

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 491**

21 Número de solicitud: 201231749

51 Int. Cl.:

C12N 9/90 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

13.11.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.05.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (100.0%)

Ciudad Universitaria de Cantoblanco,

7 #9]bghV]bž3

28049 Madrid ES

72 Inventor/es:

CAVA VALENCIANO, Felipe

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Uso de la racemasa BsrV para la racemización de aminoácidos**

57 Resumen:

Uso de la racemasa BsrV para la racemización de aminoácidos.

La presente invención se refiere al uso de la racemasa BsrV, la cual se puede obtener de *Vibrio cholerae*, para la racemización de aminoácidos y por tanto para la obtención de D-aminoácidos a partir de L-aminoácidos y de L-aminoácidos a partir de D-aminoácidos. Además la presente invención se refiere a un método de racemización de aminoácidos y de síntesis de muropéptidos.

ES 2 460 491 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de la racemasa BsrV para la racemización de aminoácidos.

5 La presente invención se refiere al uso de la racemasa BsrV para la obtención de D-aminoácidos a partir de L-aminoácidos o bien de L-aminoácidos a partir de D-aminoácidos mediante su racemización. La presente invención también se refiere a un método de racemización de aminoácidos así como de síntesis de muropéptidos a partir de otros muropéptidos. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la biotecnología.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

En todos los seres vivos, los aminoácidos predominantes son los L-enantiómeros. Sin embargo, algunas bacterias son capaces de producir D-aminoácidos no canónicos (NCDAA)- así llamados por ser distintos a los encontrados (D-Alanina y D-Glutámico) de forma habitual en el peptidoglicano (PG) y liberarlos al ambiente extracelular en concentraciones milimolares.

15 Uno de los papeles de los aminoácidos NCDAA parece ser influenciar la composición, y fuerza del PG en bacterias, de forma que estas bacterias se puedan adaptar a los cambios en el entorno.

20 No obstante, el papel de los NCDAA en el medio extracelular no queda restringido al PG, sino que además estos aminoácidos intervienen en procesos como; la inhibición de la germinación de esporas en las especies del género *Bacillus* (Atluri *et al. J. Bacteriol.* 2006, 188(1): 28-36) y la dispersión del biofilm en comunidades bacterianas para pasar a una vida plactónica cuando escasean los nutrientes (Kolodkin *et al. Science.* 2010, 328(5978): 627-629).

25 Dada la utilidad de los D-aminoácidos por ejemplo en terapia antimicrobiana (como sustratos para la síntesis de antibióticos, inhibidores de la germinación, compuestos anti-biofilm) resulta interesante su obtención a nivel industrial de forma que se obtenga un producto barato. Por ejemplo, se pueden obtener D-aminoácidos a partir de L-aminoácidos los cuales son abundantes en la naturaleza. Esta opción se ha explorado mediante el uso de catalizadores químicos como el piridoxal fosfato (Toth *et al. J Am Chem Soc.* 2007, 129:3013-3021) o el ácido salicílico (Gong *et al. Inorg Chem.* 2010, 49:7692-7699). Sin embargo la producción a través de catalizadores químicos resulta costosa y presenta un bajo rendimiento lo que hace que el producto final tenga un alto costo y por tanto la obtención de estos D-aminoácidos y posterior utilización resulte cara.

35 Por tanto resulta necesaria la búsqueda de otras formas de obtener estos aminoácidos de manera que se puedan evitar estas limitaciones y acelerando el proceso de obtención de D-aminoácidos. Un ejemplo puede ser la obtención de D-aminoácidos a partir de L-aminoácidos mediante el uso de biocatalizadores enzimáticos apropiados: las racemasas de aminoácido. Sin embargo, el principal inconveniente que presenta este procedimiento es que las racemasas de aminoácido actualmente descritas presentan especificidad por un único sustrato por lo que se necesitaría una enzima para cada aminoácido que se quiera producir. Esta opción es, sin embargo, por el momento inviable ya que no se conocen aun suficientes tipos de racemasas mono-específicas como para, combinadas, llevar a cabo este proceso. .

40 Por tanto sigue resultando necesaria la búsqueda de elementos que permitan la obtención de D-aminoácidos a partir de L-aminoácidos de forma sencilla, y que además presenten multiespecificidad de forma que de una mezcla compleja de L-aminoácidos se obtengan diversos D-aminoácidos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

50 La presente invención se refiere al uso de la enzima BsrV (*Broad spectrum racemase in Vibrio*, o racemasa de *Vibrio* de amplio espectro), para la racemización de diferentes aminoácidos.

