

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 193**

21 Número de solicitud: 201231439

51 Int. Cl.:

C12N 9/18

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

17.09.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.03.2014

71 Solicitantes:

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

72 Inventor/es:

**HIDALGO HUERTAS, Aurelio;
BERENGUER CARLOS, José;
RIGOBERTO RIVERA, Noé y
SÁNCHEZ FREIRE, Esther**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

57 Resumen:

Polipéptido termoestable con actividad esterasa, variantes del mismo y sus aplicaciones.
Se describe un polipéptido termoestable con actividad esterasa basado en la esterasa I de *Pseudomonas fluorescens* (PFEI) y sus aplicaciones.

DESCRIPCIÓN

Polipéptido termoestable con actividad esterasa, variantes del mismo y sus aplicaciones

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las esterases son enzimas empleadas como biocatalizadores en procesos industriales por las ventajas que confieren sobre la química tradicional, entre las que se encuentran una elevada regio- y estereo-selectividad; además, permiten trabajar en condiciones de reacción más suaves, lo que implica una menor dependencia del empleo de disolventes o reactivos contaminantes y la reducción de los pasos necesarios para completar la transformación de un sustrato en productos de reacción. El interés de la industria biotecnológica en estas enzimas reside, además, en que no requieren cofactores para llevar a cabo su actividad catalítica.

Las esterases se clasifican en varias subclases según el enlace sobre el que actúan (éster peptídico, amida). Las éster hidrolasas (EC 3.1), comúnmente denominadas esterases, representan un grupo diverso de hidrolasas que catalizan la ruptura y formación de enlaces tipo éster. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en animales, plantas, insectos y microorganismos mesófilos y termófilos, y constituyen una familia de enzimas con un amplio rango de sustratos; de ahí que su potencial hidrolítico pueda extenderse a cualquier compuesto que contenga un enlace éster. De acuerdo con la naturaleza del enlace éster sobre el que actúan, las éster hidrolasas han sido subdivididas en: carboxil éster hidrolasas (EC 3.1.1), tioéster hidrolasas (EC 3.1.2), fosfomonoesterasas (EC 3.1.3) y fosfodiesterasas (EC 3.1.4). Las carboxil éster hidrolasas (EC 3.1.1), se dividen en dos subclases principales en base a la especificidad de sustrato: carboxil esterases (EC 3.1.1.1) o esterases verdaderas y las lipasas (EC 3.1.1.3). Las carboxil esterases por tanto, constituyen un grupo amplio de enzimas capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos mediante la hidrólisis de enlaces éster en presencia de agua obteniéndose un alcohol y un ácido carboxílico como productos de reacción. Dichas enzimas (y las lipasas) se clasifican además como α, β hidrolasas debido a que presentan un plegamiento constituido por 8 láminas β , rodeadas por hélices α .

A través de un mecanismo similar al mecanismo de acción de las serin- proteasas, las carboxil esterases pueden transferir grupos acilo a nucleófilos, como por ejemplo grupos carbonilo, o bien disociar hidrolíticamente enlaces éster. La mayor parte de las esterases, lipasas y serin-proteasas comparten la triada catalítica, un motivo de secuencia que consiste en los aminoácidos serina (S), histidina (H) y ácido aspártico (D), en donde el átomo de carbono de carbonilo es sometido a un ataque nucleofílico por el residuo de serina activo que conlleva la ruptura del enlace éster.

El uso de carboxil esterases en la industria biotecnológica y farmacéutica es frecuente para obtener compuestos (alcoholes generalmente) ópticamente activos, ácidos o ésteres de cadenas de carbono cortas. Por ejemplo, la esterasa aislada de *Bacillus subtilis* se utiliza para la obtención de (R, S)-naproxeno y de (R, S)-ibuprofeno metiléster con una elevada pureza óptica, o la esterasa de *Pseudomonas sp* se utiliza para la síntesis de ibuprofeno. Además, las carboxil esterases son utilizadas en la industria agrícola para la degradación de compuestos organofosforados, o en la industria alimentaria para la liberación del ácido ferúlico de la pared polisacáridica de las plantas.

Los procesos de transformación biológica en los que se emplean las esterases como biocatalizadores requieren generalmente el empleo de agentes desnaturizantes y temperaturas elevadas durante periodos de tiempo prolongados. Las enzimas procedentes de organismos termófilos (aquellos que crecen a temperaturas superiores a 45°C), o termozimas, presentan un elevado grado de estabilidad natural a altas temperaturas. Sin embargo, pese a que dicha estabilidad sea ventajosa, es frecuente que las enzimas aisladas de organismos termófilos presenten muy baja actividad a temperaturas bajas o moderadas (por ejemplo, a temperatura ambiente) lo cual limita enormemente su aplicabilidad industrial.

La enzima con actividad (carboxil) esterasa aislada de *Pseudomonas fluorescens*, PFEI tiene un gran potencial biocatalítico y es utilizada en la industria química en la degradación de ésteres de cadena corta, tales como el acetato de vinilo que es hidrolizado a ácido acético y acetaldehído. El empleo de dicha enzima en los procesos industriales biotecnológicos, químicos y farmacéuticos se ve, sin embargo, restringido debido a que dicha enzima presenta unas condiciones limitadas de estabilidad a temperaturas elevadas y en presencia de agentes desnaturizantes. Mediante la modificación de la secuencia amonoacídica de PFEI empleando la técnica de ingeniería de proteínas, Jochens et al (Jochens et al, 2010 *Protein Eng. Des. and Sel*, 23(12): 903-909) han conseguido una mejora en la estabilidad de PFEI en condiciones de temperaturas elevadas. Sin embargo, la aplicabilidad industrial de esta enzima con mayor termoestabilidad que la enzima silvestre sigue siendo limitada en aquellos procesos que requieren el empleo de temperaturas elevadas durante un periodo

prolongado de tiempo, así como el uso de agentes desnaturalizantes, tales como disolventes orgánicos, a los que dicha enzima es sensible.

Existe, por tanto, la necesidad de disponer de enzimas con actividad esterasa que sean estables a temperaturas elevadas durante periodos de tiempo prolongados y que conserven dicha actividad a temperaturas moderadas o bajas; ventajosamente, dichas enzimas deberían ser estables en presencia de agentes desestabilizantes, tales como disolventes orgánicos.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han generado unas variantes termoestables de la esterasa I de *P. fluorescens* (PFEI) mediante mutagénesis al azar y selección en *Thermus thermophilus* que posteriormente han clonado y expresados en *Escherichia coli* bajo el control de un promotor inducible. Algunas variantes de PFEI han sido caracterizados bioquímicamente como proteínas con actividad esterasa altamente estables a temperaturas elevadas, con una temperatura óptima de reacción de 65°C y una temperatura de desnaturalización superior a 90°C, tal como se muestra en el Ejemplo 3. Por tanto, tales proteínas pueden actuar como esterases termoestables.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido con actividad esterasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y, al menos, una mutación puntual que consiste en la sustitución de un aminoácido presente en dicha secuencia por otro aminoácido, en donde dicha mutación presente en dicha secuencia SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo formado por:

- (i) una mutación puntual en el aminoácido glutamina (Q) localizado en la posición 11 de SEQ ID NO: 1, en donde dicha glutamina es substituida por el aminoácido Leucina (L) [Q11L],
- (ii) una mutación puntual en el aminoácido alanina (A) localizado en la posición 191 de SEQ ID NO: 1, en donde dicha alanina es substituida por el aminoácido serina (S) [A191S], y
- (iii) una mutación puntual en el aminoácido ácido aspártico (D) localizado en la posición 212 de SEQ ID NO: 1, en donde dicho ácido aspártico es substituido por el aminoácido tirosina (Y) [D212Y],
- (iv) y cualquier combinación de las mismas;

o una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión que comprende:

- i) un polipéptido A que comprende un polipéptido proporcionado por la presente 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 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 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 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 otro aspecto, la invención se relaciona con un método para hidrolizar enzimáticamente un éster carboxílico presente en un compuesto que comprende poner en contacto dicho compuesto que contiene un éster carboxílico con un polipéptido proporcionado por esta invención, o con una proteína de fusión proporcionada por esta invención, bajo condiciones adecuadas para la hidrólisis de dicho éster carboxílico. En una realización particular, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo en un entorno oxidante proporcionado por la adición al medio de peróxido de hidrógeno, o bien de una fuente de peróxido que genera *in situ* el peróxido de hidrógeno necesario para llevar a cabo la reacción.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para hidrolizar enzimáticamente una lactona que comprende poner en contacto dicha lactona con un polipéptido proporcionado por esta invención, o con una proteína de fusión proporcionada por esta invención, bajo condiciones adecuadas para la hidrólisis de dicha lactona.

- 5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para hidrolizar enzimáticamente una lactama que comprende poner en contacto dicha lactama con un polipéptido proporcionado por esta invención, o con una proteína de fusión proporcionada por esta invención, bajo condiciones adecuadas para la hidrólisis de dicha lactama.

- 10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener enzimáticamente un halogenuro orgánico que comprende poner en contacto un compuesto orgánico con un polipéptido proporcionado por esta invención, o con una proteína de fusión proporcionada por esta invención, en presencia de un haluro y de peróxido de hidrógeno, o una fuente de peróxido, en un medio que comprende protones, bajo condiciones adecuadas para la obtención de dicho halogenuro orgánico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 15 Figura 1: (A) Resultados del ensayo de actividad esterasa en placa en *E. coli*; en la parte superior se muestran los controles, a la derecha el control positivo (pNCK-PFEI), y a la izquierda el control negativo (pNCK). (B) Ensayo de actividad esterasa en *E. coli* buscando variantes termorresistentes y activas.

Figura 2: Ensayo de clones termoestables con actividad esterasa en condiciones permisivas a 65°C.

Figura 3: Ensayo de clones termoestables con actividad esterasa en condiciones restrictivas de selección.

- 20 Figura 4: Desnaturalización térmica seguida mediante difracción circular en presencia de cloruro de guanidinio (A) y primera derivada de dichas curvas de desnaturalización (B).

Figura 5: (A) Actividad esterasa residual a 65°C de variantes de PFEI seleccionadas en *T. thermophilus* HB27; (B) actividad esterasa residual a 65°C de mutaciones individuales de las variantes de PFEI seleccionadas en *T. thermophilus*.

- 25 Figura 6: Actividad esterasa residual para valorar el efecto de las mutaciones termoestabilizantes sobre variantes con actividad mejorada hacia la hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenol de cadena media.

Figura 7: (A) Actividad esterasa residual de variantes de PFEI a 42°C y al 40% de DMSO; (B) Actividad esterasa residual de variantes de PFEI a 42°C y al 40% de DMF; (C) Actividad esterasa residual de variantes de PFEI a 42°C y al 15% de THF.

- 30 Figura 8: Modelos estructurales de PFEI silvestre (A) y la variante termoestable PFEI-34 (B).

Figura 9: Modelos de superficie de PFEI silvestre (A) y la variante termoestable PFEI-34 (B). El círculo indica la región en donde aparece una nueva zona hidrofóbica en la variante PFEI-34.

Figura 10: Interacciones del residuo alanina 191 (A191) en PFEI silvestre (A) y en la variante termoestable PFEI-34 (B) en donde establece un nuevo enlace con el residuo arginina 56 (R 56).

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Polipéptido de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido con actividad esterasa, en adelante “polipéptido de la invención”, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y, al menos, una mutación puntual que consiste en la sustitución de un aminoácido presente en dicha secuencia por otro aminoácido, en donde dicha mutación presente en dicha secuencia SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo formado por:

- 45 (i) una mutación puntual en el aminoácido glutamina (Q) localizado en la posición 11 de SEQ ID NO: 1, en donde dicha glutamina es substituida por el aminoácido Leucina (L) [Q11L],
 (ii) una mutación puntual en el aminoácido alanina (A) localizado en la posición 191 de SEQ ID NO: 1, en donde dicha alanina es substituida por el aminoácido serina (S) [A191S], y
 45 (iii) una mutación puntual en el aminoácido ácido aspártico (D) localizado en la posición 212 de SEQ ID NO: 1, en donde dicho ácido aspártico es substituido por el aminoácido tirosina (Y) [D212Y],

(iv) y cualquier combinación de las mismas;

o una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido.

Tal como aquí se utiliza, el término “actividad esterasa”, aplicado a un polipéptido, se refiere a que dicho polipéptido es capaz de hidrolizar un enlace de tipo éster para dar lugar a un alcohol y a un ácido carboxílico como productos de reacción; es decir, dicho polipéptido tiene la actividad enzimática propia de una esterasa.

El término “esterasa”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de un grupo éster y la generación de un ácido orgánico y un alcohol; en particular, dicha esterasa es una carboxil éster hidrolasa (EC 3.1.1), tal como una carboxil esterasa (EC 3.1.1.1) o una lipasa (EC 3.1.1.3). Las carboxil éster hidrolasas constituyen un amplio grupo de enzimas capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos mediante la hidrólisis de un grupo éster en presencia de agua generándose un ácido carboxílico y un alcohol como productos de reacción. Prácticamente cualquier compuesto que tiene un grupo éster cuya hidrólisis enzimática rinde un ácido carboxílico y un alcohol puede ser sustrato de una carboxil éster hidrolasa. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichos sustratos incluyen ésteres de ácidos 2-aril-propiónicos, acilglicerol, etc., tal como se mencionará más adelante.

La actividad esterasa del polipéptido de la invención puede determinarse mediante diversos ensayos enzimáticos conocidos en el estado de la técnica. En general, todos los ensayos enzimáticos adecuados para tal fin miden el sustrato consumido o el producto generado en la reacción durante un periodo de tiempo determinado. En un caso particular, la actividad enzimática puede determinarse midiendo la velocidad inicial de reacción, método mediante el cual las mediciones se realizan en un periodo muy corto de tiempo y en concentraciones saturantes de sustrato, por lo que la concentración de sustrato libre se considera igual al sustrato inicial y la velocidad medida es la máxima alcanzada en las condiciones de reacción dadas. En otro caso particular, la actividad enzimática puede determinarse mediante la medida del progreso de la curva durante la reacción, en donde se determina la concentración del sustrato consumido o del producto obtenido como una función del tiempo. En otro caso particular, la actividad enzimática puede determinarse mediante la medida de la concentración de sustrato o de producto en la rápida fase inicial transitoria de la reacción enzimática en la que el complejo molecular intermedio llega a un periodo cinético constante. En otra realización particular, la actividad enzimática puede determinarse en la fase de equilibrio de la reacción, que consiste en la alteración del equilibrio de la reacción enzimática modificando las condiciones de reacción tales como temperatura, pH, presión, etc. y el estudio de cómo regresa de nuevo a las condiciones de equilibrio la mezcla de enzima, sustrato y producto.

La actividad esterasa de un polipéptido puede ser determinada por cualquier método convencional adecuado conocido por los expertos en la materia. Dicho método puede basarse en la determinación de la cantidad de sustrato consumido o de producto generado en la reacción durante un periodo de tiempo determinado. Para ello, se utilizará el sustrato adecuado para la actividad esterasa a ensayar. En la parte experimental que acompaña a esta descripción, se describen distintos ensayos adecuados para determinar la actividad esterasa de un polipéptido, tanto en medio líquido como sólido (véase la parte relativa a los Materiales y Métodos).

En una realización particular, la actividad esterasa de un polipéptido se determina mediante la hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenol. Dicho método es conocido en el estado de la técnica para determinar la actividad enzimática de las carboxil esterases o lipasas (Bier, M., *Lipase Methods Enzymol.*, 1, 627-642, 1995). A modo ilustrativo, la actividad esterasa del polipéptido de la invención puede determinarse midiendo la liberación de *p*-nitrofenol como consecuencia de la hidrólisis de *p*-nitrofenil acetato, o de *p*-nitrofenil butanoato, o de *p*-nitrofenil octanoato. Brevemente, este método se basa en la hidrólisis de análogos de ésteres de ácidos grasos (tales como los ésteres de *p*-nitrofenol) como sustratos de carboxil esterases y lipasas. Como consecuencia de la hidrólisis de dichos ésteres se produce la liberación del *p*-nitrofenol que, a pH ligeramente alcalino, está ionizado y presenta un color ligeramente amarillo que puede ser cuantificado fotométricamente a 410 nm. Alternativamente, la actividad esterasa de un polipéptido se puede determinar mediante zimografía, una técnica electroforética que permite observar la actividad enzimática. Brevemente, la electroforesis de las proteínas deseadas puede realizarse en condiciones adecuadas para evitar la pérdida de dicha actividad. Una vez realizada la electroforesis en presencia del sustrato de la enzima, como puede ser, por ejemplo, α -naftilacetato, la actividad se determina mediante la incubación del gel en una solución de revelado que contiene un compuesto colorante (Fast Red) que al conjugarse con el producto de reacción tiñe aquellas bandas del gel que presentan actividad esterasa.

