20 minutos.

Anticuerpo de la invención

- 5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo, en adelante “anticuerpo de la invención”, que reconoce específicamente un polipéptido de la invención. En una realización particular, dicho anticuerpo de la invención es un anticuerpo que reconoce específicamente la sub-unidad alfa de dicho polipéptido de la invención, la cual se sitúa entre el aminoácido en posición 1 y el aminoácido en posición 218 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En otra realización particular, dicho anticuerpo de la invención es un anticuerpo que reconoce específicamente la sub-unidad beta de dicho polipéptido de la invención, la cual se sitúa entre el aminoácido en posición 219 y el aminoácido en posición 739 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:1.

- 15 El término “anticuerpo de la invención”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una inmunoglobulina, o a un fragmento de la misma, con capacidad de unión a un polipéptido de la invención, tal como un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o a una variante funcionalmente equivalente, tal como la que comprende al menos una mutación puntual en un aminoácido seleccionado entre leucina en posición 151, serina en posición 152, leucina en posición 242 e isoleucina en posición 275 (en relación con la SEQ ID NO: 1) en donde uno más de dichos aminoácidos es sustituido por un aminoácido aromático, por ejemplo, fenilalanina. Dicho término “anticuerpo de la invención” incluye todo tipo de anticuerpos, e.g., anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, etc., así como fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), diabodies, etc.
- 20

Una revisión de los principales métodos para la producción y purificación de los anticuerpos puede encontrarse, por ejemplo, en:

- 25 - “Handbook of Therapeutic Antibodies”, de S. Dübel. Editor: Wiley-VCH, 2007, Vol: I a III (ISBN 978-3527314539);
- “Antibodies: Volume 1: Production and Purification” de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, 1st Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458);
- 30 - “Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use”, de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, primera edición, 2004 (ISBN 978-0306483158);
- “Molecular Cloning: a Laboratory manual”, de J. Sambrook y D.W. Russel Eds., Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001 (ISBN 978-0879695774).

- 35 En una realización particular, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo policlonal. Los anticuerpos policlonales pueden ser producidos en un mamífero, o en un ave, tras la administración de un antígeno, tal como un antígeno de la proteína PAC de *T. thermophilus*, o un fragmento antigénico del mismo.

- 40 En otra realización particular, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse a partir de hibridomas, en los que un ratón u otro animal hospedador apropiado, es inmunizado con un polipéptido de la invención, o con un fragmento antigénico del mismo, con el fin de inducir a los linfocitos que producen, o que son capaces de producir, anticuerpos, a que se unan específicamente al antígeno de acuerdo con las enseñanzas de Kohler and Milstein [Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975)]. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para producir un hibridoma. Los hibridomas se cultivan en un medio apropiado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Los clones se aíslan usando el método de la dilución limitante, y el medio de cultivo (sobrenadante) en el que se cultivan los hibridomas se analiza para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido de la invención mediante técnicas convencionales, e.g., citometría de flujo, inmunoprecipitación, etc. Procedimientos alternativos para producir anticuerpos monoclonales han sido descritos en US 4.816.567; Fernández, Curr. Op. Biotech., 15: 364-373 (2004); y en Schmidt, Eur. J. Biochem., 268: 1730-1738 (2001).
- 45
- 50

- 55 En otra realización particular, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo construido con regiones variables de un anticuerpo de una especie (normalmente un mamífero en el que se generó un anticuerpo monoclonal) y regiones constantes de otra especie (aquella en la que se va a usar el anticuerpo quimérico). El objetivo de dicha construcción es obtener un anticuerpo con el anticuerpo monoclonal original pero menos inmunogénico y mejor tolerado

en el sujeto que se va a tratar, con una semivida sérica mejorada y que puede ser reconocido por mecanismos efectores inmunológicos, es decir, el complemento, el receptor Fc de células citotóxicas u otros receptores específicos de las inmunoglobulinas que muestren especificidad especie.

5 En otra realización particular, el anticuerpo de la invención es un fragmento de un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab' o scFv. Se conocen diversas técnicas para producir fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos procedían de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, pero más recientemente estos fragmentos pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un scFv, que adicionalmente puede ser mono-específico o biespecífico.

10 Como es conocido, la digestión con papaína de un anticuerpo produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante de la cadena pesada.

15 El tratamiento con pepsina rinde un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de unión al antígeno y que todavía es capaz de reticular al antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el carboxi terminal del dominio CH1 la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.

20 Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno. Esta región está formada por un dominio variable en dímero de una cadena pesada y una cadena ligera variable en una fuerte asociación no covalente. Es en esta configuración en la que interactúan las tres regiones hipervariables de cada dominio variable para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo la especificidad antígeno-anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv, que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

25 Los fragmentos "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un polipéptido conector entre los dominios VH y VL que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los scFv véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, N.Y., págs. 269-315 (1994).

30 El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, comprendiendo esos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un conector que sea demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena, y crear dos sitios de unión al antígeno.

### **EJEMPLOS**

40 La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos que deben ser considerados como meramente ilustrativos y no limitativos de la misma. Para la realización de dichos ejemplos, se han utilizados los materiales y métodos descritos a continuación, salvo indicación en sentido contrario.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### Materiales y cepas bacterianas

45 Todos los reactivos empleados eran de calidad analítica y se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.) o Merck (Darmstadt, Alemania). Las penicilinas G, V, K, F y dihidroF las proporcionó amablemente Antibióticos S.A. (León, España). *Tth Δpac* es un microorganismo deficiente en el gen *pac* (número de registro de NCBI TTC1972) derivado de la cepa *Tth* HB27. *Tth ΔslpA* es un microorganismo deficiente en el gen *slpA* derivado de la cepa *Tth* NAR1 (Castan P et al., Extremophiles 2002, 6(3):225-232). Se usó *E. coli* DH5α [F-Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1] para las etapas de subclonación y se usó *E. coli* BL21(DE3) [F-ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3)] como huésped para la expresión de proteínas recombinantes.

#### Construcciones de plásmidos

Todos los cebadores usados en la invención se muestran en la lista de secuencias. Con el fin de producir anticuerpos contra las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  de PAC, se amplificó cada sub-unidad a partir del genoma de *Tth* HB27 usando los cebadores  $\alpha$ NdeIFw y  $\alpha$ EcoRV para la sub-unidad  $\alpha$  y  $\beta$ NdeIFw y  $\beta$ EcoRV para la sub-unidad  $\beta$  (Tabla 2). Se clonaron los fragmentos de ADN en el plásmido pET28b+ entre los sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI*, produciendo los plásmidos pET28 $\alpha$ PAC y pET28 $\beta$ PAC. Para la expresión de las fusiones con sGFP, se amplificaron la secuencia líder de *Tthpac*, el gen *Tthpac* completo, *Tthpac* que carece de su secuencia líder y el gen que codifica para  $\beta$ -glicosidasa de *Tth* (número de registro de NCBI TTP0042) a partir del genoma de *Tth* HB27 usando los pares de cebadores LsFw/LsRv, pacFw/pacRv,  $\Delta$ SppacFw/pacRv y  $\beta$ glyFw/ $\beta$ glyRv (Tabla 2). Se clonaron las fusiones génicas en el plásmido pMKPnqosGFP. Para la expresión de la proteína quimérica Sp<sub>Eco</sub>-PAC<sub>Tth</sub>, se amplificó la secuencia codificante para el péptido señal de PGA de *E. coli* con los cebadores EcoFw y EcoRv (Tabla 2). Se amplificó el gen *pac* de *Tth* que carece de su secuencia líder a partir del genoma de *Tth* HB27 con los cebadores  $\Delta$ SppacFw y  $\Delta$ SppacRv (Tabla 2). Se ensambó la fusión génica mediante PCR de extensión por solapamiento y se ligó al plásmido de expresión pMKPnqo. Para la expresión homóloga de *Tth*PAC, se amplificó el gen *pac* a partir del genoma de *Tth* HB27 con los cebadores pac2Fw y pac2Rv (Tabla 2). Se ligó el gen al plásmido de expresión pWUR112/77-1 y la construcción se denominó pWURPAC. Para la expresión heteróloga de *Tthpac*, se usaron el cebador  $\Delta$ Sppac2Fw y el cebador  $\Delta$ Sppac2Rv (Tabla 2) en una reacción de PCR para la amplificación de un fragmento de 2223 pb correspondiente al gen *Tthpac* sin la secuencia codificante de 111 nucleótidos en 5'. Se clonó el gen amplificado en el plásmido pET28a entre los sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI*, produciendo el plásmido pET28a- $\Delta$ SpPAC. Entonces se transformó la construcción en células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se extrajeron los plásmidos y se secuenciaron sus insertos para confirmar la ausencia de mutaciones en el gen *Tthpac*.

**Tabla 2**  
**Cebadores empleados en la construcción de los plásmidos**

Nombre	Secuencia de los cebadores (5' - 3')	Sitios de restricción (subrayada en la secuencia del cebador)
$\alpha$ NdeIFw (SEQ ID NO: 3)	CGCCATATGCTGGAGGGGCTTTCC	<u>NdeI</u>
$\alpha$ EcoRV (SEQ ID NO: 4)	AAAGAATTCTTAGGTGGGGGCGTCCT	<u>EcoRI</u>
$\beta$ NdeIFw (SEQ ID NO: 5)	AAAACATATGAGCAACAAGGTTGGTG	<u>NdeI</u>
$\beta$ EcoRV (SEQ ID NO: 6)	AAAGAATTCTTAAGGCGAAGGAAGGGG	<u>EcoRI</u>
LsFw (SEQ ID NO: 7)	AAAACATATGCTTTTTCCAACCATGA	<u>NdeI</u>
LsRv (SEQ ID NO: 8)	AAAAGAATTCCAGGGCGATGCGGCCT	<u>EcoRI</u>
PacFw (SEQ ID NO: 9)	CGCCATATGCTGGAGGGGCTTTCC	<u>NdeI</u>
PacRv (SEQ ID NO: 10)	GAGGGAATTCAGGCGAAGGAAGGGGCT	<u>EcoRI</u>
BglyFw (SEQ ID NO: 11)	AAACATATGACCGAGAACGCCGA	<u>NdeI</u>
BglyRv (SEQ ID NO: 12)	AAAAGAATTCCGGTCTGGGCCCGCG	<u>EcoRI</u>
EcoFw (SEQ ID NO: 13)	CGACGCCATATGAAAAATAGAAATCGTATGATC	<u>NdeI</u>
EcoRv (SEQ ID NO: 14)	GGCAGGGAAGCCAGTGCAGGTAAG	-
$\Delta$ SppacFw (SEQ ID NO: 15)	TGCACTGGCTTCCCTGCCCAAG	-
$\Delta$ SppacRv (SEQ ID NO: 16)	AAAGAATTCTTAAGGCGAAGGAAGGGG	<u>EcoRI</u>
pac2Fw (SEQ ID NO: 17)	AAAACATATGCTTTTTCCAACCATGA	<u>NdeI</u>
pac2Rv (SEQ ID NO: 18)	AAAAGAATTCTTAAGGCGAAGGAAGGGG	<u>EcoRI</u>
$\Delta$ Sppac2Fw (SEQ ID NO: 19)	AATTCCATATGCTCCCTGCCCAAGG	<u>NdeI</u>
$\Delta$ Sppac2Rv (SEQ ID NO: 20)	AAAGAATTCTTAAGGCGAAGGAAGGGG	<u>EcoRI</u>

Microscopía confocal

Se realizó microscopía de fluorescencia usando un microscopio confocal LSM510 invertido de Zeiss. Se obtuvieron pilas Z usando una lente objetivo Plan-Neofluar de aceite de 100x/1,3 de Zeiss y parámetros apropiados para cumplir con los criterios de Nyquist para la toma de muestras de imágenes. Se sometieron las imágenes a deconvolución lineal usando el software Huygens System 2.2 (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum. Países Bajos). Se usaron Adobe Photoshop e Image J (Wayne Rasband, NIH, EE.UU.) para el ensamblaje final de las imágenes. Para experimentos de fusión de sGFP, se transformó la cepa *Tth* HB27 con cada una de las fusiones de sGFP ( $\beta$ -glicosidasa-sGFP,  $\Delta$ Sp<sub>Tth</sub>PAC-sGFP, *Tth*PAC-sGFP y Sp<sub>Tth</sub>PAC-sGFP) y se hizo crecer de manera aerobia en medios líquidos TB (Ramirez-Arcos *et al.*, Biochim Biophys Acta. 1998 Mar 9;1396(2):215-27; Ramirez\_Arcos *et al.*, Journal of Bacteriology (1998), June 1998, Vol. 180(12):3137-3143) a 70°C con agitación suave (150 rpm) hasta una

DO<sub>550</sub> de 0,2-0,4 antes de la recogida de células mediante centrifugación a baja velocidad (3.000 xg, 5 min.). Se añadió Mowiol tras lavar las células con agua Milli-Q.