55 En la presente invención se demuestra como la enzima BsrV de *Vibrio cholerae* es una enzima multiespecífica, la cual presenta la capacidad de transformar algunos L-aminoácidos o D-aminoácidos puros tanto naturales como no-naturales en mezclas de D-aminoácidos y L-aminoácidos hasta alcanzar un equilibrio sin la necesidad de un aporte exógeno de energía. De esta forma se demuestra la capacidad de la enzima para racemizar estos aminoácidos. Sin embargo esta capacidad se encuentra limitada a ciertos aminoácidos ya que tal y como se demuestra en los ejemplos, esta enzima no puede racemizar algunos aminoácidos naturales como Prolina, Ácido glutámico, Ácido aspártico, Fenilalanina, Tirosina, Treonina o Triptófano. Sin embargo, en la presente invención se demuestra como BsrV presenta capacidad de racemizar aminoácidos aminoácidos básicos como son por ejemplo Histidina, Lisina, Asparagina, Glutamina, Arginina, Ornitina, y Ácido 2,4-diaminobutírico. Además se demuestra que BsrV permite racemizar otros aminoácidos tanto naturales como no naturales como por ejemplo Alanina, Cisteína, Serina, β -cloroalanina, Norleucina, Fenilglicina, Homoserina, y N-acetil-lisina metil éster.

Dado que cada uno de los enantiómeros presenta diferentes utilidades, resulta particularmente útil la capacidad que tiene BsrV de racemizar aminoácidos en los dos sentidos y de este modo promover la formación o la eliminación de uno u otro enantiómero. Igualmente resulta interesante la capacidad de la enzima para alcanzar el equilibrio de reacción partiendo de cantidades puras de uno de los enantiómeros o bien de alcanzar un equilibrio a partir de mezclas con diferentes cantidades de cada uno de los enantiómeros. El punto de equilibrio se alcanza dejando evolucionar la reacción. Sin embargo puntos cercanos al equilibrio se alcanzan rápidamente y varían en función del tiempo que se deje evolucionar la reacción. Además la enzima presenta la capacidad de racemizar diferentes aminoácidos presentes en mezclas racémicas o enantioméricas impuras de los mismos, las cuales son mezclas de aminoácidos fáciles y baratas de obtener.

Por todo ello un primer aspecto de la invención se refiere al uso de de la enzima BsrV, de ahora en adelante enzima o péptido de la invención, como reactivo para la racemización de al menos un aminoácido seleccionado de la lista que comprende Alanina, Arginina, Asparagina, Cisteína, Glutamina, Histidina, Lisina, Serina, Ornitina, β -cloroalanina, 2,4-diaminobutírico, Norleucina, Fenilglicina, Homoserina, y N-acetil-lisina metil éster. En una realización preferida el aminoácido es un aminoácido básico.

Se entiende por "BsrV" (*Broad spectrum racemase in Vibrio*, o racemasa de *Vibrio* de amplio espectro) o "enzima BsrV" en la presente invención a la proteína codificada por el locus *vc1312* de *Vibrio cholerae* N16961 y que presenta la secuencia amino acidica SEQ ID NO:1. De igual forma que ocurre con muchas de las proteínas descritas, como por ejemplo entre proteínas homólogas en diferentes organismos, BsrV podría tener alterado algún residuo amino acidico con respecto a SEQ ID NO:1 sin que se produjera una alteración sustancial en la proteína. Esto significa que esta alteración no sería determinante en el polipéptido ni para su estructura ni para su actividad. La enzima BsrV puede presentar variantes. Estas variantes se refieren a variaciones limitadas en la secuencia amino acidica, que permiten el mantenimiento de la funcionalidad de la enzima. Esto quiere decir que la secuencia de referencia y la secuencia de la variante son similares en conjunto, e idénticas en muchas regiones. Estas variaciones se generan por sustituciones, deleciones o adiciones. Dichas sustituciones se dan entre aminoácidos que presentan similares características como por ejemplo en cuanto a polaridad, tamaño o carga, e incluyen, aunque sin limitarse, sustituciones entre ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp), entre Lisina (Lys) y Arginina (Arg), entre asparagina (Asn) y glutamina (Gln), entre serina (Ser) y treonina (Thr), y entre los aminoácidos que componen el grupo alanina (Ala), leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Ile). Las variaciones pueden ser variaciones existentes en la naturaleza como por ejemplo variaciones alélicas, o generadas artificialmente como por ejemplo mediante mutagénesis o síntesis directa. Estas variaciones no provocan modificaciones esenciales en las características o propiedades esenciales del polipéptido, por lo que dichas variantes mantienen su actividad biológica. Todos estos péptidos pueden ser péptidos presentes en la naturaleza o bien ser producidos de forma artificial como por ejemplo, aunque sin limitarse, de forma recombinante, de forma sintética, o mediante la combinación de estos 2 métodos.