La actividad esterasa también puede ser determinada en un organismo que exprese el polipéptido de la invención mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia; a modo ilustrativo, no limitativo, dicha actividad esterasa puede determinarse mediante un ensayo en placas con medio sólido en donde se mide la actividad enzimática de las colonias que expresen el polipéptido de la invención. En una realización particular, dicho medio de crecimiento sólido se recubre con una mezcla que contiene agar al 0,5%, el colorante Fast Red y α -naftilacetato que, al ser hidrolizado por las colonias que presenten actividad esterasa, formará un halo de color rojo rodeando a dichas colonias. Las condiciones de crecimiento pueden restringirse

tanto como se considere adecuado, por ejemplo variando las concentraciones de antibiótico, la temperatura o la concentración del medio de cultivo.

La SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de la proteína PFEI (número de acceso de la base de datos Swiss-Prot P22862, julio de 2012). Salvo indicación en contrario, 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.

El término “mutación puntual” tal como aquí se utiliza, se refiere a sustituciones que se producen en polipéptidos (o polinucleótidos que expresan dichos polipéptidos) 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 nativa (wt) que codifica un determinado polipéptido es alterada mediante hibridación con 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. 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. Alternativamente, las mutaciones puntuales pueden ser generadas por ejemplo, mediante el empleo de la técnica conocida como PCR propensa al error. Dicha técnica, brevemente, se basa en la amplificación de la secuencia de ADN (que codifica el polipéptido que se desea mutar) empleando una enzima polimerasa que introduce errores, de forma aleatoria, durante la síntesis de la secuencia complementaria de la hebra molde, bajo determinadas condiciones de reacción. Estas condiciones pueden comprender el empleo de una mezcla no equimolar de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), diferentes concentraciones de $MnCl_2$, aumento de las unidades de la enzima polimerasa en la reacción o aumento del número de ciclos de amplificación.

En una realización particular, el 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 que consiste en la sustitución de un aminoácido presente en dicha secuencia por otro aminoácido, en donde dicha mutación presente en dicha secuencia SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo formado por:

- (i) la mutación Q11L,
- (ii) la mutación A191S,
- (iii) la mutación D212Y,
- (iv) y cualquier combinación de las mismas.

En una realización concreta, el polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una única mutación puntual seleccionada entre dichas mutaciones (i)-(iii) arriba indicadas. Así, en una realización concreta, el polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y la mutación puntual Q11L; en otra realización concreta, el polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y la mutación puntual A191S; y, en otra realización concreta, el polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y la mutación puntual D212Y [este polipéptido es identificado en ocasiones, en esta descripción, como PFEI-46, y su secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 18].

En otra realización concreta, el polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y dos de las tres mutaciones (i)-(iii) arriba indicadas. Así, en una realización concreta, el polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y las mutaciones puntuales Q11L y A191S [este polipéptido es identificado en ocasiones, en esta descripción, como PFEI-34, y su secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 19]; en otra realización concreta, el polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y las mutaciones puntuales Q11L y D212Y; y en otra realización concreta, el polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y las mutaciones puntuales A191S y D212Y.

En otra realización concreta, el polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y las tres mutaciones (i)-(iii) arriba indicadas; es decir, según esta realización particular, el polipéptido de la invención es un polipéptido que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y las mutaciones puntuales Q11L, A191S y D212Y.

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 la invención de mantener su actividad esterasa bajo condiciones determinadas, por ejemplo, temperatura, agentes caotrópicos, o disolventes orgánicos, entre otras.

- 5 La estabilidad de un polipéptido puede ser determinada empleando diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Algunas de dichas técnicas se basan en determinar la constante de plegamiento del polipéptido o en determinar la conservación (o pérdida) de la actividad enzimática bajo determinadas condiciones. A modo ilustrativo, no limitativo, la estabilidad de un polipéptido puede determinarse mediante calorimetría (normalmente, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)), técnica que mide la cantidad de calor que absorbe un polipéptido cuando es calentado de modo que, al aumentar la temperatura, se produce una transición entre el estado nativo y el estado desnaturalizado que lleva asociada la absorción de una gran cantidad de calor. Alternativamente, se puede determinar la estabilidad de un polipéptido mediante fluorimetría diferencial de barrido (DSF), método indirecto de medida de desnaturalización de polipéptidos que se basa en la emisión diferencial de fluorescencia por fluoróforos únicamente cuando se hallan en entornos hidrofóbicos. Alternativamente, si se desea, la estabilidad de un polipéptido puede ser determinada empleando la técnica de dicroísmo circular, técnica basada en la medida de la diferencia entre las absorbancias de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha.

- El polipéptido de la invención es un polipéptido termoestable, es decir, es estable a temperatura elevada, lo que le permite ejercer su actividad esterasa en un amplio intervalo de temperaturas. Tal como aquí se utiliza, la expresión “temperatura elevada” incluye una temperatura igual o superior a 60°C, típicamente, una temperatura comprendida entre 60°C y 95°C. Por tanto, en una realización particular, el polipéptido de la invención es estable a una temperatura comprendida entre 60°C y 95°C.

- La termoestabilidad de un polipéptido puede ser determinada por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, determinando la temperatura de desnaturalización de dicho polipéptido bajo determinadas condiciones, o, alternativamente, determinando el tiempo que tarda en degradarse a una temperatura determinada y bajo unas condiciones determinadas.

- En una realización particular, la termoestabilidad de un polipéptido se define en base a su temperatura de fusión o de desnaturalización (T_m , del inglés “melting temperature”). El término “temperatura de fusión” o “temperatura de desnaturalización” o “ T_m ”, tal como aquí se utiliza, se refiere a la temperatura a la que el 50% de las moléculas de polipéptido en disolución están desnaturalizadas. En este caso, la T_m puede ser determinada, si se desea, realizando una curva de desnaturalización del polipéptido en función del intervalo de temperatura que se considere apropiado, por ejemplo, entre 10°C y 100°C. La estabilidad del polipéptido a una temperatura determinada puede ser evaluada empleando cualquiera de las técnicas comentadas anteriormente. A modo ilustrativo, la estabilidad de un polipéptido a una determinada temperatura puede determinarse mediante dicroísmo circular y la T_m puede calcularse fácilmente realizando la primera derivada de la curva de desnaturalización obtenida, lo que da una idea de la termoestabilidad de dicho polipéptido. En una realización particular, el polipéptido de la invención presenta una T_m (en ausencia de agente caotrópico) superior a 71°C (T_m de la PFEI silvestre), tal como se muestra en el Ejemplo 3 (Tabla 7). En otra realización particular, el polipéptido de la invención presenta una T_m (en ausencia de agente caotrópico) igual o superior a 75°C, preferentemente, igual o superior a 80°C, más preferentemente, igual o superior a 85°C, aún más preferentemente, igual o superior a 90°C, todavía más preferentemente, igual o superior a 95°C.

- Debido a los elevados valores de T_m alcanzados con algunos de los polipéptidos de la invención, se puede determinar la T_m de dichos polipéptidos en presencia de un agente caotrópico. Tal como aquí se utiliza, un “agente caotrópico”, es una sustancia que desorganiza la estructura tridimensional de una macromolécula, por ejemplo, un polipéptido, y la desestabiliza actuando sobre las interacciones intramoleculares no covalentes, que tendrían un papel estabilizador en la molécula como los puentes de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals y las interacciones hidrofóbicas. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de agentes caotrópicos incluyen urea, cloruro de guanidinio, etc. En una realización particular, se determina la termoestabilidad de un polipéptido determinando la T_m de dicho polipéptido, en presencia de un agente caotrópico, tal como cloruro de guanidinio 62,5 mM, según el protocolo descrito en el apartado relativo a los Materiales y Métodos contenido en la parte experimental que acompaña a esta descripción. En una realización particular, el polipéptido de la invención presenta una T_m , en presencia de cloruro de guanidinio 62,5 mM, de 76,5°C, es decir, superior a 71°C (T_m de la PFEI silvestre en presencia de dicho agente caotrópico), tal como se muestra en el Ejemplo 3 (Tabla 7). Por tanto, en una realización particular, el polipéptido de la invención presenta una T_m (en presencia de dicho agente caotrópico cloruro de guanidinio 62,5 mM) superior a 72°C, preferentemente, igual o superior a 73°C, más preferentemente, igual o superior a 74°C, aún más preferentemente, igual o superior a 75°C, todavía más preferentemente, igual o superior a 76°C, por ejemplo, de 76,5°C.

- Alternativamente, la termoestabilidad de un polipéptido puede ser definida en base a la vida media de dicho polipéptido a una temperatura determinada. Por “vida media” se entiende el tiempo que tarda en degradarse el 50% de las moléculas de un polipéptido en disolución a una temperatura determinada. La vida media de un

polipéptido puede ser determinada mediante un ensayo de inactivación térmica que comprende incubar dicho polipéptido, con una actividad enzimática determinada (e.g., aproximadamente 0,15 unidades internacionales (UI)), y determinar su actividad residual a intervalos de tiempo mediante la conversión de un sustrato apropiado (e.g., un éster de *p*-nitrofenol), a pH 7,5, tal como el ensayo que se describe en el apartado relativo a los

5 Materiales y Métodos contenido en la parte experimental que acompaña a esta descripción. En una realización particular, la vida media del polipéptido de la invención, a una temperatura de 65°C, es superior a 33 minutos (vida media de la PFEI silvestre en las condiciones ensayadas), tal como se muestra en el Ejemplo 4 (Tabla 8). En otra realización particular, el polipéptido de la invención presenta una vida media, a 65°C, en las condiciones ensayadas, comprendida entre más de 33 minutos y 289 minutos; típicamente, igual o superior a 40 minutos;

10 ventajosamente igual o superior a 50 minutos; igual o superior a 75 minutos; igual o superior a 100 minutos; igual o superior a 125 minutos; igual o superior a 150 minutos; igual o superior a 175 minutos; igual o superior a 200 minutos; igual o superior a 225 minutos; igual o superior a 250 minutos; igual o superior a 275 minutos. En realización particular, el polipéptido de la invención presenta una vida media, a 65°C, en las condiciones ensayadas, de 58 minutos.

15 Estudios adicionales realizados por los inventores han puesto de manifiesto que el polipéptido de la invención es estable en presencia de disolventes orgánicos, en concreto, en presencia de disolventes orgánicos polares apróticos, es decir, disolventes orgánicos que carecen de grupos funcionales capaces de ceder protones y que presentan una constante dieléctrica elevada; ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos disolventes incluyen dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), etc. La estabilidad de un polipéptido

20 en un disolvente orgánico puede valorarse empleando cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica apropiados para determinar la estabilidad de una proteína en un disolvente orgánico, por ejemplo, mediante un ensayo de inactivación de dicho polipéptido por un disolvente orgánico, a una temperatura determinada, que comprende incubar dicho polipéptido, con una actividad enzimática determinada (e.g., aproximadamente 0,15 unidades internacionales (UI)), y determinar su actividad residual a intervalos de tiempo

25 mediante la conversión de un sustrato apropiado (e.g., un éster de *p*-nitrofenol), a pH 7,5, tal como el ensayo que se describe en el apartado relativo a los Materiales y Métodos contenido en la parte experimental que acompaña a esta descripción.

En una realización particular, la vida media del polipéptido de la invención medida en una solución que contiene un 40% de DMSO, a una temperatura de 42°C, es de, más de 5 minutos (vida media de la PFEI silvestre en las

30 condiciones ensayadas, tal como se muestra en el Ejemplo 6 (Tabla 9)), ventajosamente, igual o superior a 15 minutos, preferentemente, igual o superior a 25 minutos, más preferentemente, igual o superior a 50 minutos, aún más preferentemente, igual o superior a 75 minutos, todavía más preferentemente, igual o superior a 90 minutos. En una realización particular, el polipéptido de la invención es el identificado como PFEI-34 y su vida media, medida en una solución que contiene un 40% de DMSO, a una temperatura de 42°C, es de 95 minutos,

35 tal como se muestra en el Ejemplo 6 (Tabla 9).

En otra realización particular, la vida media del polipéptido de la invención medida en una solución que contiene un 40% de DMF, a una temperatura de 42°C, es de, más de 10 minutos (vida media de la PFEI silvestre en las condiciones ensayadas, tal como se muestra en el Ejemplo 6 (Tabla 9)), ventajosamente, igual o superior a 15 minutos, preferentemente, igual o superior a 20 minutos, más preferentemente, igual o superior a 25 minutos,

40 aún más preferentemente, de unos 30 minutos aproximadamente. En una realización particular, el polipéptido de la invención es el identificado como PFEI-34 y su vida media, medida en una solución que contiene un 40% de DMF, a una temperatura de 42°C, es de 30 minutos, tal como se muestra en el Ejemplo 6 (Tabla 9).

En otra realización particular, la vida media del polipéptido de la invención medida en una solución que contiene un 15% de THF, a una temperatura de 42°C, es de, más de 9 minutos (vida media de la PFEI silvestre en las condiciones ensayadas, tal como se muestra en el Ejemplo 6 (Tabla 9)), ventajosamente, igual o superior a 10 minutos, preferentemente, igual o superior a 15 minutos, más preferentemente, igual o superior a 50 minutos,

45 aún más preferentemente, igual o superior a 100 minutos, todavía más preferentemente, igual o superior a 250 minutos, incluso más preferentemente, igual o superior a 500 minutos, por ejemplo, de unos 700 minutos aproximadamente. En una realización particular, el polipéptido de la invención es el identificado como PFEI-34 y su vida media, medida en una solución que contiene un 15% de THF, a una temperatura de 42°C, es de 700 minutos, tal como se muestra en el Ejemplo 6 (Tabla 9).

50

La determinación de la temperatura óptima del polipéptido de la invención puede realizarse mediante ensayos convencionales basados en medir la actividad esterasa a distintas temperatura y seleccionar la temperatura en la que se produce la hidrólisis máxima de sustrato por unidad de tiempo.

55 Asimismo, la determinación del pH óptimo del polipéptido de la invención puede realizarse mediante ensayos convencionales basados en medir la actividad esterasa a distintos pHs, seleccionándose aquel valor de pH en el que se produce la hidrólisis máxima de sustrato por unidad de tiempo.

Entre los parámetros importantes en el estudio de las reacciones catalizadas por enzimas se encuentran:

- 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]; y
- 5 - la constante catalítica (k_{cat}) que se refiere al número de moléculas de sustrato convertidas en producto, por centro activo y por unidad de tiempo.

El experto en la materia conoce que los 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 sustratos por los que no muestra afinidad. De este modo, se pueden seleccionar los sustratos preferidos para los distintos polipéptidos contenidos dentro del ámbito del polipéptido de la invención.

En una realización particular, el polipéptido de la invención presenta, además, actividad perhidrolasa. Tal y como aquí se utiliza, el término “actividad perhidrolasa”, aplicado al polipéptido de la invención, hace referencia a que dicho polipéptido es capaz de hidrolizar enlaces de tipo éster en un entorno oxidante, obteniéndose como producto de reacción un ácido peroxicarboxílico (o perácido) y una molécula de agua. El entorno oxidante en el que se lleva a cabo la hidrólisis del enlace éster puede ser proporcionado, por ejemplo, por peróxido de hidrógeno o por una fuente de peróxido. La actividad enzimática puede determinarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia mediante, por ejemplo, la detección del perácido formado como consecuencia de la hidrólisis del enlace éster (Yin, D. L. *et al.* Switching Catalysis from Hydrolysis to Perhydrolysis in *Pseudomonas fluorescens* Esterase. *Biochemistry* 49, 1931–1942 (2010)).