#### Aislamiento de la fracción de membrana de células de *Tth*

- 5 Se recogieron bacterias en fase de crecimiento semilogarítmica mediante centrifugación a 5.000 xg durante 5 min a temperatura ambiente. Se lavó el sedimento en tampón TE 1X (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) y se resuspendió en TE. Se rompieron las células en un sonicador LABSONIC U (B. Braun) (2 veces 30 segundos – 1 minuto). Se eliminaron las células intactas mediante centrifugación a 5000 xg durante 5 min. Se ultracentrifugó el sobrenadante 30 min a 201.240 xg a 4°C en un aparato Beckman TL-100. Se lavó el sedimento en Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. El  
10 sedimento final correspondía a la fracción de membrana.

#### Solubilización selectiva de componentes de la membrana

- 15 La solubilización selectiva de la membrana citoplasmática mediante detergentes no iónicos o débilmente iónicos es un método ampliamente usado para separar los componentes de la membrana interna y externa en bacterias Gram negativas. Se resuspendió la fracción de membrana en Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y Triton X-100 al 1% o Sarkosyl al 1% y se incubó durante 30 min a 37°C. Entonces se ultracentrifugaron las muestras 30 min a 201.240 xg y 4°C. Se almacenó el sobrenadante y se lavó el sedimento una vez más en el mismo tampón y se centrifugó en las mismas condiciones. Se sometieron ambas fracciones a SDS-PAGE e inmunodetección de las sub-unidades de *TthPAC*.

#### Accesibilidad de tripsina

- 20 Se hizo crecer la cepa *Tth* NAR1  $\Delta$ *slpA* a 70°C en condiciones aerobias hasta la saturación. Se recogieron las bacterias mediante centrifugación a 5.000 xg durante 5 min a temperatura ambiente, se lavaron una vez con Tris-HCl 10 mM pH 8,0, y se resuspendió el sedimento resultante en el mismo tampón hasta una concentración celular final de 10<sup>10</sup> células/ml. Se llevó a cabo el tratamiento con tripsina usando 2 concentraciones diferentes de enzima a 37°C en presencia o ausencia de EDTA 5 ó 10 mM. Se  
25 analizó la integridad de *TthPAC* mediante inmunotransferencia de tipo Western.

#### Expresión homóloga

- 30 Se transformó la cepa mutante *Tth* HB27  $\Delta$ *pac* con el plásmido pWUR112/77-1 que portaba el gen *pac* (pWURPAC) y se sembró en placa sobre agar TB (Ramírez-Arcos *et al.*, 1998, citado *supra*) con bleomicina. Se llevó a cabo la expresión constitutiva de PAC haciendo crecer los clones de manera aerobia en medios líquidos TB (Ramírez-Arcos *et al.*, 1998, citado *supra*) con bleomicina a 70°C y 150 rpm hasta la saturación. Se recogieron las células mediante centrifugación a 4.000 xg y 4°C durante 15 min. Se resuspendieron los sedimentos de células en tampón Tris 50 mM pH 7,5 y NaCl 50 mM y se rompieron mediante sonicación en un baño de hielo (2 rondas de 45 segundos), usando un sonicador LABSONIC U (B. Braun).

#### Expresión heteróloga y purificación de PAC

- 35 Se transformó la cepa *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET28a que portaba el gen  $\Delta$ Sp-*Tthpac* (pET28a- $\Delta$ spPAC) y se sembró en placa sobre agar LB con kanamicina (30  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). Entonces se transformó la cepa *E. coli* BL21(DE3) pET28a- $\Delta$ spPAC con los vectores pGTF2, pTf16, pGro7 o pKJE7 (Takara Bio Inc.), que portaban los genes para los sistemas de chaperonas GroEL-GroES, factor  
40 desencadenante, GrpE y DnaK-DnaJ. Se sembraron en placa los transformantes sobre agar LB que contenía kanamicina (30  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) y cloranfenicol (30  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). Ambas transformaciones se basaron en el método de choque de temperatura con calcio.

- 45 Se prepararon los inóculos para la producción de proteínas continua mediante cultivo durante la noche del clon seleccionado en matraces de agitación de 100 ml con 20 ml de medio LB a 37°C. Para la producción de proteínas, se transfirieron 1,5 ml del cultivo de inóculo correspondiente a 150 ml de medio LB nuevo complementado con CaCl<sub>2</sub> 10 mM, y que contenía 0,5 g.L<sup>-1</sup> de L-arabinosa para la inducción de chaperonas. Se cultivaron las células a 37°C y 200 rpm hasta que alcanzaron el punto de inducción de la sobreexpresión de *TthPAC*, correspondiente a una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,6  $\pm$  0,5. Se realizó la  
50 inducción mediante la adición de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) hasta una concentración final de 1 mM, y se continuó el cultivo durante 17 horas a 22°C y 200 rpm. Se recogieron las células mediante centrifugación (4.000 xg durante 15 min) a 4°C. Se resuspendieron los sedimentos de células en 10 ml de tampón de lisis (fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, NaCl 300 mM) y se rompieron mediante sonicación en un  
55 baño de hielo (3 rondas de 10 min., 0,6 pulsos y 40% de potencia), usando un sonicador LABSONIC U (B. Braun). Se separaron las fracciones de proteínas solubles e insolubles mediante centrifugación a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. Se purificó parcialmente el sobrenadante que contenía la proteína marcada con His a partir de las proteínas de *E. coli* termolábiles mediante un tratamiento de choque térmico de 20 min. a 65°C. Se recuperaron las proteínas termoestables del sobrenadante tras la centrifugación (12.000 xg

durante 30 min) a 4°C, y se sometieron a cromatografía IMAC usando una resina Talon Cell-through (BD Biosciences) previamente equilibrada con tampón de lisis. Se lavó la columna una vez con 1 volumen del tampón de lisis. Se eluyó la proteína marcada con His con imidazol 150 mM, se diafiltró y se concentró con dispositivos centrífugos de 10 kDa Amicon Ultra-15 (Millipore, X) usando fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, NaCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, y se almacenó a -20°C hasta su uso. Se evitó el uso de aditivos estabilizantes como polioles porque se observó interferencia con componentes de la mezcla de reacción. Se determinó el contenido en proteína usando el concentrado de reactivo de colorante de ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad, EE.UU.) con albúmina sérica bovina como patrón. Se prepararon muestras para la separación por SDS-PAGE en tampón de carga de SDS-PAGE 5x y se calentaron durante 5 min a 95°C. Se realizó la electroforesis de las muestras de proteína con SDS-PAGE al 12% (p/v) y se tiñó el gel con azul brillante de Coomassie R-250. Se sometieron a electrotransferencia muestras idénticas sobre membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpos de conejo policlonales contra la sub-unidad  $\alpha$  y  $\beta$  de *TthPAC*, y después con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina.

#### Producción de anticuerpos anti sub-unidad alfa y anti sub-unidad beta

Se amplificaron las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  de PAC a partir del genoma de *Tth* HB27 usando los cebadores  $\alpha$ NdeIFw y  $\alpha$ EcoRV para la sub-unidad  $\alpha$  y  $\beta$ NdeIFw y  $\beta$ EcoRV para la sub-unidad  $\beta$  (Tabla 2). Se clonaron los fragmentos de ADN en el plásmido pET28b+ entre los sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI*, produciendo los plásmidos pET28 $\alpha$ PAC y pET28 $\beta$ PAC. Una vez obtenidas las dos construcciones se transformó con cada una de ellas por separado la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), se indujo la expresión de los genes utilizando IPTG, y se purificó la sub-unidad alfa y beta como se detalla en el apartado "Expresión heteróloga y purificación de PAC". Los polipéptidos antigénicos correspondientes a los fragmentos de la sub-unidad alfa y beta fueron separados en geles de SDS-PAGE y la generación de anticuerpos de conejo anti-sub-unidad alfa y anti-sub-unidad beta la llevó a cabo la empresa PROALT (Protein Alternatives, S.L.), la cual nos proporcionó el suero inmune.

#### Análisis de MALDI-TOF/EM

Se sometió His<sub>6</sub>:: $\Delta$ Sp*TthPAC*, purificada por afinidad a metales, a SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y se tiñeron las proteínas con disolución de azul brillante de Coomassie R-250. Se cortaron del gel las bandas de polipéptidos correspondientes a las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína *TthPAC* y se sometieron a análisis con espectrómetro de masas MALDI-TOF. La identificación del péptido mediante CL/EM/EM se llevó a cabo en la 'CBMSO PROTEIN CHEMISTRY FACILITY', un miembro de la red ProteoRed.

#### Determinación de la actividad enzimática de *TthPAC*

Se usó fluorescamina para seguir la cinética de *TthPAC* contra penicilinas, cefalosporinas u homoserina-lactonas, a través de la reacción con el grupo amina primaria de los productos de reacción correspondientes. Se tomaron alícuotas de 40  $\mu$ l de la mezcla de reacción a intervalos regulares y se congelaron inmediatamente en nieve carbónica, tras lo cual se añadieron 140  $\mu$ l de tampón acetato 200 mM pH 4,5 y 20  $\mu$ l de fluorescamina 1 mg.ml<sup>-1</sup> en acetona. Tras una incubación de 60 min a temperatura ambiente, se determinó la fluorescencia (exc. 380 nm - em. 530 nm) en un lector de placas FLUOStar OPTIMA (BMG LabTech). Se realizaron todos los experimentos por duplicado, y se restó el efecto de la hidrólisis no enzimática de sustratos. Se analizó la selectividad de sustrato usando penicilina (Pen) K, F, dhidro F (DHF), V o G, ácido glutaril-7-aminocefalosporánico (glutaril-7ACA), cefalosporina C y butiril u octanoil-homoserinalactonas (C4 o C8-HSL, respectivamente). Se determinaron los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$  midiendo la velocidad inicial de hidrólisis en un intervalo de concentraciones de sustrato desde 0,1 hasta 50 mM, usando 0,8-2,0  $\mu$ g de enzima purificada en MES 20 mM pH 5,5 durante hasta 1 h a 65°C. Se sometió a ensayo el pH óptimo para la hidrólisis de penicilina K 2,5 mM a 65°C en tampón Britton-Robinson 20 mM a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9. Se sometió a ensayo el pH óptimo para la hidrólisis de penicilina G 50 mM a 65°C en tampón Britton-Robinson 20 mM a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9. Se determinó la temperatura que proporciona la hidrólisis máxima de penicilina K incubando 0,2  $\mu$ g de enzima con 0,5 mM de penicilina K en MES 20 mM pH 5,5, en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l a diversas temperaturas dentro del intervalo de 57,5°C a 82,5°C. Se llevó a cabo la reacción en una placa de PCR de 96 pocillos en un termociclador (Bio-Rad) que funciona en modo de gradiente. Tras la reacción, se enfriaron inmediatamente los tubos en hielo, tras lo cual se añadieron 140  $\mu$ l de tampón acetato 200 mM pH 4,5 y 20  $\mu$ l de fluorescamina 1 mg.ml<sup>-1</sup> en acetona.

Para la comparación de la actividad desacilante de los distintos mutantes de *TthPAC* las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 65°C utilizando 0,8-6,0  $\mu$ g de enzima pura. Como el pH óptimo de la *TthPAC* para la hidrólisis de PenK difiere del pH óptimo para la hidrólisis de PenG, las reacciones con PenK (0,1 a 20 mM) se llevaron a cabo en tampón MES [ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico] 20 mM pH 5,5 y las reacciones con PenG (1 a 100 mM) se llevaron a cabo en fosfato sódico 20 mM pH 7,8. Se tomaron alícuotas de 40  $\mu$ l de la mezcla de reacción a intervalos regulares y se congelaron inmediatamente en nieve carbónica, tras lo cual se añadieron 140  $\mu$ l de tampón acetato 200 mM pH 4,5 y

20 µl de fluorescamina 1 mg.ml<sup>-1</sup> en acetona. Tras una incubación de 60 min a temperatura ambiente, se determinó la fluorescencia (excitación: 380 nm – emisión: 530 nm) en un lector de placas FLUOStar OPTIMA (BMG LabTech). Se realizaron todos los experimentos por duplicado, y se restó el efecto de la hidrólisis no enzimática de sustratos.