Se entiende por "aminoácido no canónico" o "NCDAA" en la presente invención, a aquellos aminoácidos distintos de alanina y ácido glutámico, por formar parte del PG de todas las bacterias conocidas.

Se entiende por "racemización" en la presente invención el proceso por el cual un isómero óptico de aminoácido se transforma en su opuesto óptico o enantiómero. En la presente invención se entiende por racemización la transformación de un aminoácido de enantiómero L a D o de D a L. Por todo ello en una realización preferida de este aspecto de la invención el aminoácido que se racemiza es el enantiómero L. En otra realización preferida el aminoácido que se racemiza es el enantiómero D.

Como se demuestra en los ejemplos de la invención, el punto de equilibrio varía entre los diferentes aminoácidos de forma que a partir de mezclas racémicas se pueden producir los diferentes aminoácidos. Esta mezclas racémicas son baratas y fácilmente obtenibles por lo que resultan uno de los sustratos de partida para la racemización más interesantes. Además se puede acoplar a la racemización de aminoácidos un sistema que elimine o consuma alguno de los enantiómeros D ó L de los aminoácidos de forma que se desplace el equilibrio y por tanto la racemasa actúe sobre el enantiómero restante racemizándolo para restaurar el equilibrio. La racemización también se puede dar a partir de cualquier proporción de enantiómeros D y L, dado que la enzima provocará que se alcance el equilibrio racemizando los aminoácidos correspondientes. Por todo ello, en una realización preferida del primer aspecto de la invención la racemización se hace a partir de una mezcla racémica o enantiomérica. En otra realización preferida la racemización se produce a partir de composiciones que comprenden únicamente uno de los enantiómeros.

Se entiende por "mezcla racémica" o "mezcla enantiomérica" en la presente invención cualquier mezcla que comprenda tanto enantiómeros D como L en cualquier proporción.

Por otro lado, cabe indicar que dada la multiespecificidad de la enzima, se puede partir bien de un único aminoácido el cual sea posible racemizar por la enzima o bien de mezclas complejas de aminoácidos (es decir mezclas de más de un aminoácido racemizable por la enzima) de forma que se obtengan diferentes aminoácidos. De esta forma, por ejemplo, se puede partir de una mezcla compleja de L-aminoácidos o D- aminoácidos o incluso de L y D-aminoácidos, la cual mediante BsrV será trasformada para dar lugar a una mezcla donde los aminoácidos presentes

alcanzarán el equilibrio correspondiente entre los enantiómeros D y L, y por tanto se podrán obtener por ejemplo los D-aminoácidos o los L-aminoácidos en función del interés de cada caso. Por todo ello en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la racemización se hace a partir de una mezcla de aminoácidos.