En otra realización particular, el polipéptido de la invención presenta, además, actividad haloperoxidasa. Tal y como aquí se utiliza, el término “actividad haloperoxidasa”, aplicado al polipéptido de la invención, hace referencia a que dicho polipéptido es capaz de catalizar la oxidación de un haluro (e.g., cloruro, bromuro, yoduro) mediante peróxido de hidrógeno, un proceso que da como resultado la halogenación concomitante del sustrato orgánico. La actividad haloperoxidasa puede determinarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, mediante la halogenación de monoclorodimedona (MCD) utilizando peróxido de hidrógeno como oxidante del haluro y siguiendo la halogenación espectrofotométricamente a 290 nm tal como describen Butler & Walker en Chem. Rev. 1998, 93: 1937-1944, o bien como describen Pelletier & Altenbuchner (Pelletier, I. & Altenbuchner, J. A bacterial esterase is homologous with nonhaem haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiology* 141, 459–468 (1995)).

En otra realización particular, el polipéptido de la invención es una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y, al menos, una mutación puntual que consiste en la sustitución de un aminoácido presente en dicha secuencia por otro aminoácido, en donde dicha mutación presente en dicha secuencia SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo formado por:

- (i) la mutación Q11L,
- (ii) la mutación A191S,
- (iii) la mutación D212Y,
- (iv) y cualquier combinación de las mismas.

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

- tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido,
- tiene la misma actividad que dicho polipéptido (es decir, en este caso, actividad esterasa), y
- es termoestable.

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.

De acuerdo con la presente invención, una variante funcionalmente equivalente del polipéptido de la invención tiene la misma actividad enzimática que el polipéptido de la invención, es decir, actividad esterasa. La actividad esterasa de dicha variante puede ser determinada por métodos convencionales de determinación de la actividad

esterasa tales como los mencionados previamente y descritos de forma detallada en el apartado relativo a los Materiales y Métodos de la parte experimental que acompaña a esta descripción.

Asimismo, según la presente invención, una variante funcionalmente equivalente del polipéptido de la invención es termoestable, es decir, tiene actividad esterasa a una temperatura comprendida entre 60°C y 95°C y/o tiene una temperatura de desnaturalización (T_m), en ausencia de agente caotrópico superior a 71°C, y/o una T_m , en presencia de cloruro de guanidinio 62,5 mM, superior a 71°C, y/o una vida media, a una temperatura de 65°C, superior a 33 minutos. La actividad esterasa de dicha variante, así como su termoestabilidad (definida en función de su T_m o de su vida media) pueden ser determinadas por métodos convencionales tales como los mencionados previamente.

En una realización particular, la variante funcionalmente equivalente del polipéptido de la invención comprende, al menos, una mutación puntual que consiste en la sustitución de un aminoácido presente en la SEQ ID NO: 1 por otro aminoácido, en donde dicha mutación presente en dicha secuencia SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo formado por:

- (i) la mutación Q11L, o en otra posición equivalente tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- (ii) la mutación A191S, o en otra posición equivalente tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- (iii) la mutación D212Y, o en otra posición equivalente tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y
- (iv) cualquier combinación de las mismas.

Tal como aquí se utiliza, el término “posición equivalente” se refiere a la posición de un aminoácido en un polipéptido que, por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos corresponde a la posición correspondiente, Q11, A191 o D212, de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

Proteína de fusión de la invención

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.

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.

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.

El polipéptido A comprende un polipéptido de la invención, cuyas características ya han sido mencionadas y se incorporan aquí por referencia. En una realización particular, la proteína de fusión de la invención tiene actividad esterasa.

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.

En una 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), β -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, y, al menos, una mutación puntual que consiste en la sustitución de un aminoácido presente en dicha secuencia por otro aminoácido, en donde dicha mutación presente en dicha secuencia SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo formado por:

- (i) la mutación Q11L,
- (ii) la mutación A191S,
- (iii) la mutación D212Y,
- (iv) y cualquier combinación de las mismas,

o una variante funcionalmente equivalente del mismo, 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 una realización particular, dicha construcción génica comprende parte, o, preferentemente, la totalidad, de los elementos necesarios para la transferencia o expresión del polinucleótido de la invención, por ejemplo, un promotor, un terminador, y secuencias adicionales, por ejemplo, un gen marcador, etc. Las secuencias necesarias para la expresión del polinucleótido de la invención están operativamente unidas al mismo.

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 de la invención 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.

En una realización particular, 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, pNCK. En otra realización particular, cuando dicha bacteria es *E. coli*, el vector de expresión es el plásmido pGASTON. La expresión se induce con L-ramnosa, la 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:

- 5 - 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
- 10 - 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 α) según se describen en US5063154, el promotor TET cuya expresión se regula en presencia de tetraciclinas, los promotores GAL1-10, GALL, GALS que se activan en presencia de galactosa, el promotor VP16-ER, inducible por estrógenos, el promotor rhaBAD, inducible por L-ramnosa 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.
- 15 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).
- 20 En una realización más particular, dicho promotor es un promotor inducible, preferentemente, un promotor inducible por L-ramnosa (Egan SM et al., J. Mol. Biol., 234(1): 87-89, 1993; Stumpp, T. et al., Biopektrum 1: 33-36, 2000).

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

- 25 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 *b/le*, que confiere resistencia a zeocina; el gen *npIII*, que confiere resistencia a kanamicina; el gen de la adenosina deaminasa que confiere resistencia a 9-beta-D-xilofuranosil adenina; el gen de la beta lactamasa que confiere resistencia a ampicilina; 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.

- 40 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 procariotas o eucariotas, 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 procariotas o células eucariotas, tales como levaduras (e.g., *Pichia*), hongos, etc.; no obstante, los organismos preferidos son microorganismos procariotas, ventajosamente mesófilos.

- 50 En otra realización el organismo de la invención puede ser un organismo procariota termófilo, que puede ser utilizado en la presente invención como organismo huésped. Ejemplos ilustrativos de estos organismos incluyen arqueas (e.g. *Sulfolobus*), bacterias (*Pyrococcus Chlorofexus*, *Pyrodictum*), etc. En una realización particular, el vector de la invención es transformado en *Thermus thermophilus* (*T. thermophilus*).

- 55 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 procariota o eucariota, 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 tiphyurium*, *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.

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 α . 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.

20 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. Por ejemplo, el crecimiento del organismo mesófilo de la invención puede requerir condiciones de temperatura menores que la temperatura de crecimiento óptima de dicho organismo; por lo tanto en una realización preferida, para que el procedimiento de la invención se lleve a cabo con éxito puede ser necesario, en algunas ocasiones, crecer dicho organismo mesófilo, por ejemplo *E. coli*, a 21°C para la sobreexpresión del polipéptido de la invención.

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, 3ª 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 electroporación. 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 pGASTON, el agente de selección puede ser ampicilina. 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. 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. En algunas realizaciones la temperatura de crecimiento de dicho organismo puede ser modificada para favorecer la expresión del polipéptido de la invención o de la proteína de fusión de la invención, por ejemplo 21°C. 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 L-ramnosa cuando el promotor es inducible por L-ramnosa. 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.

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 poliácridamida-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.

La presencia de agentes quelantes, tales como quelantes de metales pesados (por ejemplo, el ácido etildiaminotetraacético); la presencia de inhibidores de proteasas de serina (por ejemplo el fluoruro de fenilmeilsulfonilo); o la presencia de disolventes orgánicos polares neutros (por ejemplo acetona, etanol o butanol) pueden interferir con componentes en la mezcla de reacción de la actividad esterasa 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.

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.

Aplicaciones del polipéptido de la invención

El polipéptido de la invención, así como la proteína de fusión de la invención, tienen actividad esterasa, por lo que pueden hidrolizar ésteres carboxílicos y generar un ácido carboxílico y un alcohol.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para hidrolizar enzimáticamente un éster carboxílico presente en un compuesto que comprende poner en contacto dicho compuesto que contiene un éster carboxílico con un polipéptido de la invención, o con una proteína de fusión de la invención, bajo condiciones adecuadas para la hidrólisis de dicho éster carboxílico.

Como es conocido, las carboxil éster hidrolasas constituyen un amplio grupo de enzimas capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos mediante la hidrólisis de un grupo éster en presencia de agua generándose un ácido carboxílico y un alcohol como productos de reacción. De hecho, prácticamente cualquier compuesto que tiene un grupo éster carboxílico cuya hidrólisis enzimática rinde un ácido carboxílico y un alcohol puede ser sustrato de una carboxil éster hidrolasa.

Así, en una realización particular, el sustrato de dicha carboxil éster hidrolasa es un compuesto de fórmula (I)



(I)

donde

- 5 R^1 y R^2 , independientemente entre sí, representan un radical de un compuesto orgánico que contiene al menos 1 átomo de carbono, por ejemplo, alquilo, alqueno, cicloalquilo, arilo, alquilarilo, heterociclilo o heterociclilalquilo.
- 10 “Alquilo” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada derivada de un alcano, lineal o ramificada, que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que tiene de 1 a 50, preferiblemente de 1 a 22 átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc., opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes.
- 15 “Alqueno” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada derivada de un alqueno, lineal o ramificada, que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, y contiene al menos una insaturación (doble enlace), que tiene de 1 a 50, preferiblemente de 1 a 22 átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, vinilo, alilo, butenilo (e.g., 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo), butadienilo, hexadienilo (e.g., 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo, 1,5-hexadienilo, 2,4-hexadienilo, 2,5-hexadienilo), 2-propil-2-butenilo, etc., opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes.
- 20 “Cicloalquilo” se refiere a un radical hidrocarbonado insaturado monocíclico o bicíclico de 3 a 10, preferiblemente de 5, 6 ó 7 miembros, estable, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, tal como ciclohexilo, adamantilo, etc., opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes.
- 25 “Arilo” se refiere a un radical de un único anillo o de múltiples anillos, que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, condensados o no condensados (unidos a través de un enlace), que incluye al menos un radical de anillo aromático. Los grupos arilo típicos contienen 1 ó 2 anillos separados o condensados, tales como radicales fenilo, naftilo, tetralina, indenilo, fenantrilo, etc., opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes.
- 30 “Arilalquilo” se refiere a un grupo arilo unido al resto de la molécula a través de un grupo alquilo, tal como bencilo, fenetilo, etc., opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes.
- 35 “Heterociclilo” se refiere a un radical de anillo de 3 a 15 miembros estable, aromático o no, que consiste en átomos de carbono e hidrógeno y de 1 a 5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre, opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes, preferiblemente un anillo de 4 a 8 miembros con uno o más heteroátomos, más preferiblemente un anillo de 5 ó 6 miembros con uno o más heteroátomos. El heterociclo puede ser aromático, saturado o parcialmente saturado, o un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas de anillo condensados; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical de heterociclilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Ejemplos ilustrativos de grupos heterociclilo incluyen los radicales de azepinas, bencimidazol, benzotiazol, furano, isotiazol, imidazol, indol, piperidina, piperazina, purina, quinolina, tiadiazol, tetrahidrofurano, cumarina, morfolina; pirrol, pirazol, oxazol, isoxazol, triazol, imidazol, etc.
- 40 “Heterociclilalquilo” se refiere a un grupo heterociclilo unido al resto de la molécula a través de un grupo alquilo.
- 45 Los radicales alquilo, alqueno, cicloalquilo, arilo, alquilarilo, heterociclilo o heterociclilalquilo pueden contener uno o más sustituyentes situados independientemente en una o más posiciones disponibles con uno o más grupos adecuados, por ejemplo, halógeno, tal como flúor, cloro, bromo e yodo; ciano; hidroxilo; nitro; azido; acilo con 1 a 10 átomos de carbono; grupos alquilo con 1 a 10 átomos de carbono; grupos alqueno o alquino con 2 a 10 átomos de carbono; grupos alcoxilo con uno o más enlaces de oxígeno y con 1 a 10 átomos de carbono; grupos ariloxilo con 6 a 10 átomos de carbono; grupos alquiltio con uno o más, preferiblemente 1 ó 2, enlaces de tioéter y de 1 a 6 átomos de carbono; grupos alquilsulfinilo con 1 a 10 átomos de carbono; grupos alquilsulfonilo con 1 a 10 átomos de carbono; grupos aminoalquilo tales como grupos que tienen uno o más átomos de N, preferiblemente 1 ó 2, y de 1 a 12 átomos de carbono; grupos arilo que tienen de 6 a 10 átomos de carbono; y grupos arilalquilo.
- 50 El experto en la materia entenderá que el compuesto de fórmula (I) puede tener centros quirales cuya configuración absoluta puede ser R o S. Los grupos éster carboxílico presentes tanto en los compuestos ópticamente activos como en sus mezclas, incluyendo las mezclas racémicas, pueden ser hidrolizados por el polipéptido de la invención, o por la proteína de fusión de la invención, con el fin de obtener el producto deseado.
- 60 Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichos compuestos de fórmula (I) incluyen ésteres de *p*-nitrofenol, por ejemplo, acetato, butirato, octanoato, dodecanoato, oleato, 3-fenilbutirato (R y S), 2-fenilbutirato (R y S), etc., de *p*-nitrofenol; ésteres de fenol y sus derivados, por ejemplo, butirato de fenilo, butirato de *o*-metilfenilo, butirato de

m-metilfenilo, butirato de *o*-metilfenilo, butirato de *o*-metoxilfenilo, butirato de *m*-metoxifenilo, butirato de *o*-clorofenilo, butirato de *m*-clorofenilo, butirato de *m*-nitrofenilo, butirato de *m*-cianofenilo, etc.; ésteres de ácidos 2-aril-propiónicos, por ejemplo, ibuprofeno, naproxeno, etc.; ésteres aril-sustituídos bien en el lado del ácido o en el del alcohol, por ejemplo, acetato de 1-fenil-1-propil, acetato de 1-fenil-2-propilo, acetato de 1-fenil-1-etilo, acetato de 1-fenil-2-pentilo, 3-fenilbutirato de etilo, 2-fenilpropionato de etilo, etc.; ésteres de resorufina; ésteres de alquilo, por ejemplo, acetato de metilo, acetato de etilo, butirato de etilo, octanoato de etilo, (S)-3-bromo-2-metilpropanoato de metilo, etc. (Schließmann, A., Hidalgo, A., Berenguer, J. & Bornscheuer, U. T. Increased Enantioselectivity by Engineering Bottleneck Mutants in an Esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *ChemBioChem* **10**, 2920–2923 (2009); Schmidt, M. *et al.* Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* yields a mutant with excellent enantioselectivity and activity for the kinetic resolution of a chiral building block. *ChemBioChem* **7**, 805–809 (2006); Bornscheuer, U. T. *et al.* Selectivity of lipases and esterases towards phenol esters. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **36**, 8–13 (2005); Schmidt, M., Kähler, M., Kirchner, L., Wiggenshorn, K. & Bornscheuer, U. T. Creation of a highly enantioselective esterase variant by directed evolution for the synthesis of 3-butyn-2-ol. *unpublished results* (2005); Horsman, G. P., Liu, A. M. F., Henke, E., Bornscheuer, U. T. & Kazlauskas, R. J. Mutations in distant residues moderately increase the enantioselectivity of *Pseudomonas fluorescens* esterase towards methyl 3-bromo-2-methyl propanoate and ethyl 3-phenylbutyrate. *Chem. Eur. J.* **9**, 1933–1939 (2003); Bornscheuer, U. T., Altenbuchner, J. & Meyer, H. H. Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2169–2173 (1999); Henke, E. & Bornscheuer, U. T. Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error-prone PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resofurin-based fluorescence assay. *Biol. Chem.* **380**, 1029–1033 (1999).

En otra realización particular, el sustrato de dicha carboxil éster hidrolasa es un acilglicerol, tal como un acilglicerol de cadena corta. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “acilglicerol de cadena corta” se refiere a una molécula de naturaleza lipídica formada por 1, 2 ó 3 ácidos grasos esterificados a una molécula de glicerol; es decir, dicho término “acilglicerol”, tal como aquí se utiliza, incluye mono-, di- o tri-acilgliceroles. La longitud de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cadena hidrocarbonada de dichos ácidos grasos comprende entre 2 y 22 átomos de carbono, típicamente entre 2 y 8 átomos de carbono. Dicha cadena hidrocarbonada puede estar totalmente saturada (es decir, sin dobles enlaces), o, alternativamente, puede contener una o más insaturaciones, (es decir, uno o más dobles enlaces entre dos átomos de carbono). En caso de que el acilglicerol sea un diacilglicerol los ácidos grasos presentes en dicho diacilglicerol pueden ser iguales o diferentes entre sí. En caso de que el acilglicerol sea un triacilglicerol los ácidos grasos presentes en dicho triacilglicerol pueden ser iguales, diferentes, o pueden ser dos iguales entre sí y diferentes al tercero.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de acilgliceroles de cadena corta susceptibles de ser hidrolizados mediante el polipéptido de la invención o la proteína de fusión de la invención incluyen gliceril triacetato, gliceril tributanoato, etc.