- 5 Las velocidades de hidrólisis fueron determinadas mediante regresión lineal de los valores obtenidos de las muestras tomadas a diferentes intervalos de tiempo y los parámetros cinéticos fueron calculados mediante ajuste no lineal de las velocidades a la ecuación de Michaelis-Menten utilizando el software GraphPad Prism.

10 Modelado molecular

El modelo de homología de la *Tth*PAC se realizó siguiendo el procedimiento automatizado incluido en el software Yasara Structure (Yasara Biosciences) en un nodo de cálculo de 8 procesadores. Los moldes utilizados se determinaron mediante una búsqueda interactiva PSI-BLAST contra la base de datos UniProt para calcular una matriz de puntuación específica de posición (PSSM) y una búsqueda contra la base de datos PDB. De los moldes seleccionados se obvió la estructura de código 1E3A porque corresponde al precursor inactivo de la EcoPGA y el objetivo era identificar residuos determinantes de la especificidad de sustrato y la catálisis, por lo que deben buscarse únicamente en la forma activa. El modelo de homología se construyó por tanto sobre los moldes 1KEC, 1CP9, 3K3W, 1H2G, 1GM7. Se puso especial atención en tener representadas las tres estructuras disponibles hasta el momento que provienen de diferentes microorganismos y 2 mutantes con especificidad de sustrato alterada, ya que al diferir significativamente de sus enzimas parentales, pueden asemejarse más a la *Tth*PAC que sus progenitoras. Para contribuir a un buen alineamiento y modelado de lazos sin estructura definida, se llevó a cabo una predicción de la estructura secundaria de *Tth*PAC mediante la creación de un perfil y su procesamiento con el algoritmo PSI-Pred de predicción de estructuras secundarias.

25 Para llevar a cabo el alineamiento de los moldes y la *Tth*PAC, se creó un perfil de la secuencia objetivo mediante un alineamiento múltiple con secuencias relacionadas extraídas de la base de datos Uniprot. Para cada uno de los moldes citados anteriormente se construyó un modelo si se disponía de un único alineamiento o 5 modelos alternativos cuando existió ambigüedad en los alineamientos. Los lazos se modelizaron utilizando una versión optimizada del programa SCWRL. Tras reconstruir, optimizar y refinar las cadenas laterales, todas las partes modeladas *de novo* se sometieron a una minimización energética. La bondad de los modelos se calculó utilizando el parámetro Z, que se define utilizando la fórmula  $Z = 0.145 \cdot \text{dihedros} + 0.390 \cdot \text{empaquetamiento1D} + 0.465 \cdot \text{empaquetamiento3D}$ .

35 Se priorizaron los modelos en base a este parámetro y se combinaron las mejores partes de cada uno de los 25 modelos para crear un modelo híbrido que fuera de mejor calidad que cada uno de los modelos individuales. El modelo final se obtuvo de dicha combinación sometida a una última minimización energética en disolvente explícito. Las imágenes se crearon con Pymol v0.99 (Delano Scientific).

Mutagénesis dirigida

40 Los reemplazos aminoacídicos αL188F, αL188R, αS189F, βL24F, βI57F fueron introducidos en el plásmido pET28a-Δsp*Tth*PAC utilizando un kit QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) según las instrucciones del fabricante y se confirmaron mediante secuenciación. Las diferentes combinaciones de mutaciones se introdujeron mediante rondas sucesivas de mutagénesis. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3**  
**Cebadores empleados en la construcción de los variantes**

Nombre	Secuencia (5´ - 3´)	Reemplazo introducido
αL188F_Fw (SEQ ID NO: 21)	atgatgagctacgacttctcgggaactggg	αL188F
αL188F_Rv (SEQ ID NO: 22)	cccagttccccgagaagtcgtagctcatcat	αL188F
αS189F_Fw (SEQ ID NO: 23)	caagatgatgagctacgaccttctcgggaactgggag	αS189F
αS189F_Rv (SEQ ID NO: 24)	ctcccagttccccgaaggtcgtagctcatcatcttg	αS189F
βL24F_Fw (SEQ ID NO: 25)	aacgacccccacttcgccctccagg	βL24F

$\beta$ L24F_Rv (SEQ ID NO: 26)	cctggaggggcgaagtgggggtcgtt	$\beta$ L24F
$\beta$ I57F_Fw (SEQ ID NO: 27)	ccggcgctcgtcttcgggcggaac	$\beta$ I57F
$\beta$ I57F_Rv (SEQ ID NO: 28)	gttccgcccaagacgacgccgg	$\beta$ I57F
$\alpha$ L188R- $\alpha$ S189F_Fw (SEQ ID NO: 29)	atgatgagctacgaccgcttcgggaactggaggagg	$\alpha$ L188R- $\alpha$ S189F
$\alpha$ L188R- $\alpha$ S189F_Rv (SEQ ID NO: 30)	cctcctcccagttcccgaagcggctgtagctcatcat	$\alpha$ L188R- $\alpha$ S189F

Los modelos estructurales de los mutantes dirigidos de *TthPAC* se construyeron a partir del mejor modelo de homología. Se introdujeron los reemplazos aminoacídicos utilizando el programa Yasara Structure (Yasara Biosciences) en un nodo de computación. Se minimizó la energía de los modelos resultantes utilizando el campo de fuerzas Yamber3. Las estructuras tridimensionales de los substratos fueron extraídas de la base de datos PDB si estaban disponibles o modelados con Corina a partir de sus correspondientes códigos SMILES. Los ensayos de acoplamiento se realizaron mediante la implementación de Autodock presente en Yasara Structure. Tras 25 simulaciones independientes, las soluciones fueron agrupadas si y solo si su RMSD fue mayor de 5,0 Å. La energías de unión fueron calculadas con Yasara (Yasara Biosciences) y las imágenes fueron creadas con Pymol 0.99 (Delano Scientific).

#### EJEMPLO 1

##### *TthPAC* se produce y procesa en *T. thermophilus*

En primer lugar y con el fin de poder estudiar la producción y maduración de *TthPAC*, se generaron anticuerpos contra las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la PAC codificada en el genoma de *Tth* HB27, producidas por separado en células de *E. coli*, tal y como se describe en detalle en el apartado Materiales y Métodos. Cada antisuero reconocía sólo la sub-unidad correspondiente de las PAC de las cepas de *Tth* HB27 y NAR1 (Figura 1), lo que demuestra: (i) su especificidad, (ii) la presencia de proteína PAC expresada de manera constitutiva en estas cepas y (iii) la existencia de un proceso de maduración de la pro-PAC para dar dos sub-unidades, similar al descrito para PAC mesófilas. Las movilidades electroforéticas aparentes de estas sub-unidades proteicas son de 22 y 60 kDa para las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente.

#### EJEMPLO 2

##### Ubicación subcelular de *TthPAC*

Las PAC son enzimas solubles en organismos mesófilos. Habitualmente, son proteínas periplásmicas en bacterias Gram negativas, secretadas al medio en la mayoría de las bacterias Gram positivas e incluso pueden ser proteínas intracelulares en géneros particulares como *Bacillus*. No existe ningún informe sobre el destino final de proteínas PAC en bacterias termófilas. Por tanto, con el fin de arrojar algo de luz sobre la ubicación subcelular de *TthPAC*, se realizaron fusiones de *TthPAC* con GFP de superplegamiento (sGFP, una variante de la proteína fluorescente verde que fluoresce apropiadamente a 70°C) y ensayos de solubilización diferencial de membranas. La sGFP se fusionó con la *TthPAC* completa (*TthPAC*-sGFP), con una *TthPAC* que carece de su péptido señal de 47 aminoácidos supuesto ( $\Delta$ Sp*TthPAC*-sGFP), con el péptido señal de *TthPAC* supuesto solo (Sp*TthPAC*-sGFP) y con una  $\beta$ -glicosidasa (número de registro de NCBI YP\_006025) usada como marcador citoplásmico ( $\beta$ -glicosidasa-sGFP). Tal como se esperaba para una proteína soluble citoplásmica, la fusión  $\beta$ -glicosidasa-sGFP dio como resultado una distribución homogénea de la fluorescencia en las bacterias (Figura 2A). En fusiones  $\Delta$ Sp*TthPAC*-sGFP, la fluorescencia también se ubica en el citoplasma pero con una distribución definida en regiones centrales de las células (Figura 2B). Cuando se analizaron las fusiones *TthPAC*-sGFP o Sp*TthPAC*-sGFP, la intensidad de fluorescencia observada era inferior y se ubicaba en emplazamientos polares/subpolares en la envuelta de las bacterias, indicando una ubicación o bien en la membrana o bien periplásmica de la proteína quimérica (Figuras 2C y 2D).

Con el fin de determinar si *TthPAC* está transportándose al espacio periplásmico, se aprovechó el uso de un mutante *Tth* NAR1 en el gen *slpA* (proteína de capa S). Esta cepa forma cuerpos multicelulares redondos rodeados por una envuelta común que hace que la purificación de proteínas periplásmicas sea una tarea más fácil. Se usó DrpA (una proteína reguladora del sistema de respiración de nitrato) como marcador de proteínas periplásmicas. Sorprendentemente, se observó que, en contraposición a lo que

sucede en otras bacterias Gram negativas, PAC no está secretándose ni es soluble en absoluto sino que permanece anclada a la membrana de las células de *Tth* NAR1  $\Delta$ slpA (Figura 3). Obsérvese que DrpA está presente en la fracción soluble debido al método de extracción empleado, que no puede ocuparse de células individuales o cuerpos multicelulares no alterados.

- 5 Se ha descrito el uso del detergente suave Sarkosyl como un método para solubilizar selectivamente proteínas de la membrana interna de bacterias Gram negativas. PAC y el marcador de membrana interna Nqo1 se solubilizaron tras el tratamiento con detergente, mientras que SlpA, una proteína de la membrana externa, siguió siendo insoluble en las mismas condiciones (Figura 4). Estos datos indican que PAC está anclada a la membrana interna de células de *Tth*.
- 10 Se estudió si PAC está orientada hacia el citoplasma o el espacio periplásmico de células de *Tth* a través de ensayos de accesibilidad de tripsina. Se llevaron a cabo en el mutante *Tth* NAR1  $\Delta$ slp con el fin de evitar impedimentos para la entrada de tripsina. Adicionalmente, se usó EDTA para solubilizar parcialmente la membrana externa. A pesar del hecho de que la sub-unidad  $\beta$  de *Tth*PAC no se vio afectada, el peso molecular de la sub-unidad  $\alpha$  se redujo tras un tratamiento con tripsina de 1-2 minutos (Figura 5). La inmunodetección de Nqo1 en las mismas condiciones mostró menos accesibilidad a la degradación, lo que sugiere que PAC estaba orientada hacia el espacio periplásmico.

15 El alto contenido de aminoácidos hidrófobos en la secuencia N-terminal de *Tth*PAC sugiere que esta parte de la proteína por sí misma podría anclar la enzima a la membrana interna de las bacterias. Para evaluar esto, se construyó una proteína quimérica usando el péptido señal de PGA de *E. coli* y la proteína *Tth*PAC que carece de los primeros 32 aminoácidos del extremo N-terminal. Se expresó la proteína quimérica (Sp<sub>Eco</sub>-PAC<sub>Tth</sub>) en un mutante *Tth*  $\Delta$ pac principalmente como una proteína soluble y se procesó para dar las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Figura 6). Estos datos indican que la secuencia N-terminal de PAC es la responsable de este anclaje a la membrana.

20 En bacterias mesófilas, se han notificado PAC como proteínas o bien citosólicas o bien periplásmicas. Sin embargo, los datos presentados en el presente documento muestran que *Tth*PAC está unida a la cara externa de la membrana citoplasmática, ampliando así las posibles ubicaciones subcelulares de las PAC que van a estudiarse más adelante en el presente documento. Basándose en los experimentos de fusión con sGFP, se sugiere que *Tth*PAC está dirigiéndose a puntos de secreción puntuales de la membrana citosólica, probablemente a través del sistema de argininas gemelas (TAT), que se ha mostrado que forma focos cerca de los polos de las células en otras bacterias. Esto se debe a que sGFP se pliega en el citoplasma y el único sistema de secreción que permite el transporte de proteínas plegadas es el sistema TAT. Además, la presencia de dos argininas en el péptido señal N-terminal de la proteína *Tth*PAC respalda esta idea. En resumen, se sugiere que *Tth*PAC porta un péptido señal TAT no escindible que funciona como dominio de anclaje señal. Se ha descrito un caso similar para una proteína Rieske Fe-S, cuyo péptido señal TAT no se procesa sino que forma en última instancia una hélice transmembrana a través de la bicapa lipídica. Si la ubicación en la membrana de PAC es una característica que podría extenderse a otras bacterias termófilas es una cuestión que ha de dilucidarse.