5 El uso de BsrV presenta su mayor aplicabilidad en procesos de laboratorio y fundamentalmente en procesos industriales, ya que su capacidad de racemizar se puede acoplar a otros sistemas que permitan el consumo del enantiómero de interés y por tanto se seguirá produciendo dicho enantiómero. Dado que los procesos industriales requieren de una enzima con elevada actividad y estabilidad, esta enzima se puede encontrar por ejemplo
10 inmovilizada de forma que se encuentre más protegida sin producir un perjuicio en el acceso a los sustratos. De esta forma se asegura una mayor estabilidad de la enzima así como una mayor facilidad de manejo de la misma. Todo esto conlleva además una menor necesidad de recambio de la misma enzima en el proceso industrial ya que puede ser reutilizada en varias ocasiones sin que se produzca una disminución considerable en su actividad. Esta inmovilización de la enzima se puede producir por ejemplo, aunque sin limitarse, mediante retención física (atrapamiento o inclusión en membranas), o por unión química (adsorción, unión covalente o reticulado), y en
15 diferentes soportes conocidos en el estado de la técnica tales como los soportes porosos glioxil-agarosa, Agarosa activada con bromocianógeno, soportes activados con glutaraldehído, grupos aminos primarios (Sepabeads-EA), epóxido (EC-EP), epóxido y grupos amino (Sepabeads EC-HFA). Por todo ello, en otra realización preferida de este aspecto de la invención la enzima BsrV se encuentra inmovilizada.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de racemización de aminoácidos que comprende poner en contacto al menos un aminoácido seleccionado de la lista de la lista que comprende Alanina, Arginina, Asparagina, Cisteína, Glutamina, Histidina, Lisina, Serina, Ornitina, β -cloroalanina, 2,4-diaminobutírico, Norleucina, Fenilglicina, Homoserina, y N-acetil-lisina metil éster con la enzima BsrV. En una realización preferida de este aspecto de la invención el aminoácido se encuentra en forma de mezcla racémica o enantiomérica. En otra realización preferida
25 de este aspecto de la invención el aminoácido se encuentra en una forma enantiomérica pura. En otra realización preferida el aminoácido se encuentra incluido mezcla de aminoácidos. En otra realización preferida la enzima se encuentra aislada.

30 Como se demuestra en los ejemplos de la invención la enzima BsrV presenta utilidad para la producción de muropéptidos. Para la síntesis de los muropéptidos es necesaria la obtención del aminoácido en su forma D, para posteriormente ser incorporado al muropéptido mediante la ligasa o la transpeptidasa. El enantiómero L no podría ser incorporado para la obtención del muropéptido. Por tanto la enzima BsrV se puede encontrar acoplada a una transpeptidasa o una ligasa como se demuestra en los ejemplos para dar lugar a la síntesis de muropéptidos (subunidades del PG). De esta forma se puede conseguir a partir de un aminoácido L presente en una mezcla
35 racémica o enantiomérica, o bien en forma pura, y racemizable por BsrV y un muropéptido la obtención de otros muropéptidos tanto canónicos (incorporación de D-Alanina en un muropéptido no canónico) como no canónicos (incorporación de un D-aminoácido diferente a la D-Alanina en un muropéptido canónico).

Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere a un método de producción de muropéptidos que comprende:
40 a) Poner en contacto al menos un L-aminoácido seleccionado de la lista que comprende Alanina, Arginina, Asparagina, Cisteína, Glutamina, Histidina, Lisina, Serina, Ornitina, β -cloroalanina, 2,4-diaminobutírico, Norleucina, Fenilglicina, Homoserina, y N-acetil-lisina metil éster con la enzima BsrV para racemizar el aminoácido a su forma D, y
b) poner en contacto el D-aminoácido obtenido en (a) con un muropéptido y al menos una L, D
45 transpeptidasa y/o al menos una ligasa.

En una realización preferida, el aminoácido del paso (a) es un aminoácido básico.

50 Se entiende por "muropéptido" en la presente invención a cada una de las unidades estructurales que constituyen el PG (disacárido N-acetil glutacosamina-N-acetil murámico unido a una cadena peptídica de longitud y composición variable. Estos muropéptidos pueden estar entrecruzados, acetilados, amidados y deshidratados (terminales de cadena o anhidro-muropéptidos).

55 Se entiende por "L-D transpeptidasa" en la presente invención, aquella transpeptidasa que presenta la capacidad de formar un enlace peptídico L-D bien entrecruzando muropéptidos a través del meso-diaminopimelato o bien intercambiando el amino ácido C-terminal (posición 4) en un tetrapéptido.

Se entiende por "muropéptido no canónico" en la presente invención al muropéptido que comprende al menos un
60 NCDAA.

En una realización preferida de este aspecto de la invención el aminoácido del paso (a) se encuentra en forma de mezcla racémica o mezcla enantiomérica. En otra realización preferida el aminoácido de partida se encuentra en una forma enantiomérica pura. En otra realización preferida el aminoácido del paso a se encuentra en una mezcla compleja de aminoácidos. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la L,D-transpeptidasa del

paso (b) es LdtA (codificada por el locus *vc1268* de *V. cholerae* N16961) o cualquiera de sus ortólogos L,D-transpeptidasas en otras bacterias. En una realización aun más preferida la enzima LdtA carece de dominio transmembrana por lo que puede ser empleada en mezclas de reacción enzimáticas libres de detergentes. En otra realización preferida la ligasa del paso (b) es Vc-Ddl (codificada por el locus *vca0572* de *V. cholerae* N16961) y/o Vc-MurF (codificada por el locus *vc2405* de *V. cholerae* N16961) o cualquiera de sus ortólogos Ddl/MurF en otras bacterias. En otra realización preferida cualquiera de las enzimas BsrV, y/o L,D transpeptidasa y/o ligasa se encuentran aisladas.