La hidrólisis enzimática del éster carboxílico presente en un compuesto se lleva a cabo bajo condiciones adecuadas para la hidrólisis de dicho éster carboxílico. Dichas condiciones pueden ser establecidas por el experto en la materia. En una realización particular, debido a la termoestabilidad del polipéptido de la invención, dicha hidrólisis enzimática puede llevarse a cabo dentro de un amplio intervalo de temperatura, por ejemplo, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 20°C y 95°C, típicamente entre 35°C y 75°C, por ejemplo, entre 50°C y 65°C aproximadamente. Adicionalmente, la termoestabilidad de dicho polipéptido de la invención en presencia de agentes caotrópicos posibilita la realización de dicha hidrólisis enzimática en presencia de agentes desnaturizantes. Tales propiedades del polipéptido de la invención, termoestabilidad en ausencia o presencia de agentes caotrópicos, y, opcionalmente, en presencia de disolventes orgánicos polares apróticos, permite ampliar enormemente las posibilidades de llevar a cabo la hidrólisis enzimática de un compuesto sustrato para el polipéptido de la invención y obtener el producto de interés.

El polipéptido de la invención, así como la proteína de fusión de la invención, tienen capacidad para hidrolizar una lactona y generar un hidroxiácido, es decir, un compuesto que contiene un grupo carboxílico y un grupo hidroxilo. Una lactona es un compuesto orgánico de tipo éster cíclico que puede tener un número variable de átomos de carbono en el anillo, opcionalmente sustituidos tal como se ha mencionado previamente en relación con el compuesto de fórmula (I). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de lactonas incluyen β -lactona, γ -lactona, δ -lactona, ϵ -lactona, ϵ -caprolactona, etc.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para hidrolizar enzimáticamente una lactona que comprende poner en contacto dicha lactona con un polipéptido de la invención, o con una proteína de fusión de la invención, bajo condiciones adecuadas para la hidrólisis de dicha lactona.

La hidrólisis enzimática de la lactona se lleva a cabo bajo condiciones adecuadas para su hidrólisis. Dichas condiciones pueden ser establecidas por el experto en la materia. En una realización particular, dicha hidrólisis

enzimática se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre aproximadamente 20°C y 95°C, típicamente entre 35°C y 75°C, por ejemplo, entre 50°C y 65°C aproximadamente, opcionalmente en presencia de agentes caotrópicos y/o de disolventes orgánicos polares apróticos.

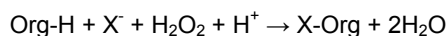
5 El polipéptido de la invención, así como la proteína de fusión de la invención, tienen capacidad para hidrolizar una lactama y generar un aminoácido, es decir, un compuesto que contiene un grupo carboxílico y un grupo amino. Una lactama es una amida cíclica que contiene un grupo –CO-NH– y un número variable de átomos de carbono en el anillo, opcionalmente sustituidos tal como se ha mencionado previamente en relación con el compuesto de fórmula (I). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de lactamas incluyen β-lactama, γ-lactama, δ-lactama, 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona (lactama de Vince), etc.

10 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para hidrolizar enzimáticamente una lactama que comprende poner en contacto dicha lactama con un polipéptido de la invención, o con una proteína de fusión de la invención, bajo condiciones adecuadas para la hidrólisis de dicha lactama.

15 La hidrólisis enzimática de la lactama se lleva a cabo bajo condiciones adecuadas para su hidrólisis, en particular del grupo –CO-NH–. Dichas condiciones pueden ser establecidas por el experto en la materia. En una realización particular, dicha hidrólisis enzimática se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre aproximadamente 20°C y 95°C, típicamente entre 35°C y 75°C, por ejemplo, entre 50°C y 65°C aproximadamente, opcionalmente en presencia de agentes caotrópicos y/o de disolventes orgánicos polares apróticos.

20 En una realización particular, el polipéptido de la invención (y la proteína de fusión de la invención) presenta, además, actividad perhidrolasa, es decir, es capaz de hidrolizar enlaces de tipo éster en un entorno oxidante, obteniéndose como producto de reacción un ácido peroxycarboxílico (o perácido) y una molécula de agua. El entorno oxidante en el que se lleva a cabo la hidrólisis del éster puede ser proporcionado por la adición al medio de peróxido de hidrógeno, o bien puede ser proporcionado por una fuente de peróxido, tal como por ejemplo, un perborato (e.g., perborato sódico, etc.), un percarbonato (e.g., percarbonato sódico, etc.), un peroxihidrato (e.g., peroxihidrato de pirofosfato sódico, peroxihidrato de urea, etc.), etc. que genera *in situ* el peróxido de hidrógeno necesario para llevar a cabo la reacción. En este caso, la hidrólisis enzimática del éster carboxílico presente en un compuesto se lleva a cabo bajo condiciones adecuadas para la hidrólisis de dicho éster carboxílico, las cuales pueden ser establecidas por un experto en la materia e incluyen peróxido de hidrógeno o una fuente de peróxido, tal como se ha mencionado previamente, para generar un entorno oxidante. La hidrólisis enzimática puede llevarse a cabo a una temperatura comprendida entre aproximadamente 20°C y 95°C, típicamente entre 35°C y 75°C, por ejemplo, entre aproximadamente 50°C y 65°C, opcionalmente en presencia de agentes caotrópicos y/o de disolventes orgánicos polares apróticos.

35 En otra realización particular, el polipéptido de la invención (y la proteína de fusión de la invención) presenta, además, actividad haloperoxidasa, es decir, es capaz de catalizar la oxidación de un haluro (e.g., cloruro, bromuro, yoduro) mediante peróxido de hidrógeno, un proceso que da como resultado la halogenación concomitante del sustrato orgánico, es decir, la obtención de un halogenuro orgánico, tal como se muestra en la reacción:



40 donde Org es un radical de un compuesto orgánico que contiene al menos 1 átomo de carbono, por ejemplo, alquilo, alquenoilo, cicloalquilo, arilo, alquilarilo, heterociclilo o heterocicliclilalquilo (donde estos términos tienen los significados indicados en relación con la fórmula (I)).

Un halogenuro orgánico es un compuesto en el que un halógeno está unido covalentemente a un átomo de carbono dando como resultado un compuesto organofluorado, un compuesto organoclorado, un compuesto organobromado, o un compuesto organoyodado. Un halogenuro orgánico puede contener uno o más halógenos unidos a los correspondientes átomos de carbono.

45 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener enzimáticamente un halogenuro orgánico que comprende poner en contacto un compuesto orgánico con un polipéptido de la invención, o con una proteína de fusión de la invención, en presencia de un haluro y de peróxido de hidrógeno, o una fuente de peróxido, tal como se ha mencionado previamente, en un medio que comprende protones, bajo condiciones adecuadas para la obtención de dicho halogenuro orgánico.

50 La reacción enzimática se lleva a cabo bajo condiciones adecuadas para la obtención del halogenuro orgánico, las cuales pueden ser establecidas por el experto en la materia. En una realización particular, dicha reacción enzimática se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre aproximadamente 20°C y 95°C, típicamente

entre 35°C y 75°C, por ejemplo, entre 50°C y 65°C aproximadamente, opcionalmente en presencia de agentes caotrópicos y/o de disolventes orgánicos polares apróticos.

EJEMPLOS

- 5 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

- 10 Todos los reactivos empleados eran de calidad analítica y se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.) o Merck (Darmstadt, Alemania). Se usó *E. coli* DH5α [F-Φ80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1] y la cepa silvestre de *T. thermophilus* HB27, 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 y cebadores

- 15 Todos los cebadores usados en la invención se muestran en la lista de secuencias y en la Tabla 1. Con el fin de producir mutantes de PFEI termorresistentes, se clonó el gen que codifica para la esterasa I de *P. fluorescens* (PFEI) en el plásmido pNCK entre los sitios de restricción BamHI y NotI, generándose el plásmido pNCK-PFEI. Durante los distintos procesos de clonaje realizados en esta invención, ha sido necesaria la introducción de uno o varios sitios de restricción adicionales en la secuencia el gen que codifica PFEI, así como de los mutantes generados. Dichos sitios de restricción han sido introducidos en la secuencia mediante PCR y los cebadores empleados para ellos se incluyen en la Tabla 1 así como en la lista de secuencias. El plásmido pNCK es un derivado del plásmido pUC19 por inserción del gen *kat* clonado entre los sitios EcoRI y HindIII. Posteriormente, se procedió a la generación de los mutantes mediante la técnica de PCR propensa al error (epPCR), empleando los cebadores pNCK_epfw3 y pNCK_eprv2 (Tabla 1) obteniéndose una genoteca de plásmidos pNCK-PFEI. La selección de los mutantes se llevó a cabo mediante la transformación de la genoteca generada en el organismo *T. thermophilus* eligiendo aquéllos que conferirían una termoestabilidad deseada. La identificación de las mutaciones generadas se realizó mediante la secuenciación del gen que codifica para PFEI empleando los cebadores, pNCKep_epfw3, pNCKep_rv2, M13_fw y M_13rv (Tabla 1). El plásmido pNCK-PFEI34, que comprende la secuencia que codifica para uno de los polipéptidos de la invención, concretamente, al identificado como PFEI-34 (Tabla 6), es el plásmido derivado de pNCK-PFEI, seleccionado de la librería pNCK-PFEI a 67,5°C.

- Para la expresión en *E. coli* de la proteína silvestre y de los mutantes seleccionados, se clonaron las secuencias codificantes de PFEI silvestre y mutantes en un plásmido de expresión pGASTON generándose los plásmidos pGASTON-PFEI, en el caso de la proteína silvestre y pGASTON-PFEI-34, en el caso del clonaje del ADN correspondiente a PFEI-34. Una vez identificados los mutantes, se diseñaron cebadores para la generación de algunas de las mutaciones identificadas en la secuencia de PFEI (Tabla 6), dichos cebadores se muestran en la Tabla 1. En los ensayos de actividad realizados, se comparó la actividad de la proteína PFEI silvestre con la actividad de los mutantes seleccionados. Adicionalmente, se realizaron experimentos en los que dicha actividad se comparó con la actividad de otros mutantes ya descritos en el estado de la técnica, o con la actividad de dichos mutantes descritos en el estado de la técnica, a los que adicionalmente, se añadió una o varias de las mutaciones identificadas en la presente invención. Así, los plásmidos pGASTON PFEI T3 y pGASTON PFEI S7 corresponden a dos mutantes de PFEI descritos en el estado de la técnica (Schließmann, A., Hidalgo, A., Berenguer, J. & Bornscheuer, U. T. Increased Enantioselectivity by Engineering Bottleneck Mutants in an Esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *ChemBioChem* **10**, 2920–2923 (2009)) que son más eficientes en la hidrólisis de ésteres de p-nitrofenol en los que el ácido carboxílico contiene cadenas de entre 8 y 10 carbonos. Los plásmidos generados en la presente invención, pGASTON PFEI T3-34 y pGASTON PFEI S7-34, corresponden a los mutantes anteriormente mencionados descritos en el estado de la técnica (Hidalgo et al., Protein Eng. Des. Sel., 21(9):567-576, 2008) que adicionalmente contienen en la secuencia de PFEI las mutaciones correspondientes al clon 34 (PFEI-34) identificado en la presente invención. El plásmido pGASTON HJ corresponde a la secuencia de PFEI descrita en el estado de la técnica por Jochens et al., 2010 (Jochens et al, Protein. Eng. Des. Sel., 23(12):903-909, 2010) clonada en el plásmido pGASTON. Las secuencias clonadas en el plásmido pGASTON fueron secuenciadas con los cebadores rrnB_rv y Rhap_fw mostrados en la Tabla 1 y en la lista de secuencias de la presente invención.

Tabla 1

Cebadores empleados

Nombre	Secuencia de los cebadores (5' - 3')	Sitios de restricción (subrayada en la secuencia del cebador)
pNCKep_fw3 (SEQ ID NO: 2)	ACTCGCCCGTCTCGGGTTC	-
pNCKep_rv2 (SEQ ID NO: 3)	CGACCAAGAGAGCCATAAACACC	-
PFEINdeI_fw (SEQ ID NO: 4)	AAAAAA <u>CATATG</u> AGCACATTTGTTGC	<i>NdeI</i>
pFEIBamHI_rv (SEQ ID NO: 5)	AAAAAA <u>GGATCC</u> GCGTTTCAAGAACG	<i>BamHI</i>
M13_fw (SEQ ID NO: 6)	GTAAAAACGACGGCCAG	-
M13_rv (SEQ ID NO: 7)	CAGGAAACAGCTATGAC	-
PFEIQ11L_fw (SEQ ID NO: 8)	TTGCAAAAGACGGTACCCTGATCTATTTCAAGGACTG	-
PFEIQ11L_rv (SEQ ID NO: 9)	CAGTCCTTGAAATAGATCAGGGTACCGTCTTTTGCAA	-
PFEIA191S_fw (SEQ ID NO: 10)	TGGCCTCGCTCAAGTCCACGGTGGATTGCG	-
PFEIA191S_rv (SEQ ID NO: 11)	CGCAATCCACCGTGGACTTGAGCGAGGCCA	-
PFEIE201V_fw (SEQ ID NO: 12)	CCGCGTTCGCCGTAACCGACTTCCG	-
PFEIE201V_rv (SEQ ID NO: 13)	CGGAAGTCGGTTACGGCGAACGCGG	-
PFEID212Y_fw (SEQ ID NO: 14)	GGACATGGCCAAGATCTACGTACCCACCCTGGTGA	-
PFEID212Y_rv (SEQ ID NO: 15)	TCACCAGGGTGGGTACGTAGATCTTGGCCATGTCC	-
rrmB_rv (SEQ ID NO: 16)	CCGCCAGGCAAATTCTGT	-
Rhap_fw (SEQ ID NO: 17)	CATCATCACGTTTCATCTTTCC	-

Generación de mutaciones puntuales

- 5 Para generar mutaciones puntuales en la esterasa I de *P. fluorescens* (PFEI) se realizó una amplificación del plásmido que contenía el gen a mutar utilizando dos oligonucleótidos complementarios portadores de la mutación y la enzima PfuPlus (Gdansk, Polonia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar el ADN molde se realizó una digestión durante 1 hora con la enzima de restricción *DpnI*, que digiere ADN metilado y hemimetilado. A continuación se transformaron células de *E. coli* DH5 α con 5 μ l del resultado de la digestión y se seleccionaron los transformantes por resistencia a ampicilina.

Generación de mutaciones múltiples

Se generaron genotecas con las mutaciones más frecuentemente encontradas en los ensayos de termoselección de los dominios de la polimerasa del fago Φ 29 siguiendo las indicaciones descritas en el protocolo del kit Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene).

- 15 Todas las genotecas aleatorias fueron generadas por PCR propensa al error o "epPCR (del inglés "error-prone PCR"). El protocolo para epPCR incluye variantes sobre el protocolo típico de PCR tales como un programa de amplificación con mayor número de ciclos, 2,5-5 unidades de Taq polimerasa (GoTaq®Flexi, Promega), mezcla no equimolar de dNTPS (0,2 mM dATP y dGTP; 1 mM dCTP y dTTP), tampón "mutagénico" y diferentes concentraciones de MnCl₂ (Cadwell, R. C. & Joyce, G. F. Randomization of genes by PCR mutagenesis. PCR Methods and Applications **2**, 28–33 (1992)). Se utilizó como molde de la epPCR la construcción pNCK con el gen silvestre de interés insertado con las dianas de restricción BamHI/NotI. También se utilizó el mismo par de oligonucleótidos pNCK-epfw3 y pNCK-eprv2 para la epPCR (Tabla 1). Estos oligonucleótidos hibridan en el

vector pNCK 50 pares de bases aguas arriba y 50 pares de bases aguas abajo de las secuencias de restricción de inicio y finalización del gen de interés, de tal forma que se generaba un producto de epPCR con un “brazo” de corte que permitió mayor eficiencia a la hora de clonar en pNCK(BamHI/NotI). Antes de proceder a generar las genotecas definitivas, se establecieron condiciones de mutagénesis adecuadas basadas en resultados de secuenciación. Una vez establecidas las condiciones de mutagénesis, se ligó el producto final de la epPCR con el vector pNCK, previa digestión de ambos con las enzimas para las secuencias de restricción descritas anteriormente.