### EJEMPLO 3

#### 40 Expresión homóloga de *Tthpac*

Debido a la complejidad de su procesamiento, en primer lugar se intentó sobreexpresar la proteína *Tth*PAC directamente en células de *Tth*. Para esto, se amplificó el gen *pac* mediante PCR, se ligó en el plásmido pWUR112/77-1 y se sobreexpresó en una cepa mutante *Tth* $\Delta$ pac. Tal como se muestra en la Figura 7, de la cantidad total pre-pro-PAC obtenida sólo se autoprocésó una fracción. Los intentos de purificar esta fracción de *Tth*PAC madura demostraron ser difíciles y dieron como resultado bajos rendimientos. Además, se encontraron PAC no procesada así como polipéptidos proteolíticos, lo que indica que el procesamiento autoproteolítico de la pro-proteína se veía comprometido cuando se realizaba una sobreexpresión, incluso en células de *Tth* (Figura 7). Debido a que la eficacia de la translocación de proteína a través del sistema TAT depende de la cantidad de transportador disponible, la sobreproducción de *Tth*PAC probablemente podría haber saturado la maquinaria de secreción, haciendo así que la fracción de pre-pro-PAC que permanecía en el citoplasma madurase incorrectamente.

### EJEMPLO 4

#### Expresión heteróloga de *Tthpac* en células de *E. coli*

55 Debido a los resultados mostrados anteriormente, se intentó sobreexpresar la *Tth*PAC en *E. coli* carente de los 37 primeros aminoácidos del extremo N-terminal. Puesto que el extremo N-terminal de *Tth*PAC

resultó estar anclado a la membrana, se llevaron a cabo dos enfoques con el fin de dirigir la sobreexpresión de *TthPAC* en células de *E. coli*. Se construyó una versión acortada en 5' del gen *pac* ( $\Delta$ Sp-*Tthpac*) y una fusión del primero con la secuencia líder del gen *pga* de *E. coli* (Sp<sub>Eco</sub>-*pac*<sub>Tth</sub>). La proteína quimérica Sp<sub>Eco</sub>-PAC<sub>Tth</sub> se translocaba eficazmente al espacio periplásmico de *E. coli*, pero la maduración de la proteína para dar las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  del tamaño correcto falló (Figura 8). Ya que la translocación a otro compartimento celular demuestra ser a menudo un cuello de botella dependiente de la eficacia y la cantidad de transportador disponible, se centraron los esfuerzos en la expresión de  $\Delta$ Sp-*TthPAC*, probablemente soluble en el citoplasma de *E. coli*. Debido a que es necesario un plegamiento apropiado para lograr una maduración satisfactoria de la pro-proteína, se estudió el efecto de la ayuda de chaperonas en el transcurso de la sobreexpresión de PAC. Se co-expresó una selección de chaperonas citoplasmáticas, incluyendo factor desencadenante (TF), GroEL/ES y DnaK/J-GrpE (TAKARA BIO INC.) con  $\Delta$ Sp-*TthPAC*. Se evaluó la producción y el procesamiento de Pro-PAC mediante inmunotransferencia de tipo Western, mientras que se determinó la funcionalidad de *TthPAC* midiendo su actividad enzimática. Tal como se muestra en la Figura 9A, se potenció la producción de pro-PAC por la presencia de DnaK/J y GrpE e incluso más por la combinación de TF y GroEL/ES. Además, en todas las condiciones, se procesó una fracción de pro-PAC para dar las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  que mostraron migraciones electroforéticas similares a las sub-unidades de PAC obtenidas a partir de células de *Tth*, lo que indica que las etapas del procesamiento post-traduccional para la maduración de *TthPAC* también pueden producirse en el citoplasma de *E. coli*. Sin embargo, cuando se analiza la actividad de *TthPAC* en las mismas condiciones, se observó que las actividades tanto específicas como volumétricas en el cultivo sin co-expresión de chaperonas eran similares a las observadas en cultivos con co-expresión de DnaK/J y GrpE o TF y GroEL/ES (Figura 9B). Estos resultados indican que la producción de *TthPAC* en células de *E. coli* puede aumentarse a través de la co-expresión de chaperona(s) adecuada(s), pero la fracción de proteína *TthPAC* que es activa enzimáticamente no puede suponerse a partir de la cantidad total de *TthPAC* que se produce.

El uso de chaperonas citoplasmáticas o periplásmicas en la ayuda al plegamiento de PAC sobreproducidas en huéspedes heterólogos se ha notificado ampliamente. Como para *TthPAC*, TF y GroEL/ES demostraron ser las mejores elecciones en la mejora de la producción de EcoPGA. Sin embargo, en desacuerdo con los resultados notificados por Xu *et al* (Appl Environ Microbiol 2005, 71(10):6247-6253), se encontró que la actividad de *TthPAC* en presencia de estas chaperonas se redujo en comparación con la ausencia de co-expresión de modulador del plegamiento. Se plantea la hipótesis de que *TthPAC* sigue estando unida a la chaperona tras su ayuda de plegamiento, de modo que se impide una catálisis de *TthPAC* apropiada. Se llevaron a cabo experimentos de desprendimiento de chaperonas basados en el uso de incubaciones con ATP/Mg<sup>+2</sup>, y se observó una liberación de *TthPAC* del complejo GroEL/ES (Figura 10).

## EJEMPLO 5

### Efecto de Ca<sup>+2</sup> sobre la producción y maduración de *TthPAC*

La estructura cristalina de EcoPGA (número de registro de Protein Data Bank 1PNK) y de PGA de *Providencia rettgeri* mutante para Bro1, así como análisis de espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inducido sobre AfaePGA, revelaron un ión calcio fuertemente unido en la estructura de estas tres proteínas. Una alineación de las secuencias de aminoácidos de estas PAC con la de *Tth* mostró que tres de los seis residuos de coordinación de calcio en las PGA mencionadas anteriormente se conservan en la secuencia de *TthPAC*. Se ha sugerido que los iones calcio estabilizan el estado nativo de PGA permitiendo que tenga lugar su maduración. De hecho, la producción de proteínas PGA maduras apropiadamente en células de *E. coli* ha mejorado en cultivos complementados con CaCl<sub>2</sub>. Por tanto, se sometió a prueba la influencia de iones Ca<sup>+2</sup> sobre la expresión y maduración de *TthPAC*. Se añadieron concentraciones de calcio crecientes hasta 50 mM a medios LB desde el comienzo del cultivo. Se analizaron la densidad celular, la expresión y actividad de *TthPAC*, y los resultados se resumen en la Figura 11. Mientras que el crecimiento celular se modificó ligeramente por la presencia de Ca<sup>+2</sup>, la actividad específica y volumétrica de *TthPAC* mejoró notablemente a Ca<sup>+2</sup> 10 mM. Por consiguiente, el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la expresión y maduración de *TthPAC* en células de *E. coli* mostró un aumento de las señales para las sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  conjuntamente con la concentración de Ca<sup>+2</sup> de 10 mM (Figura 11B). En referencia al procesamiento autoproteolítico de PAC, se observó que el tamaño de ambas sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta$  coincidía con las de PAC obtenidas a partir de células de *Tth*, lo que sugiere una maduración correcta de la pro-proteína. El calcio demostró ser un factor crítico cuando se produce *TthPAC* funcional, del mismo modo se notificó para la EcoPGA y AfaePGA. El rendimiento de *TthPAC* activa pudo aumentarse 13 veces cuando se complementaron los medios de cultivo con 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. A partir de los resultados presentados en el presente documento, podemos sugerir que el calcio probablemente forma parte de la estructura de *TthPAC* tal como ya se describe para algunas PGA mesófilas.

## EJEMPLO 6

**Purificación de *Tth*PAC recombinante y evaluación de su maduración**

Con el fin de confirmar la maduración de pro-PAC de *Tth* en *E. coli*, se purificó la proteína recombinante mediante cromatografía IMAC (Figura 10). La SDS-PAGE de la proteína purificada reveló dos sub-unidades de *Tth*PAC con masas moleculares relativas ( $M_r$ ) de  $26,4 \pm 1,0$  kDa (sub-unidad  $\alpha$ ) y  $54,3 \pm 1,0$  kDa (sub-unidad  $\beta$ ) (Figura 12). Se realizaron análisis de MALDI-TOF y CL-EM/EM sobre cada sub-unidad. Tal como se esperaba, el residuo N-terminal de la sub-unidad  $\beta$  correspondía a la Ser256 catalítica. El extremo C-terminal de la sub-unidad  $\beta$  era evidente a partir del codón de terminación, mientras que el extremo C-terminal de la sub-unidad  $\alpha$  depende de la longitud del péptido ligador escindido de la pro-*Tth*PAC. Puesto que se mapeó la sub-unidad  $\alpha$  hasta el residuo Arg246, entonces la maduración por autoprocésamiento debe haber eliminado un péptido espaciador de 9 aminoácidos. Éste es claramente un péptido ligador más corto en comparación con los espaciadores de 54 ó 37 aminoácidos de la *Eco*PGA y *Afae*PGA mesófilas, respectivamente. Sin embargo, puesto que los bucles son probablemente las primeras estructuras que se despliegan durante la desnaturalización térmica, no es sorprendente que una termozima potencie su estabilidad térmica a través del acortamiento de los bucles. En referencia a la sub-unidad  $\alpha$  de *Tth*PAC, se encontró algo de discrepancia entre su peso molecular cuando se produjo *Tth*PAC en células de *Tth* o de *E. coli*. Tal como se mostró en las Figuras 3 y 4, la sub-unidad  $\alpha$  de *Tth*PAC presentaba una  $M_r$  de aproximadamente 22 kDa mientras que la misma sub-unidad (con una cola de His de 20 aminoácidos que sustituía al péptido señal de 32 residuos) procesada en células de *E. coli* tenía aproximadamente 26 kDa (Figuras 9-12). Las proteasas de *Tth*, como la mayoría de proteasas de bacterias extremófilas, son serín proteasas que son estables a altas temperaturas incluso en presencia de altas concentraciones de detergentes y agentes desnaturalizantes. Durante la lisis celular, estas proteasas normalmente se activan, siendo responsables probablemente del reducido tamaño de la sub-unidad  $\alpha$  observado en células de *Tth*. Puesto que *Tth*PAC tiene una serina catalítica, no es posible usar inhibidores de serín proteasas durante nuestros protocolos de purificación de proteínas. Por tanto, el peso molecular real de la sub-unidad  $\alpha$  no puede deducirse a partir de la  $\alpha$ -PAC procesada en *E. coli* ni a partir de la madurada en células de *Tth*.

## EJEMPLO 7

**Caracterización enzimática de *Tth*PAC**

Se caracterizó bioquímicamente *Tth*PAC purificada a partir de células de *E. coli*. Para examinar su selectividad de sustrato, se sometieron a ensayo varias penicilinas, cefalosporinas y homoserina lactonas aromáticas y alifáticas para determinar la actividad de desacilación y los resultados se resumen en la Tabla 4.

35

Tabla 4

**Parámetros cinéticos de *Tth*PAC con distintos sustratos**

Substrato	R (cadena acilo)	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (seg <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> .seg <sup>-1</sup> )
Penicilina K	Octanoil	0,32±0,05	5,16±0,13	16,12
Penicilina dihidro F	Hexanoil	0,98±0,22	1,46±0,06	1,49
Penicilina F	Hexanoil	0,94±0,18	0,90±0,03	0,96
Penicilina V	Fenoxiacetilo	0,74±0,11	0,57±0,01	0,77
Penicilina G	Fenilacetilo	164	1,56	9.10 <sup>-3</sup>
Glutaril-7-ACA	Glutarilo	nd	nd	nd
Cefalosporina C	7-aminoadipilo	nd	nd	nd
C4-HSL	Butirilo	nd	nd	nd
C8-HSL	Octanoilo	nd	nd	nd

nd: actividad no detectada

*TthPAC* era activa sólo sobre penicilinas. La penicilina K (octanoil-penicilina) era el mejor sustrato, con el valor de constante de especificidad más alto ( $16,12 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$ ) en comparación con las otras penicilinas sometidas a prueba. Se sometió a ensayo la actividad de *TthPAC* a diferentes valores de pH. En contraposición a lo que se describe habitualmente para enzimas PAC, se observó un pH óptimo de 4,0 cuando el sustrato era PenK (Figura 13A) y de 8,0 cuando el sustrato era PenG (Figura 13B). Además, se sometió a ensayo la actividad enzimática de *TthPAC* en un intervalo de 57,5 a 82,5°C. Se logró la actividad hidrolítica más alta de *TthPAC* a 75°C (Figura 14). Claramente, a partir de los resultados presentados en el presente documento, *TthPAC* debería incluirse en esta subfamilia y por tanto renombrarse como *TthPKA*.