Según se observa en los ejemplos mediante el sistema descrito se obtienen por ejemplo los muropéptidos muro3-X y muro4-X. Por todo ello en una realización preferida de este aspecto de la invención, el muropéptido que se produce es muro3-X o muro4-X donde X es cualquier aminoácido en su forma D distinto de la D-Alanina. En una realización más preferida X es cualquier aminoácido básico en su forma D. En una realización aun más preferida X es Arginina.

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

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. En la figura se muestra una representación esquemática de la metodología realizada mediante racemización y posterior derivatización con el reactivo de Marfey (FDAA).

Figura 2. En la figura se muestra el resultado del análisis cuantitativo por HPLC frente a patrones de los distintos aminoácidos en sus configuraciones L y D, obteniendo el porcentaje de producción de D-aminoácidos. A) porcentaje de racemización de BsrV para cada aminoácido (t=90min). B) representación grafica del espectro de aminoácidos racemizables por BsrV. C) porcentaje de racemización de BsrV para diversos aminoácidos no naturales.

Figura 3. En la figura se muestra el resultado del análisis cuantitativo por HPLC frente a patrones de los distintos aminoácidos en sus configuraciones L y D, obteniendo el porcentaje de producción de L-aminoácidos.

Figura 4. Incorporación de D-Arg en la posición 4 de los muropéptidos catalizada por LdtA* (LdtA sin dominio transmembrana) usando M4 como sustrato. Análisis de ensayos de la actividad de la enzima LdtA* *in vitro* en presencia de D-Arg 0mM (A) o 20mM (B). Cuando la reacción transcurre en presencia de D-Arg, M4^R (producto; D-Arg en posición 4) a partir de M4 y D-Arg (sustratos de reacción).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma. A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la utilidad de la enzima para la racemización de aminoácidos y la producción de muropéptidos.

Ejemplo 1: Producción y purificación de BsrV

La racemasa de amplio espectro BsrV es expresada de forma heteróloga en *Escherichia coli* BL21 (DE3). Para ello el gen codificante de BsrV (*vc1312*) fue amplificado por PCR usando para ello oligonucleótidos que portaban sitios de restricción apropiados para su posterior clonaje (Nco1 and Not1, respectivamente, en mayúsculas): (FCP56: SEQ ID NO:2 5'-aaacCATGGagcagccgtctcagtcgcaagaag-3' y, FCP43:SEQ ID NO:3 5'-aaaGCGGCCGCTtcacgtagaaacgtgggtactgtgtcccc-3') en el vector pET28b (Novagen). Además, el clonaje mediante estas dianas de restricción generan una fusión C-terminal de la secuencia codificante de BsrV a 6 histidinas (6His) justo antes del codón de terminación. La fusión de las 6His en el extremo C-terminal de BsrV permite su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad (Ni-NTA, Qiagen). La purificación se realizó en tampón Tris-HCl 150mM pH7,5; 0,2M NaCl; 10% Glicerol, eluyendo la proteína de la columna competitivamente mediante el mismo tampón suplementado con imidazol 0,5M. El imidazol fue eliminado al dializar las muestras contra un tampón Tris HCl 20mM pH7,5. Finalmente las muestras fueron concentradas a 10mg/ml usando centricones (*Centrifugal Filter Units*, Millipore).

Ejemplo 2: Ensayo in vitro de racemización

Para caracterizar el espectro de aminoácidos utilizables por BsrV se incubó en buffer bicarbonato 30mM (pH8) 1 microgramo de BsrV con 20mM del D o L aminoácido deseado. La reacción se prolonga durante 15min tras los cuales se inactiva BsrV hirviendo la muestra durante 5 min y centrifugando para eliminar el precipitado (BsrV desnaturizada). La actividad de BsrV fue probada con actividad siempre >90% con tampones Tris-HCl, PBS, CHES así como pH entre 6,5 y 9.