La mutagénesis esperada para la genoteca PFEI se logró con la mezcla de reacción y programa de amplificación en termociclador que se muestran en las Tablas 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2

Programa de termociclador para la generación de mutantes de PFEI

Ciclo	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	Desnaturalización	95	1
2 a 31	Desnaturalización	95	1
	Anillamiento	59	1
	Elongación	72	1 min/kb
32	Elongación final	72	10

Tabla 3

Mezcla de reacción utilizada para las condiciones de PCR para la generación de mutantes de PFEI

Reactivo	Cantidad
Agua ultrapura	csp 400µl
Buffer mutagénico	40 µl
dNTPs no equimolares	40 µl
MnCl ₂ (10 mM)	2,5 µl
pNCK-epfw3 (100mM)	4 µl
pNCK-eprv2 (100mM)	4 µl
ADN molde	80 ng
GoTaq polimerasa	4 µl

(csp: cantidad suficiente para)

Condiciones de crecimiento y conservación de estirpes bacterianas

T. thermophilus fue cultivado a 60°C ó a 70°C en medio TB (tripticasa BBL 8 g/l, extracto de levadura Gibco 4 g/l y NaCl 3 g/l, pH 7,5) (Fernández-Herrero et al., Mol. Microbiol., 17(1-12), 1995). El crecimiento en aerobiosis fue realizado en matraces rellenos con medio de cultivo líquido hasta 1/5 de su capacidad con una agitación de 150 rpm. Se añadieron los antibióticos correspondientes cuando las condiciones lo exigieron. Cuando se pretendía aislar colonias individuales, *T. thermophilus* se cultivó en medio TB sólido, suplementando el medio TB líquido con agar (Pronadisa) a una concentración final de 1,5% p/v. Las placas se incubaron a la temperatura indicada durante 48 horas en una cámara húmeda para evitar la deshidratación del medio. Para la selección de derivados termoestables de la esterasa I de *P. fluorescens* (PFEI), se utilizaron temperaturas y concentraciones de kanamicina específicas para cada caso, las cuales se detallan en el apartado correspondiente a las condiciones de termoselección.

E. coli fue cultivado a 37°C en medio LB (Lennox, E. X. Transduction of linked genetic chateacters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1, 190–206 (1955)) líquido en matraces o tubos rellenos con medio de cultivo hasta 1/4 de su capacidad con una agitación de 150 rpm, o con agar (1,5% p/v). En algunas ocasiones el crecimiento de *E. coli* se realizó a 21°C cuando se requería para la sobreexpresión de la PFEI.

Se utilizaron varios antibióticos cuando se requería seleccionar algún clon determinado. Estos fueron: ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml), higromicina (100 µg/ml) y bleomicina (15 µg/ml en el caso de *T. thermophilus* HB27). El crecimiento en líquido de los cultivos se siguió midiendo la densidad óptica a 550 nm (DO₅₅₀) en el caso de *T. thermophilus* HB27 y 600 nm (DO₆₀₀) para *E. coli*, la medición se realizó en un espectrofotómetro Hitachi U-2000.

Las estirpes bacterianas fueron conservadas en placa durante un máximo de un mes, a 4°C en el caso de *E. coli* y el mismo tiempo a temperatura ambiente en el caso de *T. thermophilus*.

Cuando se requería su almacenamiento durante largos periodos de tiempo, las cepas de *E. coli* se mantuvieron a -70°C en medio de crecimiento en presencia de glicerol 20% (v/v). Las células de *T. thermophilus*, se conservaron a -20°C en forma de sedimentos celulares compactos y semi-secos (*pellets*).

Transformación bacteriana

- 5 La transformación de *E. coli*, se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Hanahan (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166(4): 557-580, 1983). En el caso de *T. thermophilus*, tanto la estirpe silvestre como sus mutantes fueron transformadas por competencia natural (Koyama, Y., et al., J. Bacteriol., 166(1): 338-340, 1986), añadiendo 0,1-0,2 µg de ADN a 0,6 ml de cultivo en fase exponencial tardía (aprox. 0,4 DO₅₅₀) en medio de crecimiento TB. En el caso de *T. thermophilus* HB27, cuando fue necesaria una alta eficiencia de transformación, se utilizó la electroporación para transformar las células. 50 µl de células electrocompetentes fueron incubadas con el ADN durante 30 minutos a 4°C, y posteriormente fueron sometidas a un pulso corto (5 ms) en un campo eléctrico de 12.500 V/cm (Easyject Plus D2000; 2500 V, 201 Ω y 25 µF, en cubetas de 0,2 cm de grosor). Tras la transformación, las bacterias se incubaron, en todos los casos, en medio rico sin antibiótico, a su temperatura óptima de crecimiento durante el tiempo necesario para permitir la expresión de los genes de resistencia al antibiótico correspondiente. En el caso de *E. coli*, este tiempo venía determinado por el tipo de antibiótico que se estuviera utilizando, siendo de 60 minutos en el caso de ampicilina y de 120 minutos si se empleaba kanamicina, higromicina o bleomicina. Para *T. thermophilus*, independientemente del antibiótico (kanamicina, higromicina o bleomicina) el tiempo siempre fue de 4 horas. Tras este período de incubación, la suspensión se extendió en placas de selección con el antibiótico correspondiente y se dejaron crecer los transformantes durante 12 horas a 37°C para *E. coli*, y de 24 a 48 horas a una temperatura de crecimiento entre 60°C y 70°C para *T. thermophilus* HB27.

Expresión y purificación de PFEI en *E. coli*

- El plásmido utilizado para la expresión de estas enzimas en *E. coli* fue pGASTON, un vector seleccionable con ampicilina que posee un promotor inducible por L-ramnosa (Stumpp, T. et al., Biopektrum 1: 33-36, 2000). En este vector se introdujeron las secuencias codificantes de las distintas esterasas amplificadas mediante PCR con las dianas para enzimas de restricción *NdeI* en 5' y *HindIII* en 3', utilizando para ello los oligonucleótidos específicos detallados en la Tabla 1. La inducción fue realizada por adición de L-ramnosa a una concentración final de 0,2% (p/v) a un cultivo líquido cuya OD₆₀₀ fue 0,5. Tras la inducción, se dejó el cultivo en agitación a 22°C y, 18 horas más tarde, se sedimentaron las células por centrifugación (15 min, 4°C, 3.900xg). El sedimento de células fue resuspendido en 10 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7,5, y, posteriormente, las células fueron lisadas por sonicación en hielo (20 minutos, pulso 50% y amplitud del 60%) tras otro paso de centrifugación (15 minutos a 4°C, 3.900xg), la fracción soluble de proteínas se puso en contacto con la resina TALON[®] CellThru (Clontech), de afinidad a cobalto. Se incubó la resina con la fracción soluble con agitación rotatoria durante 1 h a 4°C, y después se procedió al lavado de la resina para eliminar otras proteínas que presentan interacciones no específicas con el soporte cromatográfico. Tras esto, se eluyó la proteína de interés utilizando el tampón de elución que contenía 150 mM de imidazol. El equilibrado y lavado de la resina, así como la elución de la proteína se realizaron con las soluciones recomendadas por el fabricante (Clontech). Luego se diafiltró y concentró la proteína en dispositivos de centrifugación Amicon[®] Ultra 15 (Millipore) y finalmente se suplementó con glicerol a una concentración final de 50% (v/v) y se almacenó a -20°C.

Actividad esterasa en placa multipocillo

- Se realizó este ensayo para cuantificar en líquido la actividad enzimática, las constantes catalíticas y la inactivación térmica o por disolventes PFEI. El método está basado en la hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenol (acetato, butanoato, octanoato) al correspondiente ácido carboxílico y *p*-nitrofenol. A pH ligeramente alcalino, el *p*-nitrofenol está esencialmente ionizado y su ión tiene color amarillo, pudiendo ser cuantificado fotométricamente a 410 nm. La medición se realizó en el lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech). Para los ensayos de inactivación térmica, se incubó la proteína en el tampón de reacción a 65°C y con una agitación de 800 rpm. En el caso de inactivación por disolventes, se mantuvieron a 42°C con una agitación de 800 rpm.

Actividad esterasa en gel de poliacrilamida (zimograma)

- 50 El zimograma de actividad esterasa (Bornscheuer, U. et al., Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1201 (1): 55-60, 1994) está basado en la hidrólisis enzimática de α-naftilacetato a ácido acético y α-naftol. La formación de conjugados de α-naftol y Fast Red de color rojo indica la existencia de una proteína con actividad esterasa. Después de la electroforesis de las muestras en condiciones desnaturalizantes, se incubó el gel resultante en una solución de renaturalización (Tris-HCl 20 mM, pH 8, 0,5% Tritón Tx-100) durante 1 hora. Tras este proceso, se incubó el gel en una mezcla en proporciones 1:1 de la solución A (0,4 mg/ml de 1-naftil acetato, acetona 1:10 (v/v) en tampón fosfato 50 mM pH 7,5) y B (1 mg/ml de Fast Red TR en tampón fosfato 50 mM pH 7,5) de revelado de actividad esterasa y el gel se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta que se observó la aparición de bandas rojas.

Actividad esterasa de colonias (overlay)

- El ensayo de actividad esterasa en placas con medio sólido LB con ampicilina 100 µg/ml se utilizó para la identificación de clones (en *E. coli*) que contenían derivados de esterasa activos seleccionados previamente en *T. thermophilus* HB27. Se realizaron 2 réplicas de cada clon con sus respectivos controles, positivo (pNCK-PFEI) y negativo (pNCK) y se incubaron a 37°C durante 12-18 horas, y, a continuación, una de las placas se cubrió con solución de agar al 0,5% que contenía Fast Red y α -naftilacetato. El control positivo, así como las colonias que contienen un derivado de esterasa activo, hidrolizan el α -naftilacetato a ácido acético y α -naftol. La liberación de conjugados de α -naftol y Fast Red de color rojo permiten diferenciar estos clones activos de aquellos que contienen una enzima inactiva o incorrectamente expresada.

Determinación de la estabilidad de proteínas mediante dicroísmo circular

- En el proceso de caracterización de las variantes de PFEI se determinó la temperatura de desnaturalización (T_m) utilizando un espectrofotómetro de dicroísmo circular (Jasco, Groß-Umstadt, Germany). En todos los casos se utilizó 0,56 mmol de proteína pura previamente dializada frente a tampón fosfato 25 mM, pH 7,5 a 4°C. Como primer paso se realizó el espectro de absorción de cada variante de PFEI en el rango de 190 a 250 nm con el objetivo de descartar interferencias en la absorción de luz UV a 222 nm.

- El intervalo de temperatura utilizado para la desnaturalización de las variantes de PFEI fue de 10°C a 95°C y la cinética de desnaturalización se siguió a 222 nm. Se utilizaron como controles PFEI silvestre y la variante termoestable PFEI-HJ cuyos valores de T_m fueron publicados por Jochens, et al. (Jochens et al, Protein. Eng. Des. Sel., 23(12): 903-909, 2010). Una vez obtenido el espectro de desnaturalización, se calculó la derivada de los datos para obtener el valor de T_m de cada proteína.

- Debido a que la T_m de PFEI-34 fue superior a la temperatura máxima que puede generar el equipo utilizado (95°C), fue necesario calcular la T_m en presencia del caotrope cloruro de guanidina 62,5 mM. Nuevamente se obtuvieron los espectros de absorción entre 190 nm y 250 nm así como el espectro de desnaturalización entre 10°C y 95°C seguido a 222 nm y se calculó la derivada de los datos para obtener el valor de T_m de cada variante en presencia de cloruro guanidina 62,5 mM.

Ensayos de inactivación térmica

- Se incubaron soluciones de PFEI y sus variantes con 0,15 unidades internacionales (UI) (aproximadamente) de actividad de hidrólisis de éster *p*-nitrofenil acetato en tampón fosfato 50 mM pH 7,5 a diferentes temperaturas. Las condiciones óptimas de reacción se obtuvieron a una temperatura de 65°C, a la cual, a intervalos regulares de tiempo, se tomaron muestras de 10 µl de solución por triplicado y se determinó la actividad hidrolítica remanente frente a *p*-nitrofenil acetato utilizando el ensayo descrito anteriormente.

Ensayos de inactivación por codisolventes orgánicos

- Se incubaron soluciones de PFEI y sus variantes con 0,15 UI (aproximadamente) de actividad de hidrólisis del éster *p*-nitrofenil acetato en tampón fosfato 50 mM pH 7,5 suplementado con NaCl 10 mM, a diferentes temperaturas y concentraciones de codisolvente tales como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y tetrahidrofurano (THF). La temperatura de reacción elegida fue de 42°C, a la que, a intervalos regulares de tiempo, se tomaron muestras de 10 µl de solución por triplicado y se determinó la actividad hidrolítica remanente frente a la hidrólisis del éster *p*-nitrofenil acetato utilizando el ensayo descrito anteriormente. La concentración final de los disolventes empleados fue del 40% para DMS y DMF y del 15% para el caso de THF.

Manipulación de secuencias

- El ensamblado, alineamiento, y traducción de secuencias génicas, se realizó utilizando el programa Vector NTI 10 (Invitrogen) y el servidor ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>).

Modelado molecular

- Los modelos estructurales de las variantes de PFEI fueron creados a partir de la estructura de PFEI (PDB: 1VA4) reemplazando los aminoácidos correspondientes y minimizando la energía en vacío utilizando el campo de fuerza NOVA (Krieger E. et al., Proteins: Struct. Funct. Bioinf., 57: 678-683, 2002). Las imágenes fueron generadas utilizando PyMol v 0.99 (Delano Scientific).

- La predicción del efecto de mutaciones seleccionadas sobre la estabilidad térmica de las proteínas de interés se realizó mediante análisis del factor B de los diferentes residuos utilizando para ello el programa B-fitter (Reetz M.T., et al., Angew. Chem.Int. Ed. Engl., 36: 2830-2832, 1997).

EJEMPLO 1

Selección de variantes termoestables de PFEI

La genoteca de PFEI fue generada por epPCR. La mutagénesis esperada se logró con la reacción y programa de amplificación en termociclador que se detallan en la sección de Materiales y Métodos. Antes de proceder a ligar todo el producto de epPCR con el vector respectivo, se realizó un análisis previo de clones para conocer la tasa de error, que fue del 0,8% sobre la secuencia de ADN y del 1,8% sobre la traducción de las secuencias a proteína. Además, se evaluó por medio de ensayo de “overlay” el porcentaje de clones activos en *E. coli*, el cual fue del 12% (Figura 1A). Con estos datos se procedió a producir la genoteca final, la cual fue de 90,000 clones. Se purificó el ADN plasmídico total y se utilizó en la selección de mutantes termoestables en *T. thermophilus* HB27.

Antes de realizar los ensayos de selección en busca de mutantes termoestables en la genoteca de PFEI, se establecieron las condiciones de selección. Para ello, se transformaron por competencia natural 600 µl de un cultivo de *T. thermophilus* HB27 silvestre en fase exponencial ($DO_{550} = 0,4$) con 0,2 µg del plásmido pNCK-PFEI, tal como se ha indicado previamente. Tras 4 horas de expresión de la resistencia a kanamicina, se sembraron 250 µl de bacterias en placas con diferentes concentraciones de kanamicina y se incubaron a 3 temperaturas diferentes durante 48 horas. Después de realizar varios ensayos de selección se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4

Número de transformantes de *T. thermophilus* con la construcción pNCK-PFEI, tras realizar una selección en diferentes condiciones de antibiótico y temperatura

Temperatura [°C]	[Kanamicina] (µg/ml)					
	20	40	60	80	100	150
60°C	2.000	200	100	70	30	10
65°C	100	10	0	0	0	0
70°C	0	0	0	0	0	0

Como se puede observar, se obtuvo un alto número de clones individuales que superaron las condiciones de selección (234 clones). Por el alto número de colonias obtenidas y debido a que *T. thermophilus* HB27 presenta actividad esterasa de fondo fue necesario extraer el plásmido de todas las colonias de *T. thermophilus* HB27 (miniprep de placa) y luego transformar con *E. coli* para hacer una segunda selección en busca de clones con actividad esterasa.