### EJEMPLO 8

#### Modelo estructural de *TthPAC*

Para construir modelos de la estructura tridimensional de *TthPAC*, se generaron alineamientos y predicciones de la estructura secundaria a partir de la secuencia proteica de *TthPAC* disponible en las bases de datos (genbank: TTC1972).

En dichos alineamientos, entre 73,2 y 80,3% de los aminoácidos de *TthPAC* alineaban con aminoácidos del molde, con una identidad de secuencia que varió entre 25,7 y 30,5% y una similitud entre 43,1% y 45,4% ('similar' siendo una puntuación BLOSUM62 > 0). A partir de los alineamientos múltiples y las estructuras cristalinas de código 1GK9 and 1GM7 se generó un modelo con una puntuación Z = -2,082. Debido al bajo porcentaje de identidad de la secuencia de la *TthPAC* con los moldes escogidos, se creó un modelo adicional mediante métodos de threading utilizando para ello el servidor Phyre. Dicho modelo se basó en la estructura de código 1CP9, que corresponde a la PGA de *Providencia rettgeri* PGA (PrePGA). Aunque no se pudo obtener un modelo para la secuencia completa de *TthPAC* debido a la presencia de discontinuidades en el alineamiento de las secuencias, el centro activo pudo ser modelado correctamente. Tras superponer ambos modelos con el molde 1GM9, se pudo estudiar los aminoácidos de *TthPAC* que corresponden a los aminoácidos descritos como responsables de la especificidad de sustrato en EcoPGA (Tabla 5).

**Tabla 5**

**Equivalencias de los aminoácidos del centro activo entre EcoPGA y *TthPAC* deducidas de la superposición de la estructura 1GM9 y los modelos de homología y de threading [entre paréntesis se indica la posición de los aminoácidos en la SEQ ID NO: 1]**

<u>EcoPGA</u>	<u>Modelo de homología</u>	<u>Modelo de <i>threading</i></u>
$\alpha$ Met142	$\alpha$ Ser185 (Ser 148)	$\alpha$ Ser185 (Ser 148)
$\alpha$ Arg145	$\alpha$ Leu188 (Leu 151)	
$\alpha$ Phe146	$\alpha$ Ser189 (Ser 152)	$\alpha$ Leu188 (Leu 151), $\alpha$ Ser189 (Ser 152)
$\beta$ Ser1	$\beta$ Ser1 (Ser 219)	$\beta$ Ser1(Ser 219)
$\beta$ Phe24	$\beta$ Leu24 (Leu 242)	$\beta$ Leu24 (Leu 242)
$\beta$ Phe57	$\beta$ Ile57 (Ile 275)	$\beta$ Ile57 (Ile 275)
$\beta$ Ala69	$\beta$ Asn69 (Asn 287)	
$\beta$ Asn241 <sup>a</sup>	$\beta$ Asn242 (Asn 460)	
$\beta$ Arg263	$\beta$ Arg263 (Arg 481)	

<sup>a</sup>\_ $\beta$ Ala241 en 1GM7)

Se ha descrito que los aminoácidos  $\alpha$ Phe146,  $\beta$ Phe24 y  $\beta$ Phe57 determinan la especificidad hacia la parte del acilo de PenG en la EcoPGA. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 5, en la *TthPAC*, estas posiciones están ocupadas por aminoácidos no aromáticos:  $\alpha$ Ser189,  $\beta$ Leu24 y  $\beta$ Ile57 respectivamente. En el modelo realizado mediante "threading", la posición  $\alpha$ Phe146 de la EcoPGA no se encuentra alineada unívocamente y podría corresponder a la  $\alpha$ Leu188 o a la  $\alpha$ Ser189. En consecuencia, para

- reproducir el bolsillo de sustrato de naturaleza aromática presente en la EcoPGA, los aminoácidos  $\alpha$ Leu188,  $\alpha$ Ser189,  $\beta$ Leu24 y  $\beta$ Ile57 deben ser sustituidos por fenilalanina. Asimismo, se ha descrito que tras la unión de PenG, la EcoPGA sufre un cambio conformacional que permite a la enzima acomodar el sustrato mediante un alejamiento de la cadena lateral de los aminoácidos  $\alpha$ Arg145 y  $\alpha$ Phe146. Durante dicho cambio conformacional, el átomo NH1 de la  $\alpha$ Arg145 se posiciona de tal manera que se crea un enlace de hidrógeno con el carboxilato de la  $\beta$ -lactama. En el modelo de homología de la *TthPAC*, la posición equivalente a  $\alpha$ Arg145 de la EcoPGA se encuentra ocupada por el aminoácido  $\alpha$ Leu188. Por lo tanto, para promover una unión más fuerte de la  $\beta$ -lactam a la *TthPAC* se hipotetizó la sustitución de  $\alpha$ Leu188 por arginina, incluso en combinación con la sustitución  $\alpha$ S189F descrita anteriormente.
- 10 Se investigó la relevancia del calcio en el modelo estructural de *TthPAC* debido a que la suplementación del medio de cultivo con calcio durante la sobreexpresión, mejoró la actividad catalítica de la *TthPAC*. Se observó que en el modelo de *TthPAC*, la cadena lateral de los aminoácidos  $\beta$ Asp73,  $\beta$ Asp76 and  $\alpha$ Glu195, y los grupos carbonilo de la cadena principal de los aminoácidos  $\beta$ Glu75 and  $\beta$ Gly206 son los responsables de la coordinación con el ión. Por comparación con la estructura tridimensional de EcoPGA los tres primeros residuos se hallan estrictamente conservados, mientras que los dos últimos son diferentes. Aunque la interacción con el calcio se conserva en el modelo de *TthPAC* con respecto a EcoPGA, no se halló el sexto residuo de coordinación con el ión equivalente a  $\beta$ Asp252 en EcoPGA.
- 20 Se analizaron los modelos estructurales de *TthPAC* buscando características que explicaran la elevada termoestabilidad de la enzima. Algunas de dichas características fueron puestas en evidencia por comparación del modelo con estructuras cristalinas de PGAs de microorganismos mesófilos, como 1GM7 y 1CP9. En primer lugar, la *TthPAC* posee una estructura mucho más compacta y se observó una reducción del 40% del volumen total de las cavidades internas (1038 Å<sup>3</sup> en el modelo de *TthPAC*, 1761 Å<sup>3</sup> en 1GM7 y 1803 Å<sup>3</sup> en 1CP9). Dichos volúmenes internos fueron calculados con el programa Yasara Structure (Yasara Biosciences) entendiéndose por cavidad interna el espacio vacío dentro de la proteína sin una conexión con el exterior. En segundo lugar, la cantidad de aminoácidos glutamato, arginina y lisina fue un 40% superior en toda la proteína pero particularmente en las  $\alpha$ -hélices, lo que implicaría la presencia de más puentes salinos que contribuirían a la termoestabilidad. Del mismo modo, el contenido de aminoácidos ramificados (valina, isoleucina y treonina) que son desestabilizantes de las  $\alpha$ -hélices fue un 67% menor. Por último, el contenido en prolina fue un 32-42% superior a las proteínas homólogas en microorganismos mesófilos, lo que hace presuponer una estructura más rígida

## EJEMPLO 9

### Mutagénesis dirigida y caracterización de las variantes generadas

Para mejorar la unión de PenG a la *TthPAC*, se intentó mejorar el bolsillo de unión, por comparación con el bolsillo aromático de EcoPGA. Se introdujeron las sustituciones aminoacídicas sugeridas por el modelo estructural de *TthPAC* en la enzima silvestre, dando lugar a las variantes M1 a M9 (Tabla 6).

Tabla 6

Sustituciones aminoacídicas en las distintas variantes de *TthPAC* generadas

Variante	Reemplazo	Localización de los reemplazos en SEQ ID NO: 1
M1	$\alpha$ L188F	L151F
M2	$\alpha$ S189F	L152F
M3	$\beta$ L24F	L242F
M4	$\beta$ I57F	I275F
M5	$\alpha$ L188R/S189F	L151R/ L152F
M6	$\beta$ L24F/I57F	L242F/I275F
M7	$\alpha$ L188F/ $\beta$ L24F/I57F	L151F/L242F/ I275F
M8	$\alpha$ S189F/ $\beta$ L24F/I57F	L152F/ L242F/ I275F
M9	$\alpha$ L188R/S189F/ $\beta$ L24F/I57F	L151R/ L152F/ L242F/ I275F

Las 9 variantes de *TthPGA* fueron expresadas recombinantemente y purificadas como se ha descrito en la sección de métodos. Se verificó la presencia de las bandas correspondientes a las sub-unidades  $\alpha$ - y  $\beta$  maduras mediante Western blot, con excepción del mutante cuádruple (M9), que solo mostró la banda

correspondiente al precursor sin procesar. Por esta razón, no se caracterizó cinéticamente dicho mutante. Para el resto de las variantes, se determinaron los parámetros cinéticos de la hidrólisis de PenG y Pen K (Tabla 7).

**Tabla 7**  
**Constantes cinéticas para la hidrólisis de penicilinas K y G de las variantes de *TthPAC* creadas mediante diseño racional**

Variante	Penicilina K			Penicilina G		
	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat} / K_m$ ( $mM^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat} / K_m$ ( $mM^{-1} \cdot s^{-1}$ )
WT	0,32	5,16	16,1	164	1,56	0,009
M1	0,10	0,43	4,3	15,5	0,54	0,034
M2	0,10	0,36	3,6	17,8	0,65	0,036
M3	0,12	0,32	2,4	13,4	0,85	0,063
M4	0,27	4,91	18,2	36,5	0,44	0,012
M5	nd	-	-	43,3	0,02	$5 \cdot 10^{-4}$
M6	0,05	0,75	15,0	37,6	0,30	0,008
M7	nd	-	-	55,1	0,05	$9 \cdot 10^{-4}$
M8	0,15	1,43	9,5	44,4	0,13	0,003

5 nd: actividad no detectada

La variante M3 causó la mayor variación sobre la unión de PenG, mejorando  $K_m$  12 veces, mientras que las variantes M1 y M2 mejoraron  $K_m$  10 y 9 veces, respectivamente. La eficiencia catalítica fue 6,6 veces superior en el caso de M3 y 3,7 veces en el caso de M1 y M2, con respecto a la enzima silvestre. La variante M4 redujo  $K_m$  4,5 veces manteniendo la eficiencia catalítica en valores similares a los de la enzima silvestre. No se observó ninguna mejoría en la variante M5. Del mismo modo, no se observaron efectos aditivos cuando se combinaron las distintas sustituciones simples, como es el caso de M6, M7 y M8. De hecho, el valor de  $K_m$  para PenG se redujo menos y se produjo un descenso importante en  $K_{cat}$  en comparación con los mutantes sencillos. La eficiencia catalítica hacia PenK de las variantes M3, M1 y M2 (los más activos frente a PenG) se redujo hasta 6,7 veces, sobre todo debido a la disminución de  $K_{cat}$  en torno a 10 veces.

## EJEMPLO 10

### Estudios de acoplamiento (docking)

Para comprender cómo interacciona la *TthPAC* con sus sustratos, se realizaron experimentos de acoplamiento utilizando el modelo de homología y todos los tipos de penicilina que se habían ensayado previamente. Se estableció una rejilla cúbica de 25 Å a partir de la posición del ligando PenG en la estructura 1GM7, tras su alineamiento con el modelo estructural de *TthPAC*. Se extrajeron las estructuras tridimensionales de las diferentes penicilinas del PDB o se modelizaron a partir de sus correspondientes SMILES utilizando el programa Corina. Como control se realizó el acoplamiento de PenG en 1GM7 y la mejor solución correspondió exactamente con la conformación cristalográfica obtenida experimentalmente. En cada experimento de acoplamiento se midieron la distancia entre el oxígeno atacante de la  $\beta$ Ser1 de *TthPAC* y el carbono electrófilo de cada una de las penicilinas utilizadas, así como la energía de unión para cada interacción (Tabla 8).