Ejemplo 3: Cuantificación de la actividad BsrV

Para cuantificar la actividad BsrV es necesario separar cromatográficamente las formas enantioméricas. Esto es posible gracias al reactivo de Marfey (Na-(2,4-Dinitro-5-fluorofenil)-L-alaninamida), el cual reacciona con los grupo amino primarios de los aminoácidos alterando su tiempo de retención en cromatografía en fase reversa.

La reacción tiene lugar durante 5min a 80C y se detiene agregando un volumen de HCl 1M. Las muestras derivatizadas se filtraron usando filtros de PVDF 0,22um (Millipore) y se inyectaron en el HPLC usando como fase estacionaria una columna Aeris peptide 3,6u XB-C18; 250x4,6 mm y una fase móvil: A: 100% fosfato de dietilamina 50mM pH3; B: 30% A+ 70% acetonitrilo en gradiente de 80min con un flujo de 2ml/min.

Los resultados (figura 2A y 2B) indican que al cabo de 5 minutos BsrV a partir de L-aminoácidos puros ha alcanzado el equilibrio L/D próximo a una relación 1:1 para los siguientes aminoácidos naturales: A (Alanina), C (Cisteína), H (Histidina), K (Lisina), N (Asparagina), Q (Glutamina), R (Arginina), y S (Serina). Al cabo de 90 minutos se confirmó que el resto de aminoácidos no fueron racemizados en modo alguno. De esta forma se demuestra la utilidad de la enzima para racemizar aminoácidos en sentido L-D.

Por otro lado en la figura 2C se observa el equilibrio alcanzado tras la incubación con BsrV para algunos aminoácidos no naturales como son: Ornitina, β -cloroalanina, 2,4-diaminobutírico, Norleucina, Fenilglicina, Homoserina, y/o N-acetil-lisina metil éster.

De la misma forma que en los casos anteriores, en la figura 3 se observa cómo a partir de D-aminoácidos puros también se alcanza el equilibrio demostrando la utilidad de la enzima para racemizar aminoácidos también en sentido D-L.

Ejemplo 4: Síntesis de muropéptidos no canónicos.

Existen dos tipos de muropéptidos no canónicos para ensayos en inmuno-modulación: muro3-X y muro4-X, donde X es cualquier aminoácido en su forma D distinto de la D-alanina (aminoácido canónico para esa posición dentro del péptido). Los muropéptidos muro3-X presentan un D-aminoácido no canónico en cuarta posición mientras que los muro4-X presentan un D-aminoácido no canónico en posición 5. El método de síntesis depende de enzimas promiscuas como por ejemplo BsrV, LdtA, Vc-Ddl y Vc-MurF. Estas enzimas se pueden encontrar fusionadas a 6His en el extremo C-terminal para su purificación por cromatografía de afinidad Ni-NTA. En ambos casos se trata de reacciones multi-enzimáticas acopladas linealmente. El proceso parte de L-aminoácidos puros como sustratos, los cuales son convertidos a su forma enantiomérica D que permite el editado del muropéptido mediante la acción de transpeptidación (Ldt) o ligación (Ddl+MurF).

Para la síntesis de muro3-X, BsrV se acopló enzimáticamente a LdtA* (L,D- transpeptidasa A, locus genético *vc1268* de *V. cholerae* N16961, la cual carece de su elemento transmembrana para permitir su actividad en ausencia de detergente) enzima que permite, sin aporte energético extra, la sustitución de la D-Alanina que naturalmente ocupa la posición 4 en el muropéptido muro4 (mono4 y di4,4) por muro3-X donde X puede ser cualquier D-aminoácido. De esta forma, a partir de L-aminoácidos y el muropéptido muro 4, se obtuvo el péptido muro3-X, en el cual X dependía del L aminoácido de partida. El ensayo se realizó en buffer fosfato salino pH7,5, 100mM NaCl y 0,1% Triton X-100. Al cabo de 30min a 37°C se detuvo la reacción y se purificó el muro3-X mediante HPLC tal y como se describe en Cava *et al.* *EMBO J.* 2011, 30(16): 3442-3453. Hemos generado una variante de LdtA (LdtA*) que carece de elemento transmembrana lo que permite su actividad en ausencia de detergente. Esta variante se ha producido tras amplificar el locus *vc1268* usando oligonucleótidos que portaban sitios de restricción apropiados para su posterior clonaje (Nco1 and Xba1, respectivamente, en mayúsculas): (FCP17: SEQ ID NO:4 5'-aaaCCATGGTgaccagcgctttgtgaattgggtggattgatag-3' y, FCP460:SEQ ID NO:5 5'-aaaTCTAGAttagcaaatgtgagacgcgtcacc-3') en el vector pET28b (Novagen).