Una vez fijadas las condiciones, se procedió a seleccionar clones de la genoteca pNCK-PFEI, usando como control de selección la construcción pNCK-PFEI silvestre. Los resultados del experimento se muestran en la Tabla 5 escogiendo como criterio de selección 66,5 °C y kanamicina 60 y 80 µg/ml.

Tabla 5

Selección de mutantes de PFEI en *T. thermophilus* a 66,5°C y kanamicina a 60-80 µg/ml

[Kan]	[Kanamicina] (µg/ml)	
	60	80
Silvestre	0 clones	0 clones
Genoteca	157 clones	77 clones

Una vez realizada la transformación en *E. coli*, se realizaron 2 copias de las colonias obtenidas. Una de ellas fue utilizada para realizar un ensayo overlay de actividad esterasa en placa, de tal forma que se pudieran descartar los clones inactivos y continuar el análisis de los que mantuvieran la actividad esterasa. Después de varias rondas de cribado de variantes seleccionadas por termoestabilidad, se encontraron 55 clones que presentaban actividad esterasa (Figura 1B).

EJEMPLO 2

Ensayo de termoestabilidad de los clones aislados

Se extrajo el plásmido de cada clon individual procedente del Ejemplo 1 y se realizó un segundo ensayo de termoestabilidad de cada uno de dichos clones, en particular, en *T. thermophilus* HB27, mediante el ensayo de goteo de diluciones crecientes en las mismas condiciones de selección que se utilizaron para seleccionar clones de la genoteca. Se asignaron los valores desde “1+” si crecía solo en cultivo concentrado hasta “4+” si crecía hasta la dilución 1/1000. En este ensayo se utilizó como control de estabilidad el plásmido pNCK-PFEI silvestre y se realizó en condiciones permisivas (65°C, kanamicina 60 µg/L), tales como las reflejadas en la Figura 2, que permitieron el crecimiento de transformantes que expresaban la fusión silvestre. Dado el elevado número de transformantes recuperados, se realizó una nueva selección en condiciones más restrictivas (68°C y kanamicina 60-80 µg/l) cuyo ensayo de crecimiento también se realizó en condiciones más restrictivas (68°C y kanamicina 60 µg/l) y se refleja en la Figura 3. Como resultado conjunto de ambos ensayos, se escogieron 48 clones que contenían una variante de PFEI aparentemente más termoestable que la enzima silvestre parental. Los plásmidos que contenían los genes codificantes fueron extraídos y secuenciados.

En los resultados de dicha secuenciación (Tabla 6), se obtuvieron 42 secuencias sin ambigüedades. De estas, una (2,3%) correspondía al gen silvestre; 11 clones (26,1%) eran mutantes sencillos, cada uno diferente en cada caso; 12 clones (28,5%) eran mutantes dobles; 11 clones (26,1%) eran mutantes triples; 3 clones (7%) eran mutantes cuádruples; y 5 clones (11,9%) estaban duplicados. Para futuros análisis se descartó el clon silvestre y la mitad de los clones duplicados porque se asumió que ello ocurrió debido al método utilizado para trasladar los plásmidos mutantes de *T. thermophilus* HB27 a *E. coli* (miniprep de placa y no individual de cada clon), quedando un total de 37 clones, de los cuales se purificó la proteína para verificar si hubo un incremento de T_m con respecto a la proteína silvestre. Con aquellos clones especialmente termoestables (4+) se realizaron, además, ensayos de diroismo circular, inactivación por temperatura o disolventes y modelado molecular de las mutaciones encontradas.

Tabla 6

Mutaciones encontradas en los derivados de PFEI seleccionados. La termoestabilidad se seleccionó por crecimiento en goteo

Nombre del clon	Número de mutaciones	Mutaciones	Crecimiento en gota
PFEI-1	2	L186P, T192S	2+
PFEI-2	1	Q134K	2+
PFEI-5	2	L238W, E264G	2+
PFEI-7	2	S2C, L80M	2+
PFEI-9	3	Q39L, I166V, L185Q	4+
PFEI-10	2	T10S, I183V	2+
PFEI-12	3	M1I, F144L, V176E	2+
PFEI-13	3	F94Y, A121S, F228L	2+
PFEI-14	1	K87M	2+
PFEI-15	2	S26C, G232S	2+
PFEI-16	3	T3S, H83L, K240E	2+
PFEI-19	1	K21R	2+
PFEI-20	1	K7I	3+
PFEI-21	3	Q11L, A161T, Q224L	3+
PFEI-22	2	M1V, T192A	2+
PFEI-23	2	S26I, F53L	3+
PFEI-25	4	N68Y, K150E, N160I, G169D	2+
PFEI-26	1	T3S	2+
PFEI-27	1	I156T	2+
PFEI-28	3	Q134R, Q177R, T202S	2+
PFEI-29	3	F144Y, K168M, I183S	2+
PFEI-31	1	A187P	2+
PFEI-32	2	K15R, Q224L	3+
PFEI-34	2	Q11L, A191S	4+
PFEI-35	3	S26C, R112Q, D212V	4+
PFEI-37	3	Q170L, V171I, K248E	2+
PFEI-39	2	D16V, L267M	2+
PFEI-41	2	T192S, E201V	4+
PFEI-42	3	T3I, K168M, Q170P	3+

PFEI-43	1	L186Q	2+
PFEI-45	4	K7I, L24M, P162L, G169A	4+
PFEI-46	1	D212Y	4+
PFEI-47	3	Y38H, F199Y, K248E	2+
PFEI-60	1	Q39L	3+
PFEI-65.3	1	D249E	2+
PFEI-66.16	4	M1K, T3A, D139E, K168R	2+

EJEMPLO 3

Caracterización por dicroísmo circular de los clones aislados

5 La desnaturalización de la variante más termoestable (PFEI-34) se siguió a 222 nm utilizando un espectrofotómetro de dicroísmo circular (Jasco, Groß-Umstadt, Germany). El intervalo de temperatura que se utilizó fue de 10°C a 95°C y la T_m se calculó como el punto de inflexión en las curvas de desnaturalización (o como el máximo en la primera derivada de dichas curvas). Dado que en un primer ensayo con la proteína en solución no se pudo observar claramente la T_m de PFEI-34, en un segundo ensayo se utilizó el caotropro cloruro de guanidinio 62,5 mM para rebajar dicha T_m , como se observa en la Figura 4. La desnaturalización se comparó con la de PFEI silvestre y una variante de PFEI (PFEI-HJ) descrita previamente en la bibliografía como más termoestable (Jochens et al, Protein. Eng. Des. Sel., 23(12): 903-909, 2010).

Realizando la primera derivada de las curvas de desnaturalización, se pueden leer con más precisión los puntos de inflexión correspondientes a T_m , ya que se revelan como máximos de dicha función derivada. A partir de dichos máximos se calcularon las T_m en ausencia y presencia de cloruro de guanidinio (Tabla 7).

Tabla 7

Temperatura de desnaturalización de variantes de PFEI en ausencia y presencia de cloruro de guanidinio 62,5 mM

Variante	T_m (°C)	T_m en presencia de cloruro de guanidinio (°C)
PFEI silvestre	71	71
PFEI-34	>95	76,5
PFEI-HJ	83	70,5

EJEMPLO 4

Ensayos de inactivación térmica de los clones aislados

Las variantes más termoestables fueron sometidas a ensayos de inactivación térmica como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos. De las 5 variantes más termoestables según el ensayo de gota, sólo las variantes PFEI-34 y PFEI-46 demostraron mayor resistencia a la inactivación térmica (Figura 5A). En el caso de mutantes múltiples, como la variante PFEI-34, se segregaron las mutaciones en las variantes PFEI-34.1 (mutación Q11L) y PFEI-34.2 (A191S) y se introdujeron en PFEI silvestre mediante mutagénesis dirigida para estudiar su efecto por separado y obtener conclusiones sobre su interacción (sinérgica o aditiva). Por otra parte, se combinó la mutación hallada en PFEI-46 con las de PFEI-34 para intentar mejorar aún más la termoestabilidad (dando lugar a la variante PFEI-34.3). Los resultados de la inactivación térmica de estas nuevas variantes se pueden observar en la Figura 5B. Las cinéticas de inactivación fueron ajustadas a ecuaciones exponenciales para interpolar el tiempo de vida media que se refleja en la Tabla 8.

Tabla 8

Vida meda de las variantes de PFEI, sometidas a inactivación térmica a 65°C

Variantes PFEI	Vida media (min)
PFEI silvestre	33
PFEI-34	58
PFEI-41	1,6
PFEI-46	45
PFEI-80.3	1
PFEI-60	8
PFEI-34.1	61

PFEI-34.2	98
PFEI-T3	267
PFEI-T3-34	289
PFEI-S7-34	50
PFEI-HJ	42

EJEMPLO 5**Transmisión del carácter termoestable de los clones aislados**

Las mutaciones de PFEI-34 se introdujeron en 2 variantes de PFEI con actividad mejorada hacia ésteres de cadena media y larga (PFEI-S7 y PFEI-T3) y se estudió si mejoraban la estabilidad térmica de dichas variantes (Figura 6). Las cinéticas de inactivación fueron ajustadas a ecuaciones exponenciales para interpolar el tiempo de vida media, el cual se refleja en la Tabla 9; como se puede observar, la transposición de las mutaciones termoestabilizantes de PFEI-34 a otra variante, transmite el carácter termoestabilizante.

Tabla 9

Las mutaciones de PFEI-34 confieren termoestabilidad a otras variantes de PFEI

Variantes PFEI	Vida media (min)
PFEI silvestre	33
PFEI-34	58
PFEI-T3-34	289
PFEI-S7-34	50
PFEI-HJ	42

EJEMPLO 6**Ensayos de inactivación por codisolventes de las variantes de PFEI**

Dada la utilidad biocatalítica de PFEI y la relación entre termoestabilidad de una proteína y estabilidad frente a la desnaturalización por efecto de los codisolventes orgánicos a través de la rigidez introducida en la estructura, se estudió la resistencia de las variantes termoestabilizadas frente a diferentes codisolventes como DMSO, DMF y THF. Las condiciones de reacción son las que se detallan en el apartado de Materiales y Métodos.

La inactivación por dichos codisolventes fue determinada para la proteína silvestre y se comparó con la estabilidad que presentaba en estas condiciones, la variante PFEI-34, la variante termoestable PFEI-HJ (Jochens et al, 2010, citado *supra*), las variantes PFEI-T3, PFEI T3-34 PFEI-S7 y la variante PFEI T3 que además contiene las mutaciones de PFEI-34 (PFEI T3-34).

Como se puede observar en las Figura 7 y en la Tabla 10, que muestra la T_m de algunas de las variantes empleadas en este ensayo, tanto la variante PFEI-34 como la variante PFEI-T3 mejorada (PFEI-T3-34) que incorporó las mutaciones de PFEI-34 fueron más estables que la enzima PFEI silvestre. Sin embargo, el efecto de la introducción de las mutaciones de PFEI-34 no fue igualmente estabilizante para la variante PFEI-S7, aunque en todos los casos superó la estabilidad de la enzima silvestre.

Tabla 10

Estabilidad de variantes de PFEI en disolventes orgánicos

Variantes PFEI	T_m (min)		
	DMSO	DMF	THF
PFEI silvestre	5	10	9
PFEI-34	95	30	700
PFEI-T3-34	95	120	150
PFEI-S7-34	35	26	15
PFEI-HJ	4	15	15

EJEMPLO 7**Caracterización enzimática de las variantes de PFEI**

Se caracterizó bioquímicamente PFEI y la variante más termoestable (PFEI-34) purificada a partir de células de *E. coli*. Para examinar su selectividad de sustrato, se sometieron a ensayo los ésteres *p*-nitrofenil acetato. Los resultados se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11

Parámetros cinéticos de PFEI y variantes de PFEI

variante	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)
PFEI silvestre	0,61	104,05	170,57
PFEI-HJ	0,28	11,09	39,48
PFEI-34	0,42	25,36	60,38
PFEI-34.1	0,13	43,70	336,15
PFEI-34.2	0,17	27,63	156,54
PFEI-S7	0,023	12,27	524,19
PFEI-S7-34	0,05	17,84	339,89
PFEI-T3	0,043	44,66	1038,55
PFEI-T3-34	0,03	14,70	484,46

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 11, la introducción de las mutaciones de PFEI-34 redujo 4 veces k_{cat} , mejorando levemente K_m . Para elucidar si el descenso en alguno de estos parámetros era atribuible a alguno de los dos reemplazos en particular, se determinaron los parámetros cinéticos de las variantes PFEI-34.1 y PFEI-34.2, pudiendo atribuir un mayor descenso en k_{cat} al reemplazo A191S. Por otra parte, la introducción de ambos reemplazos sobre las variantes S7 y T3 mantuvo K_m en el mismo orden de magnitud (10 veces menor que para PFEI silvestre) y tuvo efectos diferentes sobre k_{cat} . Sin embargo, en ambos casos, la constante de especificidad o eficiencia catalítica se mantuvo superior a la del silvestre, aunque a su vez menor que la de las variantes sin termoestabilizar. A la vista de los parámetros y la estabilidad de las variantes PFEI-34 y mutantes segregados, la mutación menos estabilizante es asimismo la que menos afecta a los parámetros cinéticos y viceversa.

EJEMPLO 8

Modelo estructural de PFEI, localización de las mutaciones en la estructura proteica

Una vez evaluada la estabilidad térmica y a solventes de los mutantes de PFEI, se procedió al análisis de la base estructural del incremento de termoestabilidad de la variante de PFEI más termoestable (PFEI-34). Como primer paso se utilizó el programa Yasara para cambiar los residuos de la variante silvestre por los encontrados en el mutante, luego se minimizaron las energías de las estructuras. Una vez obtenidos los modelos, se utilizó el programa PyMol para ver la localización de las mutaciones seleccionadas y compararlas con los residuos de la estructura de PFEI silvestre.

Como se puede observar en la Figura 8, el residuo leucina 11 (L11) presenta las mismas interacciones del residuo silvestre glutamina 11(Q11) con el residuo tirosina 62 (Y62) y no se observan nuevas interacciones con otros residuos de la estructura de PFEI. Si bien en la variante PFEI-34 no se generan nuevas interacciones a las ya existentes en la variante PFEI silvestre, en el modelo de superficie mostrado en la Figura 9, se observa que la mutación Q11L genera una zona hidrofóbica en la superficie de la proteína que no se observa en la PFEI silvestre. Esta nueva zona hidrofóbica en la superficie de la variante PFEI-34, podría favorecer la dimerización de dichas variantes. Por otro lado, en la Figura 10 se observa que en la variante PFEI silvestre el residuo A191 ubicado en una α hélice del lazo $\beta 6$ - $\beta 7$, establece interacciones con los residuos serina 185 (S185) y cisteína 195 (C195) mientras que en la variante PFEI-34, el nuevo residuo serina 191, además de conservar las interacciones con S185 y C195, establece un nuevo puente de hidrógeno con el residuo R56; esta nueva interacción fija el lazo $\beta 6$ - $\beta 7$ lo que podría aumentar la rigidez de esta estructura.

EJEMPLO 9

Análisis de la termoestabilidad a partir del factor B

Las mutaciones termoestabilizantes halladas experimentalmente fueron estudiadas computacionalmente mediante diferentes métodos establecidos. En primer lugar, se utilizó el factor B como medida de la movilidad de los aminoácidos en 1VA4. Este parámetro mide la atenuación en la difracción de los rayos X debida a la agitación térmica de los átomos en la estructura cristalina y ha sido utilizado anteriormente como indicio de aquellos aminoácidos susceptibles de sustitución para termoestabilizar una proteína (Jochens et al, 2010 Protein Eng. Des. And Sel, 23(12): 903-909; Reetz et al., Angew. Chem. Int. Ed., 45(46): 7745-7751, 2006). El programa B-fitter (Reetz et al., Angew. Chem. Int. Ed., 45(46): 7745-7751, 2006) extrae la información de los factores B presente en los archivos .pdb y ordena los residuos de mayor a menor factor B. Dicho programa se aplicó a la estructura de PFEI (PDB: 1VA4) y se seleccionaron los residuos hallados experimentalmente como

5 termoestabilizantes. Como se observa en la Tabla 12, no existió una correlación entre la frecuencia de aparición en las genotecas y el factor B o el orden. Por lo tanto, se podría concluir que el método de termoestabilización aquí utilizado es más general que el método basado en mutar residuos con alto factor B, que por su propia definición, muestra un sesgo hacia residuos más largos y flexibles y estaría cubriendo otro tipo de mecanismos de termoestabilización diferentes de la rigidificación de dichos residuos flexibles, como una estructura interna más compacta, puentes salinos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o puentes disulfuro adicionales o combinaciones de los anteriores e incluso efectos indirectos producidos por mutaciones a distancia.