**Tabla 8**

### Parámetros derivados de los experimentos de acoplamiento de *TthPAC* con diferentes penicilinas

Ligando	Cadena acíclica	Energía de unión (kcal/mol)	Distancia* (Å)
<b>Penicilina V</b>	Fenoxiacetilo	8,39	2,9
<b>Penicilina G</b>	Fenilacetilo	7,81	2,3
<b>Penicilina F</b>	Hexenoilo	7,75	2,1
<b>Penicilina K</b>	Octanoilo	7,53	3,4

<b>Penicilina DHF</b>	Hexanoilo	6,48	2,4
-----------------------	-----------	------	-----

\*Entre el átomo de oxígeno de  $\beta$ Ser1 en *Tth*PAC y el carbono electrófilo de la penicilina correspondiente.

De las 4 soluciones que se obtuvieron y que contenían la cadena lateral de PenK (octanoilo) alojada en el bolsillo de sustrato, solo una se pudo considerar productiva en el sentido de que el ligando se encontraba además correctamente dispuesto para el ataque nucleófilo por parte de la  $\beta$ Ser1. Asimismo, el grupo carbonilo de la cadena lateral de PenK quedó correctamente orientada hacia el posible hueco oxianiónico. Como se muestra en la Figura 15, los átomos de N que forman el hueco oxianiónico son los de la cadena principal de  $\beta$ Asn69 y la cadena lateral de  $\beta$ Asn242, a una distancia de 2,1-3,0 Å. Con respecto a las otras penicilinas alifáticas, la penicilina F resultó correctamente alojada en el bolsillo en 6 soluciones productivas, mientras que en el caso de la penicilina dihidroF (DHF), solo dos soluciones resultaron productivas. Cuando se utilizó la PenG como ligando, solo 1 solución mostró la cadena lateral de fenilacetilo alojada en el bolsillo de unión de acilo. Además, dicha solución tenía el carbonilo de la cadena lateral correctamente orientado hacia el posible hueco oxianiónico y una distancia de 2,2 Å entre el oxígeno nucleófilo de  $\beta$ Ser1 y el carbono electrófilo de PenG. En el caso de la penicilina V, la cadena lateral también se alojó en el bolsillo de unión de acilos y la energía de unión calculada para esta interacción fue la más elevada de todos los experimentos de acoplamiento realizados (8,39 kcal/mol).

Por último, se introdujeron los reemplazos correspondientes a las variantes M1 a M8 en el modelo de homología de *Tth*PAC, se minimizaron las estructuras resultantes y se realizaron ensayos de acoplamiento con PenG. La energía de unión calculada para la interacción con los modelos M1, M2, M3 y M4 fue igual o superior a la observada para la interacción entre el modelo de la enzima silvestre y PenG (Tabla 8). En todos los casos se obtuvo una solución productiva en la que los residuos de fenilalanina introducidos interactuaban con el ligando. Sin embargo, a medida que se introdujeron más residuos de fenilalanina, como en el caso de las variantes M5 a M8, el bolsillo de unión de acilos quedó estéricamente bloqueado para aceptar el ligando en su interior y la energía de unión se redujo correspondientemente (Tabla 9).

**Tabla 9**

**Parámetros derivados del análisis de acoplamiento de penicilina G con los modelos de las distintas variantes de *Tth*PAC.**

Variante <i>Tth</i> PAC	Energía de unión (kcal/mol)	Residuos implicados	Distancia* (Å)
<b>WT</b>	7,81	Leu188, Ser189, Leu24, Ile57	2.27
<b>M1</b>	7,89	Phe188	2.3
<b>M2</b>	7,95	Phe189	2.4
<b>M3</b>	7,81	Phe24	2.9
<b>M4</b>	8,09	Phe57	2.3
<b>M5</b>	7,68	Arg188	3.3
<b>M6</b>	7,66	Phe24	>5
<b>M7</b>	7,76	Phe188, Phe24	>5
<b>M8</b>	7,12	Phe24	>5

\* Entre el átomo de oxígeno nucleofílico de  $\beta$ Ser1 en *Tth*PAC y el carbono electrófilo de la penicilina G.

En el caso de M5, la sustitución  $\alpha$ Arg188 introducida interactuó en todos los casos con PenG, pero de las cuatro soluciones que además mostraron una interacción de  $\alpha$ Phe189 con el ligando, en ninguna se encuentra la  $\beta$ Ser1 catalítica a una distancia adecuada para el ataque nucleófilo. Por último para los modelos de las variantes M6, M7 y M8 no se hallaron soluciones productivas ni soluciones que mostraran interacción entre  $\beta$ Phe57 y PenG.

De los dos pasos del mecanismo catalítico de penicilinas, la acilación es el paso limitante, controlando por lo tanto la velocidad global de la reacción. En la *Tth*PAC, todos los reemplazos efectuados excepto  $\beta$ I57F provocaron la disminución de  $K_{cat}$  para PenK. El aminoácido  $\beta$ Phe57 se encuentra en la parte inferior de la cavidad de unión al sustrato, mientras que  $\alpha$ Phe188,  $\alpha$ Phe189 and  $\beta$ Phe24 se encuentran próximos a la serina catalítica. La introducción de un residuo de fenilalanina en el centro del bolsillo catalítico que dificulte la hidrólisis tanto de PenG como de PenK sugiere que existe un impedimento estérico para acomodar los sustratos de modo que el ataque nucleófilo se ve comprometido y la velocidad del paso limitante y por lo tanto de la reacción disminuye. Se calculó el volumen del bolsillo catalítico en el modelo de *Tth*PAC y en la estructura cristalina de EcoPGA (1GM7) definiendo una celda alrededor de los residuos que forman el centro activo (Tabla 5) y llenándola con moléculas de agua. El volumen del centro

activo de *TthPAC* fue 2,5 veces menor que el calculado para *EcoPGA* ( $\text{Volumen}_{\text{agua}}/\text{Volumen}_{\text{celda\_TthPAC}}=0,010$ ;  $\text{Volumen}_{\text{agua}}/\text{Volumen}_{\text{celda\_EcoPGA}}=0,025$ ), lo que apoyaría nuestra hipótesis. Sin embargo, cuando se introdujo un residuo de fenilalanina en el fondo del bolsillo de unión al sustrato ( $\beta\text{Phe57}$ ), solo se vio afectada la hidrólisis de *PenG*. Esto puede ser debido a que el aminoácido  $\beta\text{Phe57}$  se encuentra más alejado del centro catalítico, permitiendo la unión de la larga cadena lateral de *PenK* y la interacción con los residuos alifáticos en el centro del bolsillo. Como en este caso, la unión de sustratos no se encuentra impedida, se puede concluir que el descenso en la fenilalanina introducida probablemente modifica la orientación de *PenG* en el bolsillo de modo que el ataque nucleófilo resulta desfavorecido.

En la presente invención, se ha modelizado y modificado el sitio de unión de acilos en *TthPAC* con el fin de mejorar la actividad hidrolítica hacia *PenG*. La selectividad de *TthPAC* es consecuencia de la naturaleza alifática de su bolsillo de unión y que puede ser modificada mediante la introducción de un único reemplazo. La sustitución  $\beta\text{L24F}$  convirtió el centro activo en un entorno más favorable para la hidrólisis de *PenG*. La notable termoestabilidad de la *TthPAC* y la mejora de 7 veces en la eficiencia catalítica con una mutación hace indicar que esta enzima tiene potencial como biocatalizador en la industria farmacéutica de producción de antibióticos.

#### **TRADUCCIÓN DEL TEXTO EN INGLÉS DE LA LISTA DE SECUENCIAS**

- "SEQUENCE LISTING": LISTA DE SECUENCIAS
- "Artificial sequence": Secuencia artificial

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido con actividad penicilina acilasa que comprende la SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo, con la condición de que dicho polipéptido no es el polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende al menos una mutación puntual en relación con la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 1, que consiste en la sustitución de un aminoácido presente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 por otro aminoácido, en donde dicho aminoácido presente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo formado por la leucina en posición 151 (Leu 151), la serina en posición 152 (Ser 152), la leucina en posición 242 (Leu 242) y/o la isoleucina en posición 275 (Ile 275).
3. Polipéptido según la reivindicación 2, en el que al menos uno de dichos aminoácidos Leu 151, Ser 152, Leu 242 y/o Ile 275 es sustituido por un aminoácido aromático.
4. Polipéptido según la reivindicación 3, en el que dicho aminoácido aromático es fenilalanina.
5. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho polipéptido es estable a una temperatura comprendida entre 57,5°C y 82,5°C.
6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que presenta una temperatura óptima de actividad penicilina acilasa a aproximadamente 75 °C.
7. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho polipéptido es estable a un pH comprendido comprendido entre 3 y 9.
8. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que presenta un pH óptimo de actividad penicilina acilasa en presencia de penicilina K a aproximadamente pH 4.
9. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que presenta un pH óptimo de actividad penicilina acilasa en presencia de penicilina G a aproximadamente pH 8.
10. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que hidroliza una penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del átomo de nitrógeno.
11. Polipéptido según la reivindicación 10, en donde dicha penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del átomo de nitrógeno se selecciona del grupo formado por penicilina K, penicilina F, penicilina dihidro F, penicilina V y penicilina G.
12. Una proteína de fusión que comprende:
  - i) un polipéptido A que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y
  - ii) un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B es un polipéptido diferente a dicho polipéptido A.
13. Proteína de fusión según la reivindicación 12, en la que dicho polipéptido B es un péptido señal de secreción extracelular o un polipéptido útil para aislar y/o purificar proteínas.
14. Proteína de fusión según la reivindicación 12 ó 13, en la que dicho polipéptido B se selecciona del grupo formado por una cola de histidinas, una cola de argininas, FLAG-tag, Strep-tag, x-myc-tag, SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a

quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag,  $\beta$ -galactosidasa y VSV-glicoproteína.

- 5 15. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.
16. Una construcción génica que comprende un polinucleótido según la reivindicación 15.
- 10 17. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 15 o una construcción génica según la reivindicación 16.
18. Vector según la reivindicación 17, en el que dicho vector es un vector de expresión.
- 15 19. Un organismo que comprende un polinucleótido según la reivindicación 15, una construcción génica según la reivindicación 16, o un vector según la reivindicación 16 ó 17.
20. Organismo según la reivindicación 19, en el que dicho organismo es un organismo mesófilo.
- 20 21. Organismo según la reivindicación 20, en el que dicho organismo mesófilo es una bacteria mesófila.
- 25 22. Un procedimiento para obtener un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende cultivar un organismo que comprende un polinucleótido según la reivindicación 15 bajo condiciones que permiten la producción de dicho polipéptido o dicha proteína de fusión, y, si se desea, recuperar dicho polipéptido o proteína de fusión.
23. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que dicho organismo es un organismo mesófilo.
- 30 24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que dicho organismo mesófilo es un organismo mesófilo procariota.
- 35 25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en el que dicho organismo es *Escherichia coli*.
26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25 que comprende producir dicho polipéptido o dicha proteína de fusión junto con una proteína del sistema de chaperonas.
- 40 27. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que dicha proteína del sistema de chaperonas es una proteína seleccionada del grupo formado por DnaK/J, GrpE, factor desencadenante y GroEL/ES.
- 45 28. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que dicha proteína del sistema de chaperonas es DnaK/J y/o GrpE.
29. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que las proteínas del sistema de chaperonas son GroEL/ES.

30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, en el que la producción del polipéptido o proteína de fusión comprende el cultivo de dicho organismo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 5 31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que el  $\text{Ca}^{2+}$  está presente a una concentración comprendida entre mayor que 0 y 50 mM.
32. Procedimiento según la reivindicación 31, en el que el  $\text{Ca}^{2+}$  está presente a una concentración de aproximadamente 10 mM.
- 10 33. Un método para obtener ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) que comprende poner en contacto una penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del átomo de nitrógeno con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o con una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 bajo condiciones que permitan la hidrólisis de dicha penicilina.
- 15 34. Método según la reivindicación 33, en el que dicha penicilina con un grupo carboxamida hidrofóbico unido a la posición 6 del anillo penam a través del átomo de nitrógeno se selecciona del grupo formado por penicilina K, penicilina F, penicilina dihidro F, penicilina V y penicilina G.
- 20 35. Un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 25 36. Anticuerpo según la reivindicación 35, que reconoce específicamente la sub-unidad alfa de dicho polipéptido, en donde dicha sub-unidad alfa se sitúa entre el aminoácido en posición 1 y el aminoácido en posición 218 en la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 1.
37. Anticuerpo según la reivindicación 35, que reconoce específicamente la sub-unidad beta de dicho polipéptido, en donde dicha sub-unidad beta se sitúa entre el aminoácido en posición 219 y el aminoácido en posición 739 en la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 1.

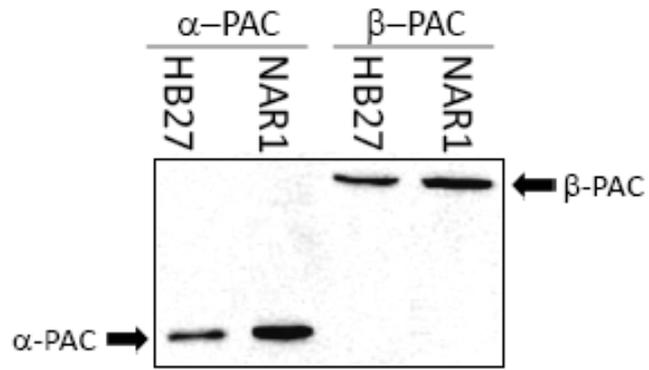


Fig. 1

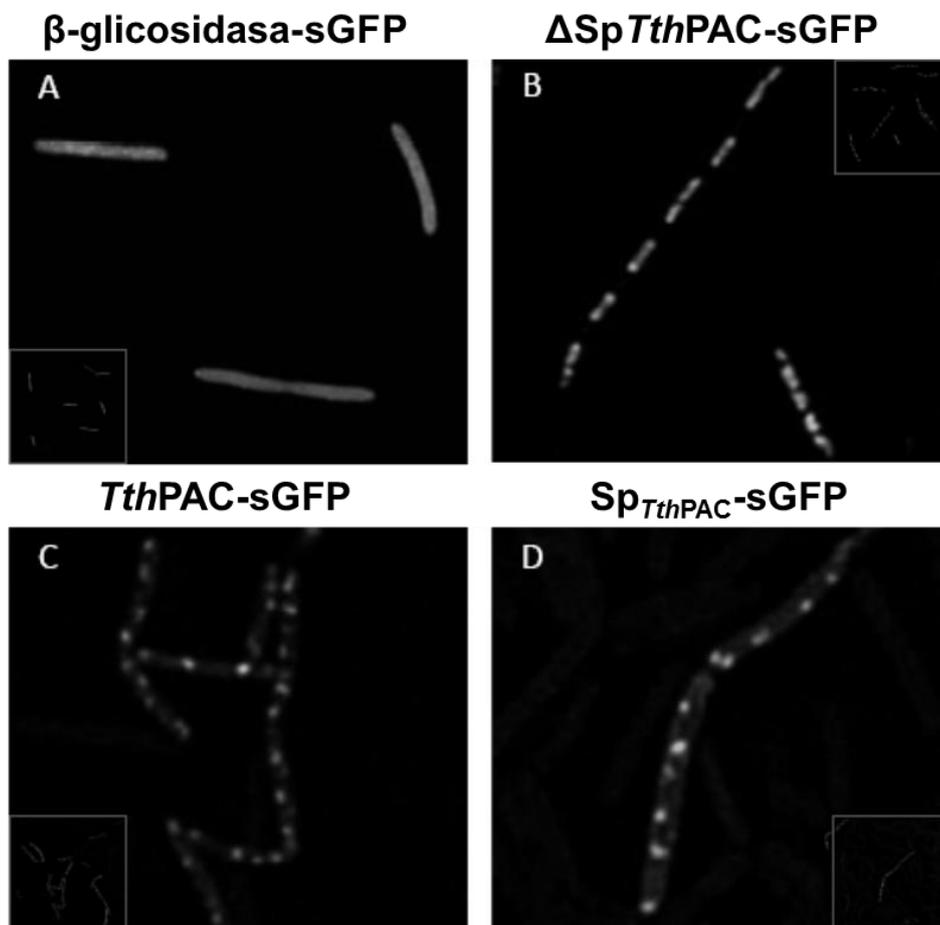


Fig. 2

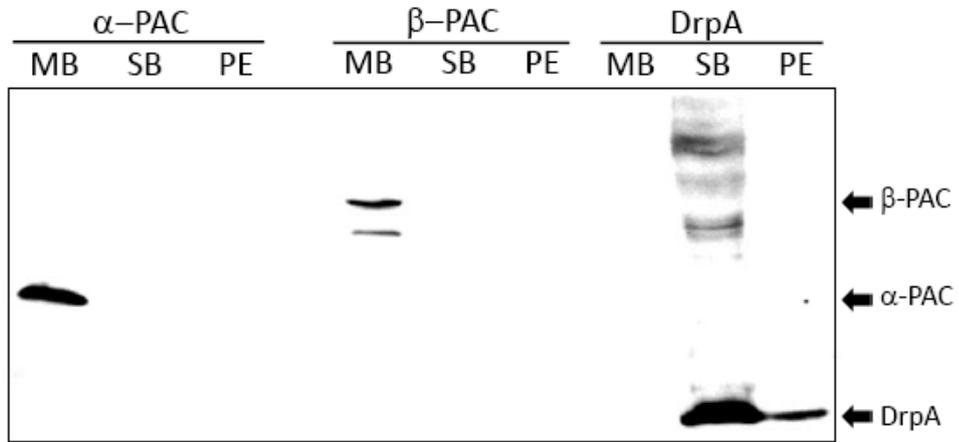


Fig. 3

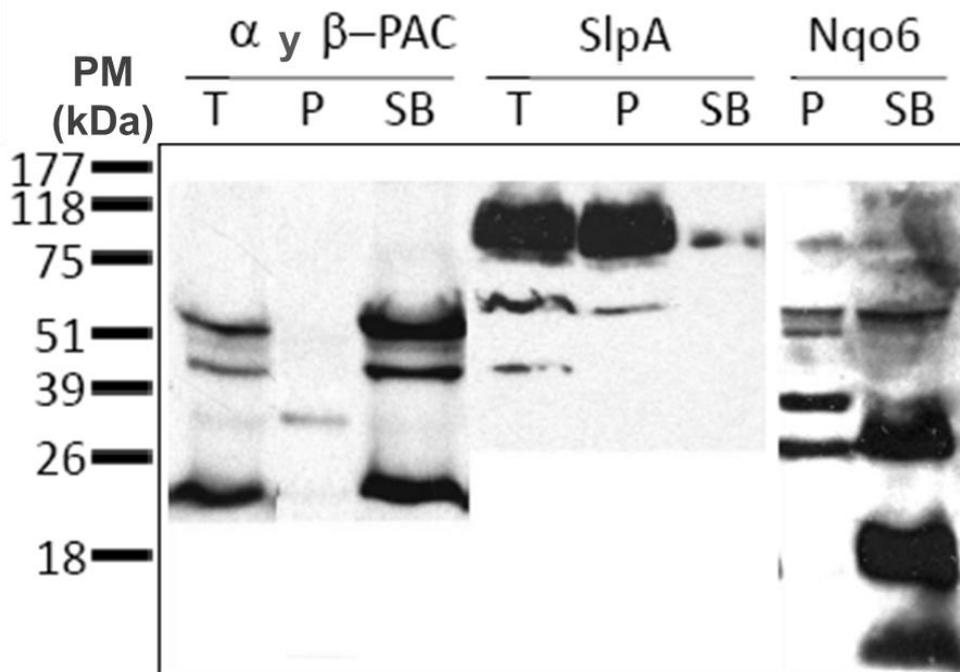


Fig. 4

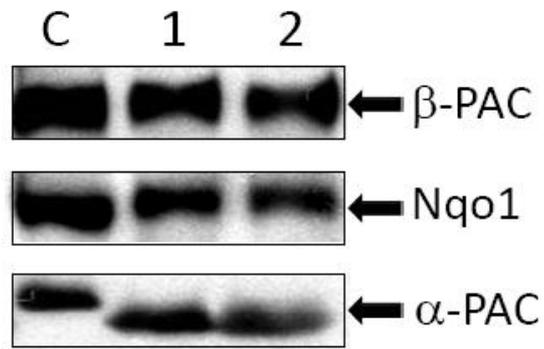


Fig. 5

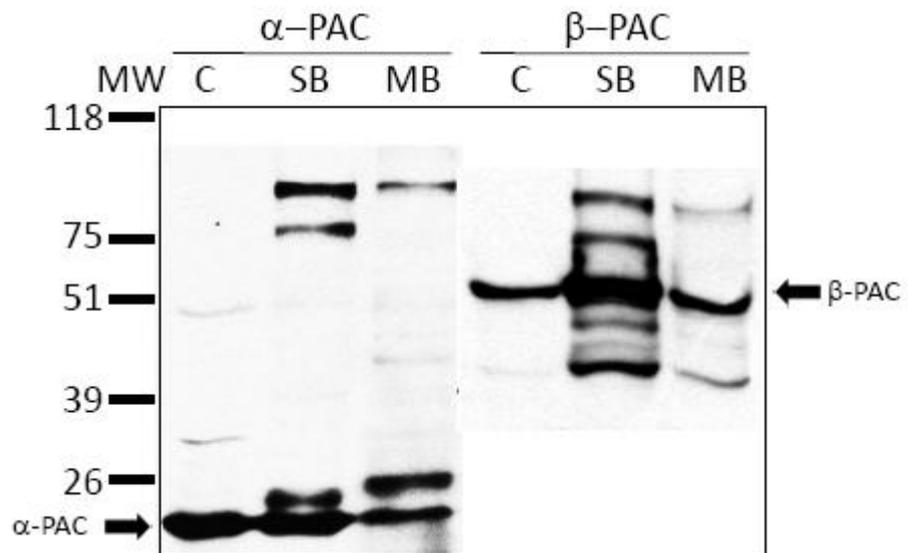


Fig. 6

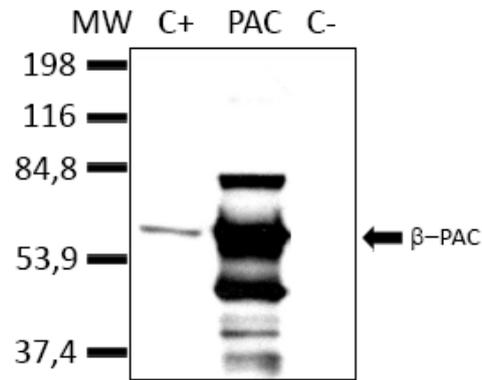


Fig. 7

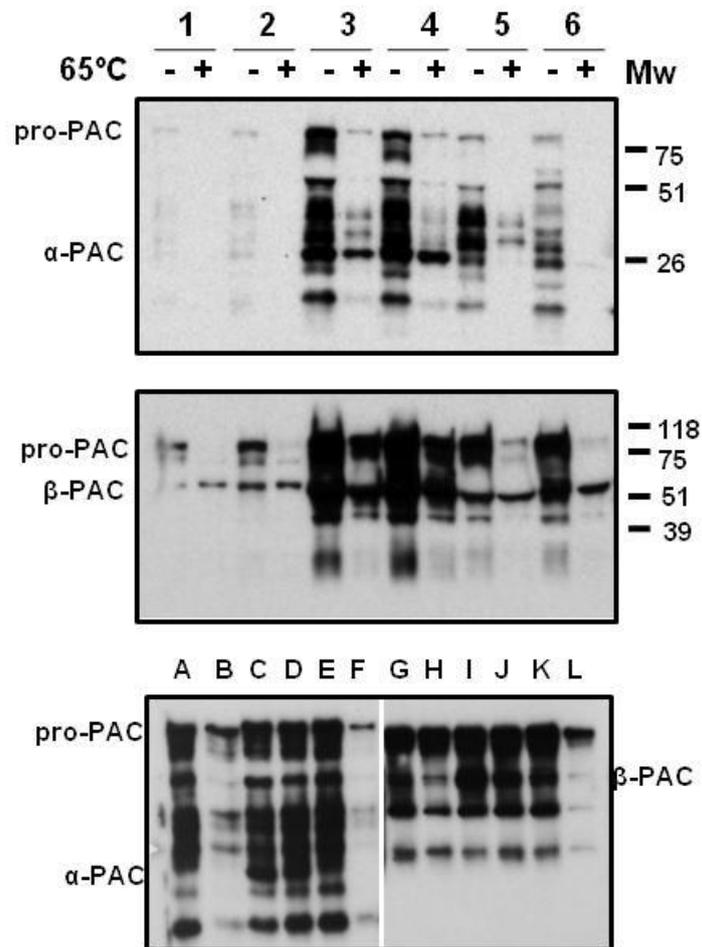


Fig. 8