Tabla 12**Factor B y ordenación de residuos termoestabilizantes hallados experimentalmente**

Residuo Fa	ctor B	Orden	Frecuencia
Thr2	16,9	115	4
Lys6	25,8	15	2
Gln10	20,01	67	2
Ser25	12,53	238	3
Gln38	14,06	198	2
His82	21,9	37	2
Phe93	11,59	254	2
Ala120	14,26	190	2
Gln133	18,49	86	2
Phe143	17,3	103	2
Lys167	32,49	3	3
Gly168	28,62	8	2
Gln169	23,91	23	2
Ile182	12,32	247	2
Leu185	10,5	269	2
Thr191	11,1	265	3
Asp211	24,83	18	2
Phe227	18,69	81	2
Gly231	15,65	149	2
Lys239	28,18	10	2
Lys247	28,3	9	2

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido con actividad esterasa, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y, al menos, una mutación puntual que consiste en la sustitución de un aminoácido presente en dicha secuencia por otro aminoácido, en donde dicha mutación presente en dicha secuencia SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo formado por:
 - (i) una mutación puntual en el aminoácido glutamina (Q) localizado en la posición 11 de SEQ ID NO: 1, en donde dicha glutamina es substituida por el aminoácido Leucina (L) [Q11L],
 - (ii) una mutación puntual en el aminoácido alanina (A) localizado en la posición 191 de SEQ ID NO: 1, en donde dicha alanina es substituida por el aminoácido serina (S) [A191S], y
 - (iii) una mutación puntual en el aminoácido ácido aspártico (D) localizado en la posición 212 de SEQ ID NO: 1, en donde dicho ácido aspártico es substituido por el aminoácido tirosina (Y) [D212Y],
 - (iv) y cualquier combinación de las mismas;
 o una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido es estable a una temperatura comprendida entre 60°C y 95°C.
3. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicho polipéptido tiene una vida media de más de 33 minutos a 65°C.
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho polipéptido tiene una temperatura de desnaturalización (T_m) mayor de 71°C, determinada en ausencia de un agente caotrópico.
5. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho polipéptido tiene una temperatura de desnaturalización (T_m) mayor de 71°C, determinada en presencia de cloruro de guanidinio 62,5 mM como un agente caotrópico.
6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho polipéptido es estable en un disolvente orgánico polar aprótico.
7. Polipéptido según la reivindicación 6, en donde dicho disolvente orgánico polar aprótico se seleccionan de un grupo formado por dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF) y sus combinaciones.
8. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que cataliza la hidrólisis enzimática de un éster carboxílico contenido en un compuesto, o la hidrólisis enzimática de una lactona, o la hidrólisis enzimática de una lactama, o la obtención de un halogenuro orgánico.
9. Una proteína de fusión que comprende:
 - i) un polipéptido A que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y
 - ii) un polipéptido B, en donde dicho polipéptido B es un polipéptido diferente a dicho polipéptido A.
10. Proteína de fusión según la reivindicación 9, en donde dicho polipéptido B es un polipéptido útil para aislar y/o purificar proteínas.
11. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en donde 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, β -galactosidasa y VSV-glicoproteína.
12. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.
13. Una construcción génica que comprende un polinucleótido según la reivindicación 12.
14. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 12 o una construcción génica según la reivindicación 13.

15. Vector según la reivindicación 14 en el que dicho vector es un vector de expresión.
16. Un organismo que comprende un polinucleótido según la reivindicación 12, una construcción génica según la reivindicación 13, o un vector según la reivindicación 14 ó 15.
17. Organismo según la reivindicación 16, en el que dicho organismo es un organismo mesófilo.
18. Organismo según la reivindicación 17, en el que dicho organismo es una bacteria mesófila.
19. Un procedimiento para obtener un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que comprende cultivar un organismo según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido o proteína de fusión y si se desea, recuperar dicho polipéptido o proteína de fusión.
20. Un método para hidrolizar enzimáticamente un éster carboxílico presente en un compuesto que comprende poner en contacto dicho compuesto que contiene un éster carboxílico con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o con una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, bajo condiciones adecuadas para la hidrólisis de dicho éster carboxílico.
21. Método según la reivindicación 20, en el que dicho compuesto que tiene un grupo éster carboxílico es un compuesto de fórmula (I)



(I)

donde

R^1 y R^2 , independientemente entre sí, representan un radical de un compuesto orgánico que contiene al menos 1 átomo de carbono.

22. Método según la reivindicación 20, en el que dicho compuesto que tiene un grupo éster carboxílico es un acilglicerol de cadena corta.
23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en el que la hidrólisis enzimática se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 20°C y 95°C, opcionalmente en presencia de un agente caotrópico, y/o de un disolvente orgánico polar aprótico.
24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en el que la hidrólisis enzimática se lleva a cabo en presencia de peróxido de hidrógeno.
25. Un método para hidrolizar enzimáticamente una lactona que comprende poner en contacto dicha lactona con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o con una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, bajo condiciones adecuadas para la hidrólisis de dicha lactona.
26. Método según la reivindicación 25, en el que la hidrólisis enzimática se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 20°C y 95°C, opcionalmente en presencia de un agente caotrópico, y/o de un disolvente orgánico polar aprótico.
27. Un método para hidrolizar enzimáticamente una lactama que comprende poner en contacto dicha lactama con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o con una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, bajo condiciones adecuadas para la hidrólisis de dicha lactama.
28. Método según la reivindicación 27, en el que la hidrólisis enzimática se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 20°C y 95°C, opcionalmente en presencia de un agente caotrópico, y/o de un disolvente orgánico polar aprótico.
29. Un método para obtener enzimáticamente un halogenuro orgánico que comprende poner en contacto un compuesto orgánico con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o con una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en presencia de un haluro y de

peróxido de hidrógeno, o una fuente de peróxido, en un medio que comprende protones, bajo condiciones adecuadas para la producción de dicho halogenuro orgánico.

5

30. Método según la reivindicación 29, en el que dicha reacción enzimática se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 20°C y 95°C, opcionalmente en presencia de un agente caotrópico, y/o de un disolvente orgánico polar aprótico.

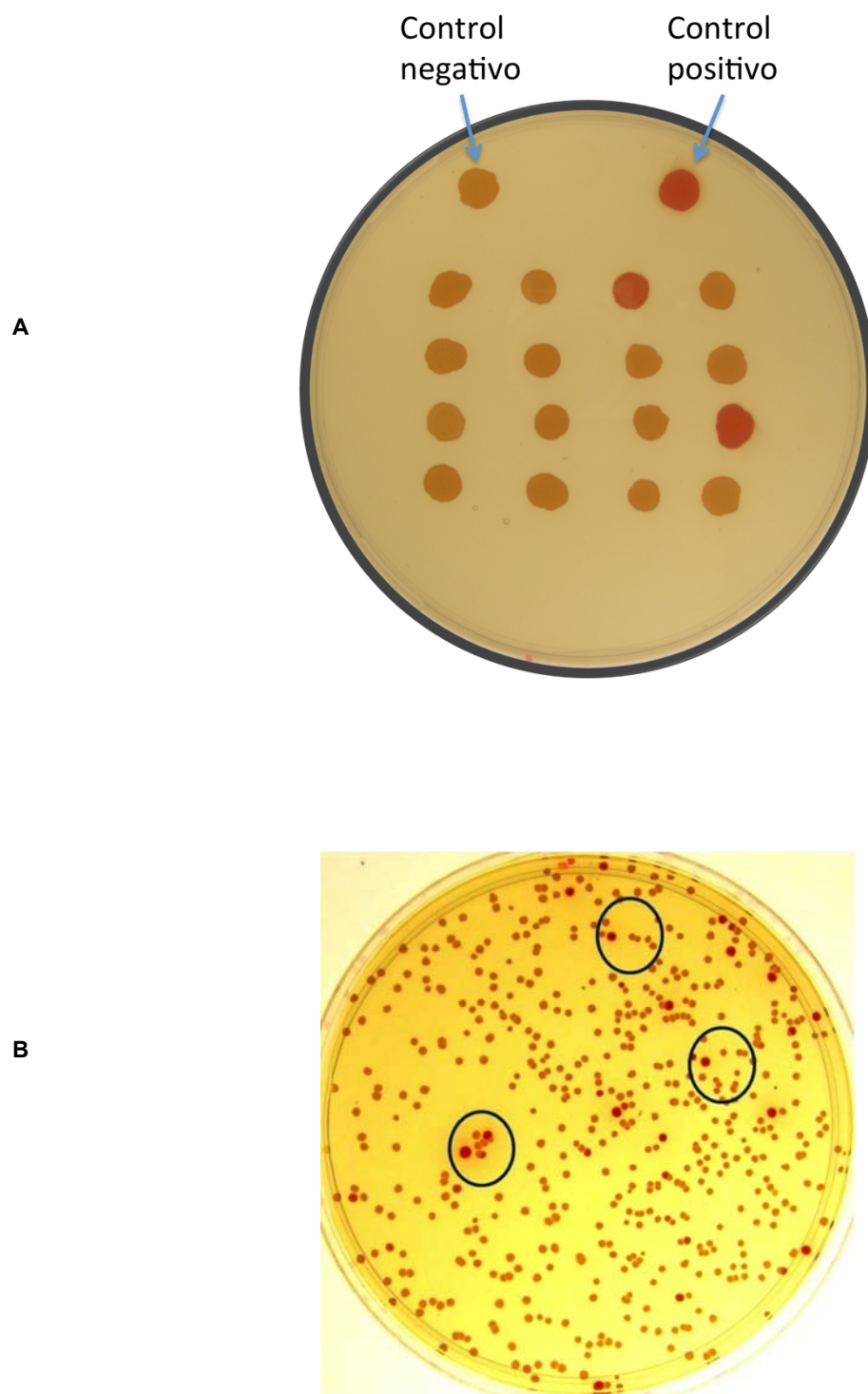


FIG. 1

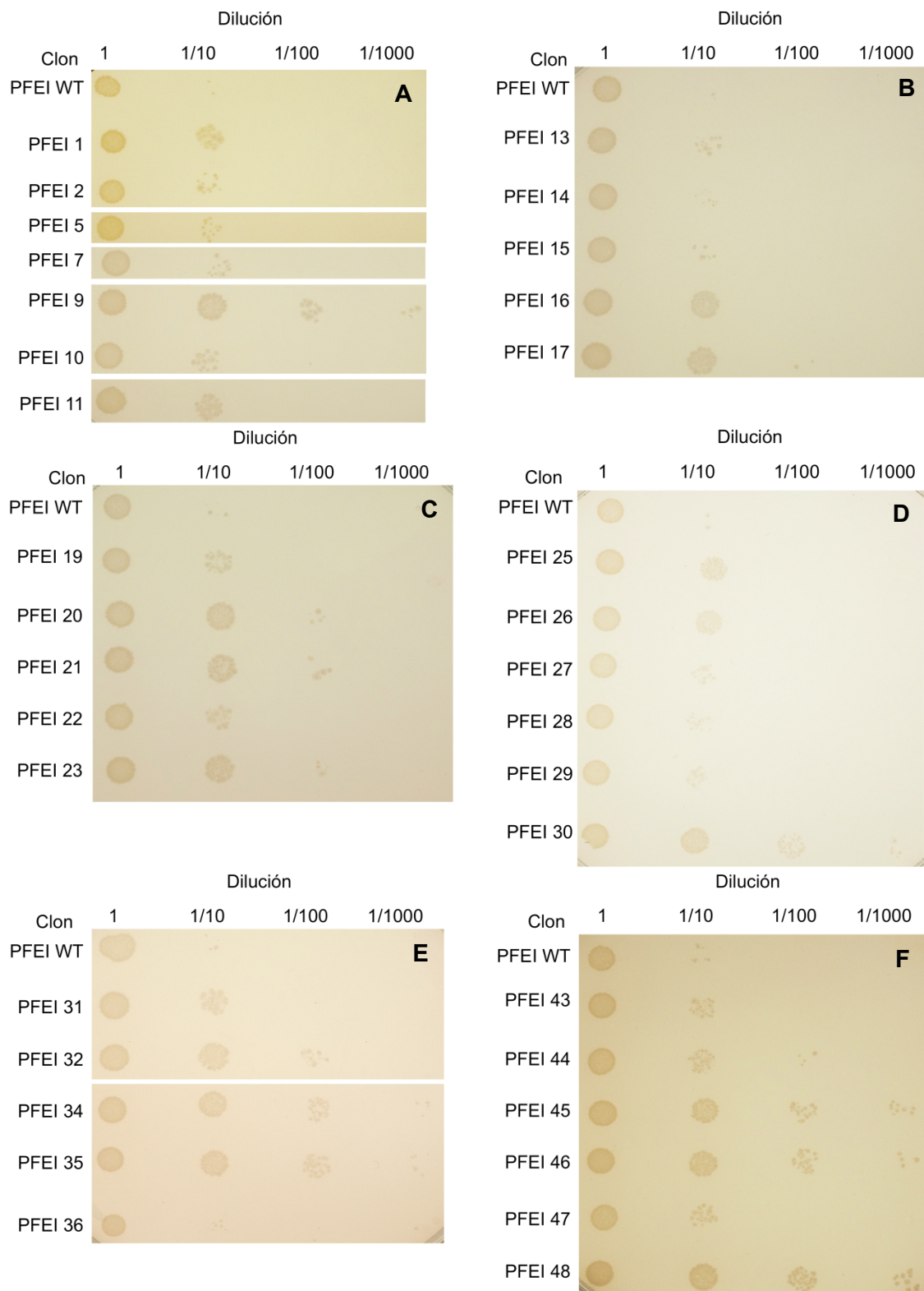


FIG. 2

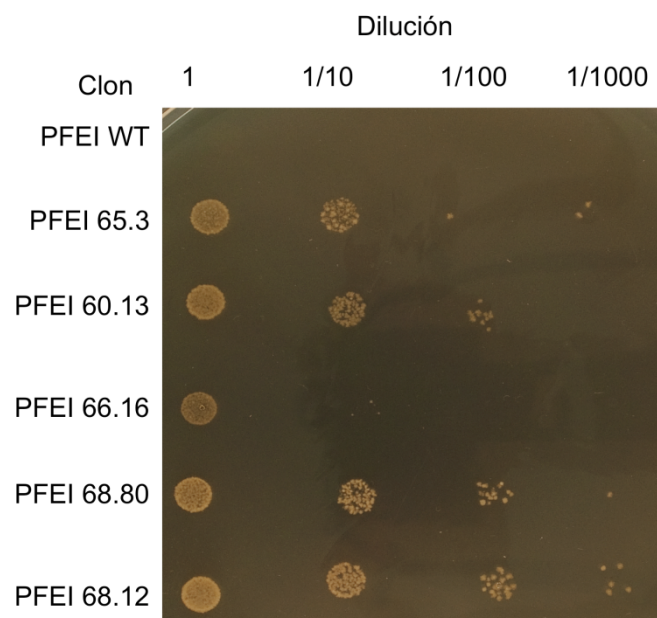
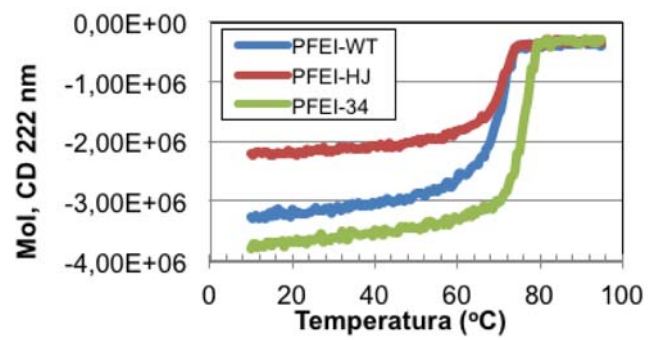