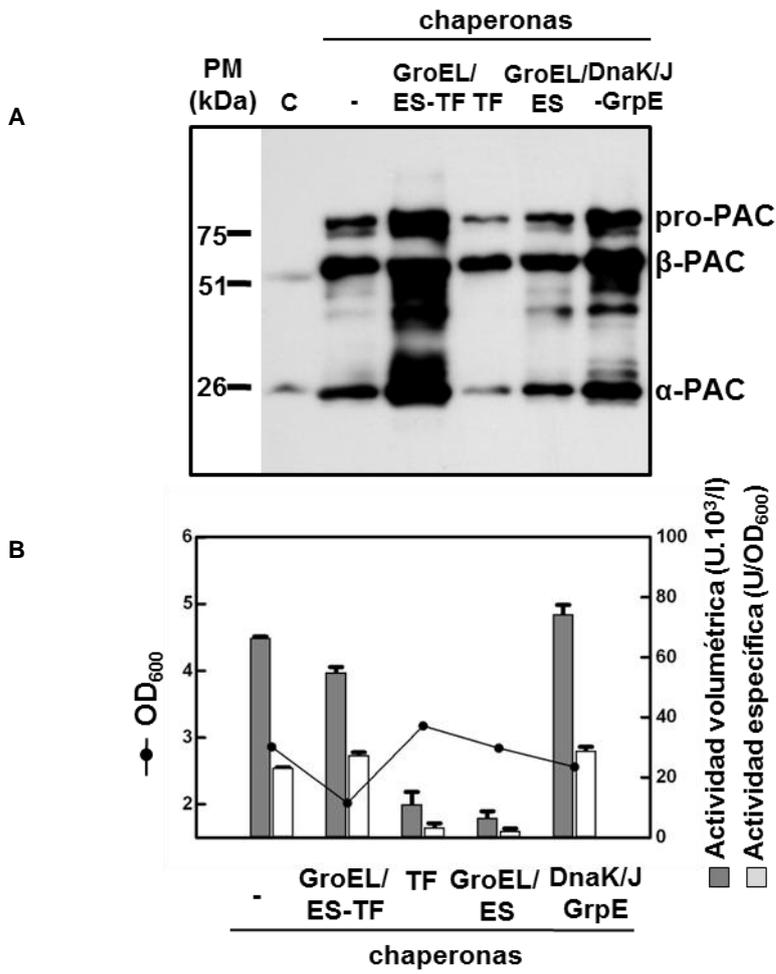


Fig. 9

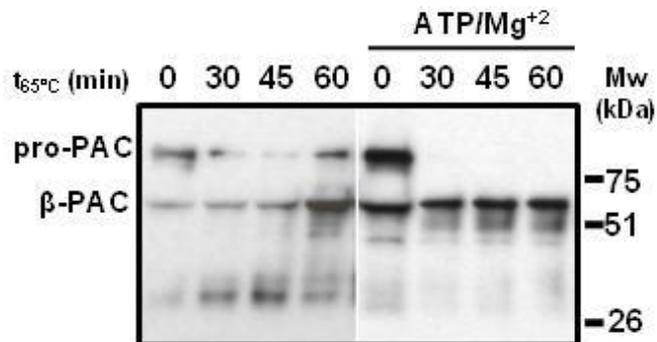


Fig. 10

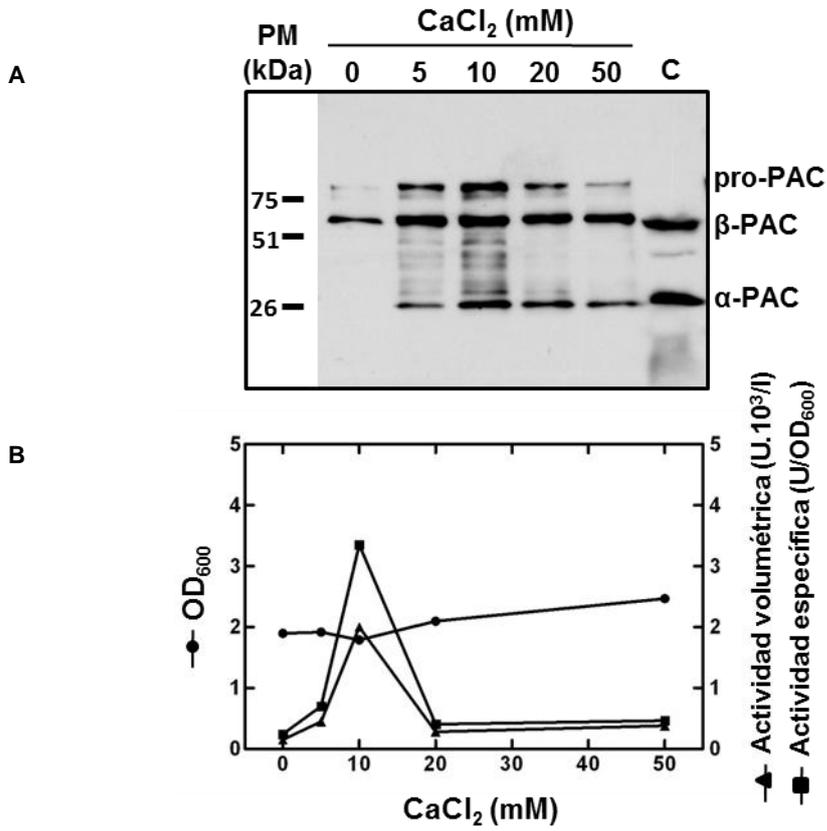


Fig. 11

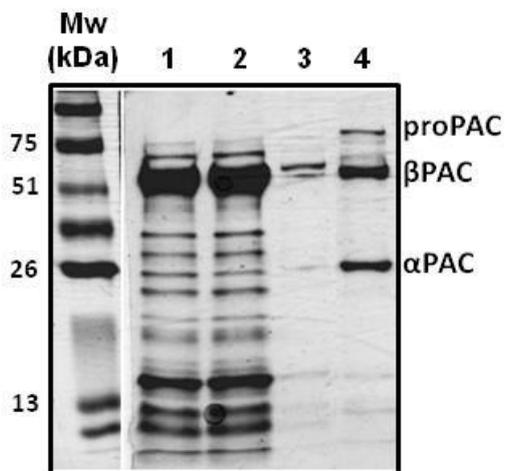
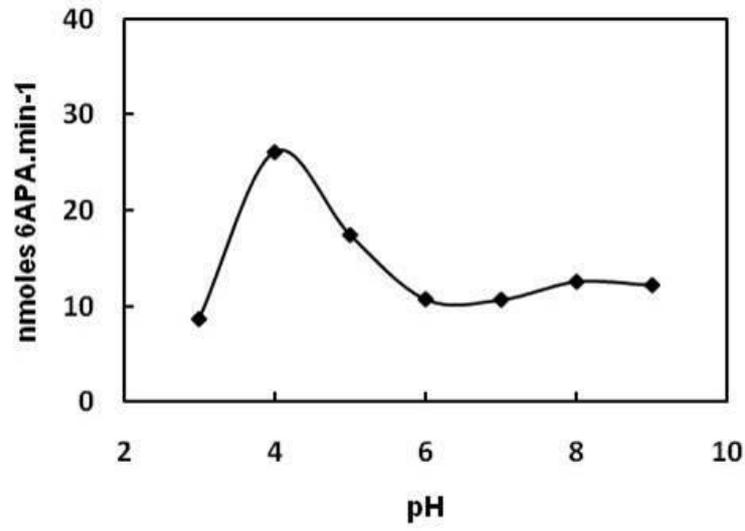


Fig. 12

A



B

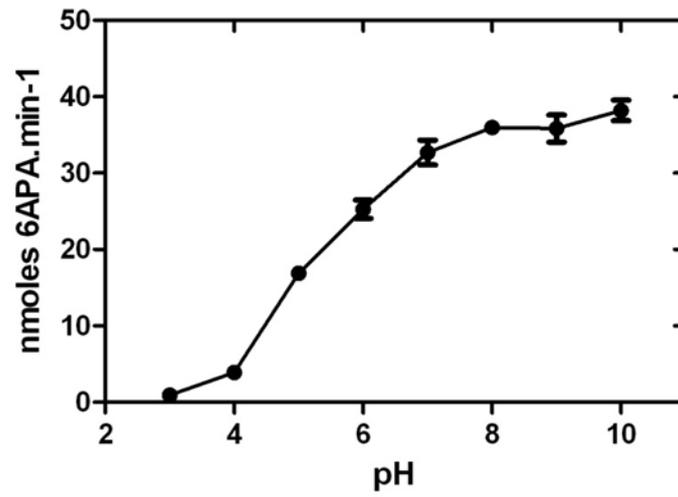


Fig. 13

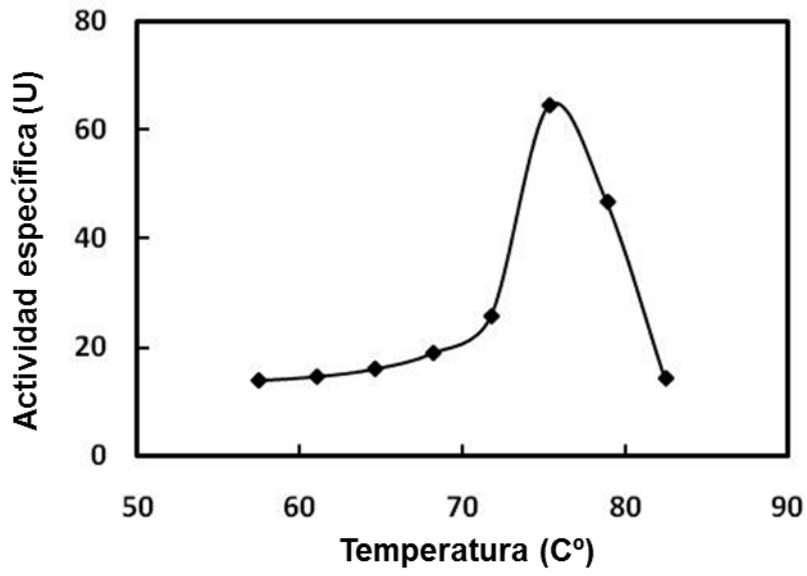


Fig. 14

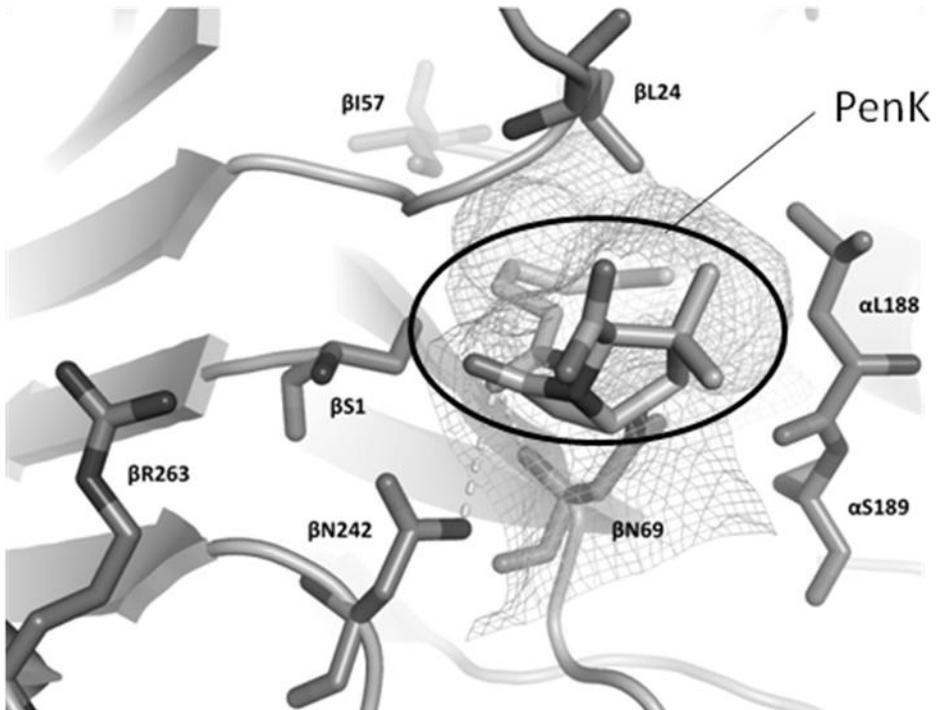


Fig. 15