FIG. 3

A



B

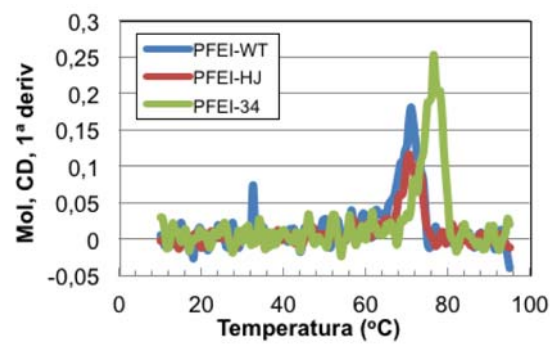
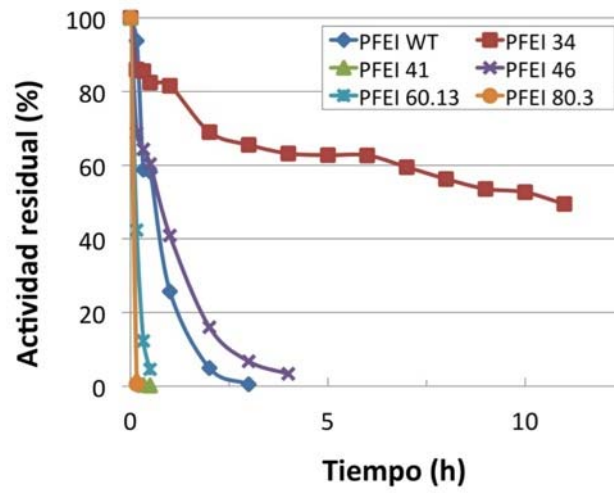


FIG. 4

A



B

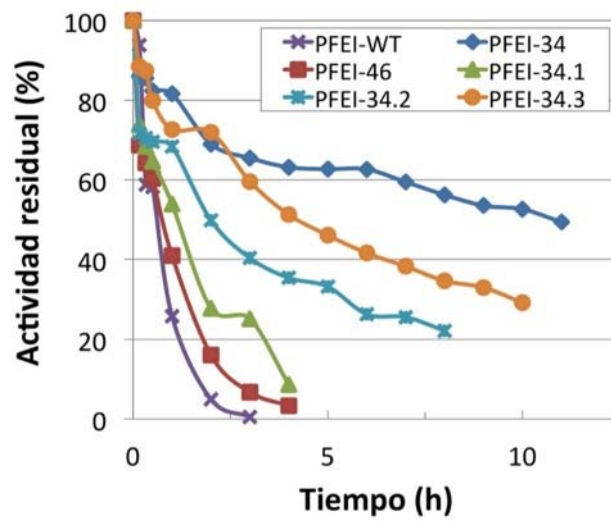


FIG. 5

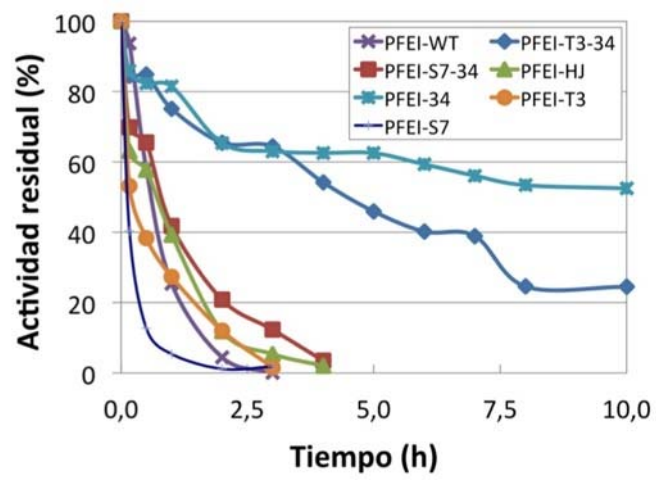
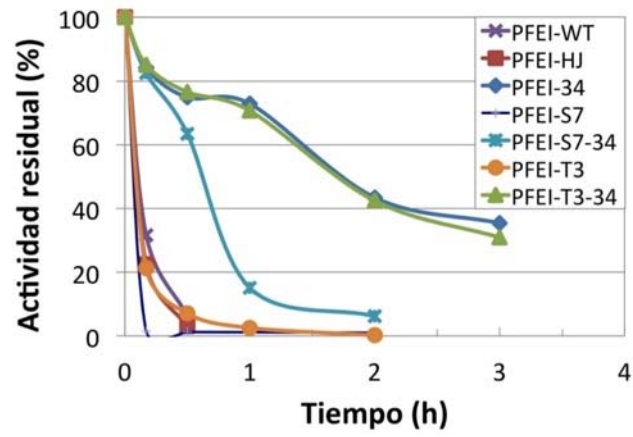


FIG. 6

A



B

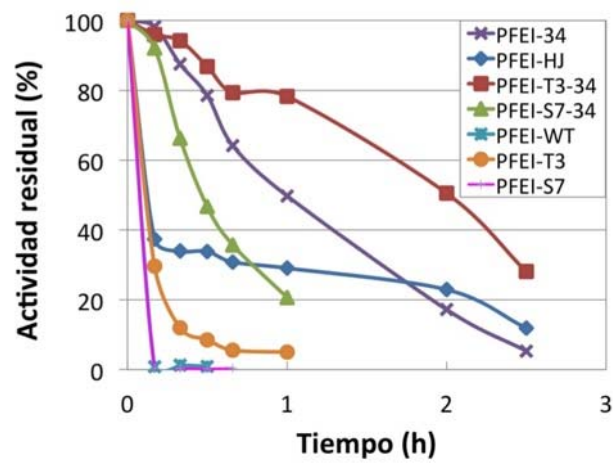


FIG. 7

C

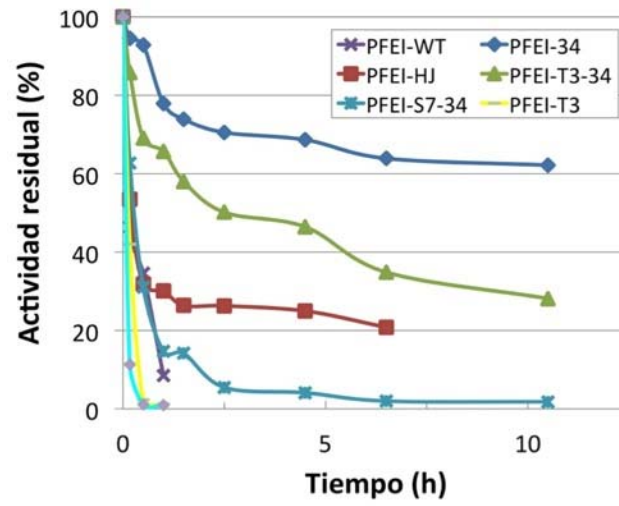


FIG. 7 (cont.)

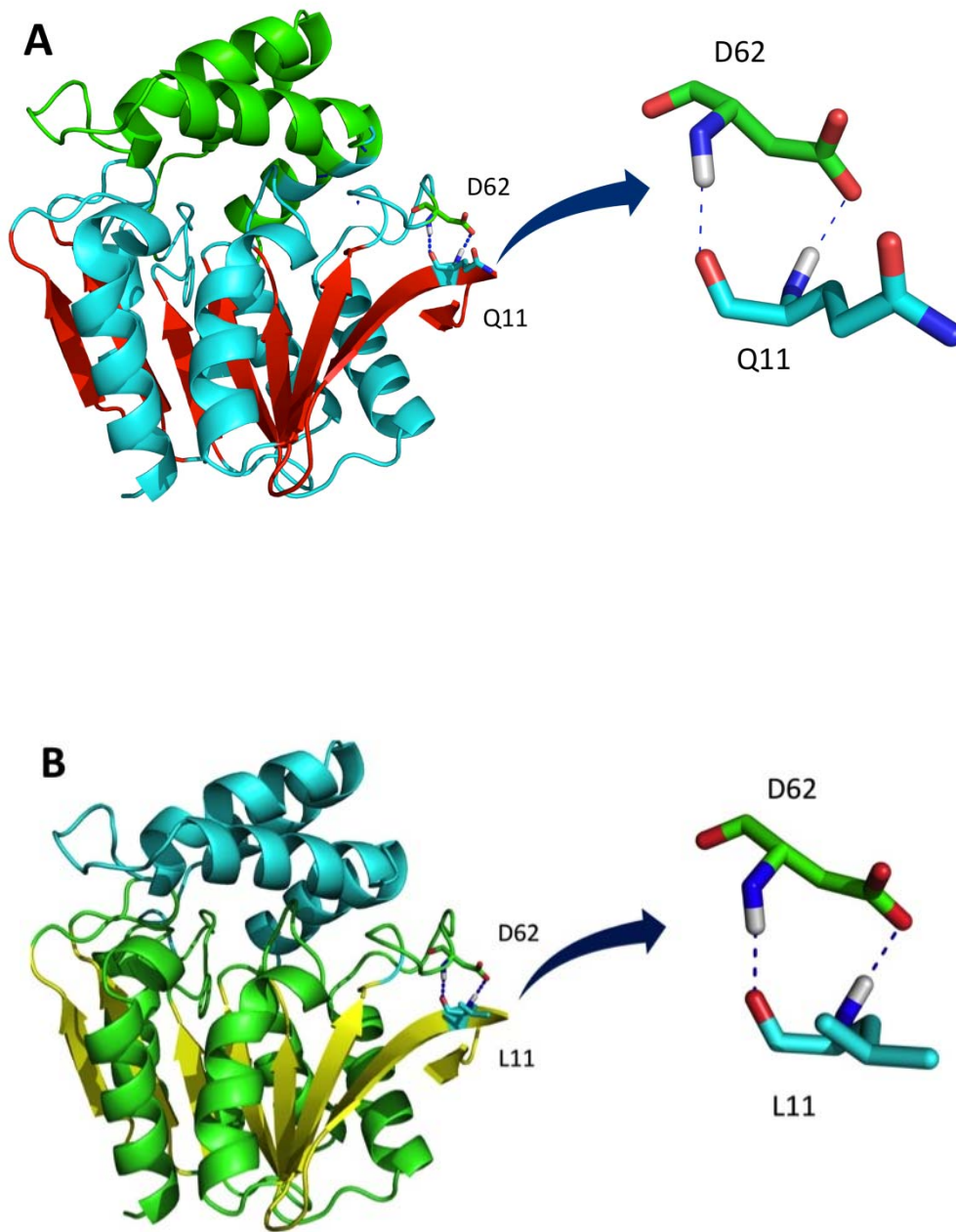


FIG. 8

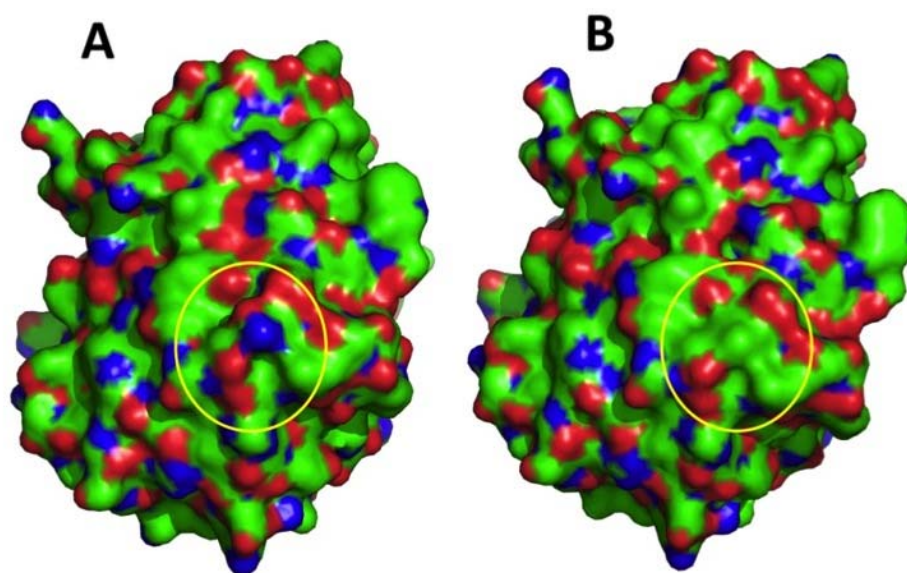


FIG. 9

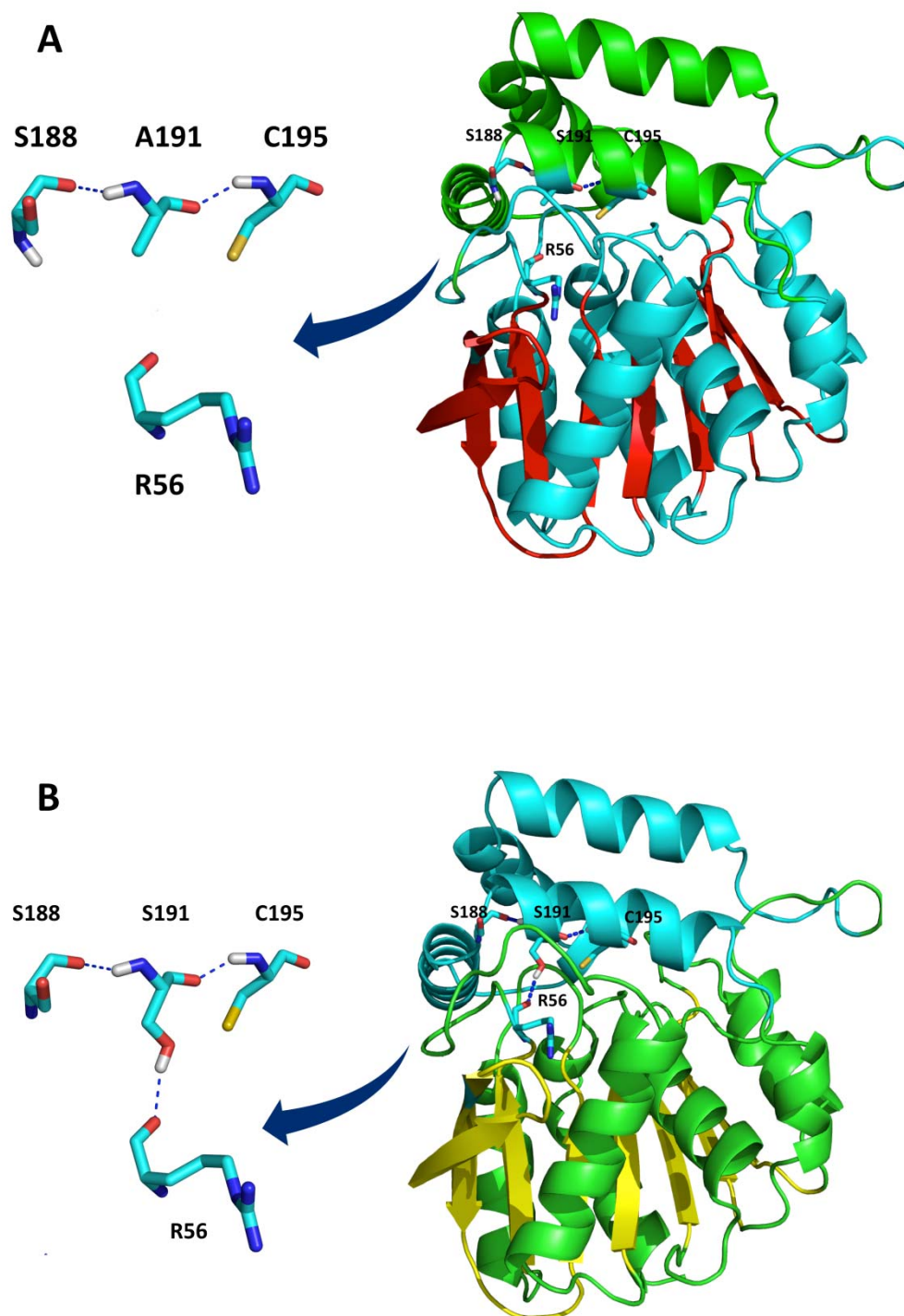


FIG. 10