Para la síntesis de muro4-X, BsrV se acopló enzimáticamente a Vc-Ddl (D-alanil-D-alanina ligasa de *Vibrio cholerae*) y Vc-MurF (UDP-N-acetilmuramoylalanil-D-glutamyl-2,6-diamino-pimelato-D-alanil-D-alanina ligasa de *Vibrio cholerae*). Vc-Ddl se produjo tras amplificar el locus *vca0572* usando oligonucleótidos que portaban sitios de restricción apropiados para su posterior clonaje (Xba1 and Not1, respectivamente, en mayúsculas): (FCP540: SEQ ID NO:6 5'-aaaTCTAGAtaagacaacaatcctactttgtgc-3' y, FCP539: SEQ ID NO:7 5'-

aaaGCGGCCGCttcgattactaatgtgttggtgacac-3') en el vector pET28b (Novagen). Vc-MurF se produjo tras amplificar el locus *vc2405* usando oligonucleótidos que portaban sitios de restricción apropiados para su posterior clonaje (Xba1 and Not1, respectivamente, en mayúsculas): (FCP542: SEQ ID NO:8 5'-
 5 aaaTCTAGAtaaggaggatataccatgattcgcgtaatgcttttcagc-3' y, FCP541: SEQ ID NO:9 5'-
 10 aaaGCGGCCGCttgcaaatttctccttgagagcagcggc-3') en el vector pET28b (Novagen). Se incubaron en el ensayo de reacción BsrV, Vc-Ddl y Vc-MurF en concentraciones equimolares y se añaden como sustratos: 40mM L-aminoácido (80% L-aminoácido no canónico + 20% L-Alanina), 1mg/ml UDP-M3 en un tampón Tris HCl 200mM pH8; KCl 80mM; MgCl₂ 20mM (2). Al cabo de 30min a 37°C se detuvo la reacción y se purificó el muro4-X mediante HPLC tal y como se describe en Cava *et al. EMBO J.* 2011, 30(16): 3442-3453. En la figura 4 se observa la incorporación de D-Arg en la posición 4 de los muropeptidos catalizada por LdtA* usando M4 como sustrato, dando lugar a M4^R.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de la enzima BsrV como reactivo para la racemización de al menos un aminoácido seleccionado de la lista que comprende Alanina, Arginina, Asparagina, Cisteína, Glutamina, Histidina, Lisina, Serina, Ornitina, β -cloroalanina, 2,4-diaminobutírico, Norleucina, Fenilglicina, Homoserina, y N-acetil-lisina metil éster.
2. Uso según la reivindicación 1 donde el aminoácido es un aminoácido básico.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la racemización se hace a partir de una mezcla enantiomérica.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la racemización se hace a partir de un enantiómero puro.
- 15 5. Usó según la reivindicación 4 donde el enantiómero puro es el enantiómero L.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la racemización se hace a partir de una mezcla de aminoácidos.
- 20 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde BsrV se encuentra inmovilizada.
8. Método de producción de muropéptidos que comprende:
 - 25 a) Poner en contacto al menos un L-aminoácido Alanina, Arginina, Asparagina, Cisteína, Glutamina, Histidina, Lisina, Serina, Ornitina, β -cloroalanina, 2,4-diaminobutírico, Norleucina, Fenilglicina, Homoserina, y N-acetil-lisina metil éster con la enzima BsrV para racemizar el aminoácido a su forma D, y
 - b) poner en contacto el D-aminoácido obtenido en (a) con un muropéptido y al menos una L, D transpeptidasa y/o al menos una ligasa.
- 30 9. Método según la reivindicación 8 donde el aminoácido de (a) es un aminoácido básico.
10. Método según la reivindicación 9 donde la L,D transpeptidasa del paso (b) es LdtA.
11. Método según la reivindicación 10 donde LdtA carece del dominio transmembrana.
- 35 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 donde la ligasa del paso (b) es Vc-Ddl y/o Vc-MurF.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 donde el muropéptido que se sintetiza es un muropéptido no canónico.
- 40 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 donde el aminoácido del paso (a) se encuentra en forma de mezcla enantiomérica.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 donde el aminoácido de partida se encuentra en una forma enantiomérica pura.
- 45 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 donde el aminoácido de partida se encuentra en una mezcla de aminoácidos.

FIG.1

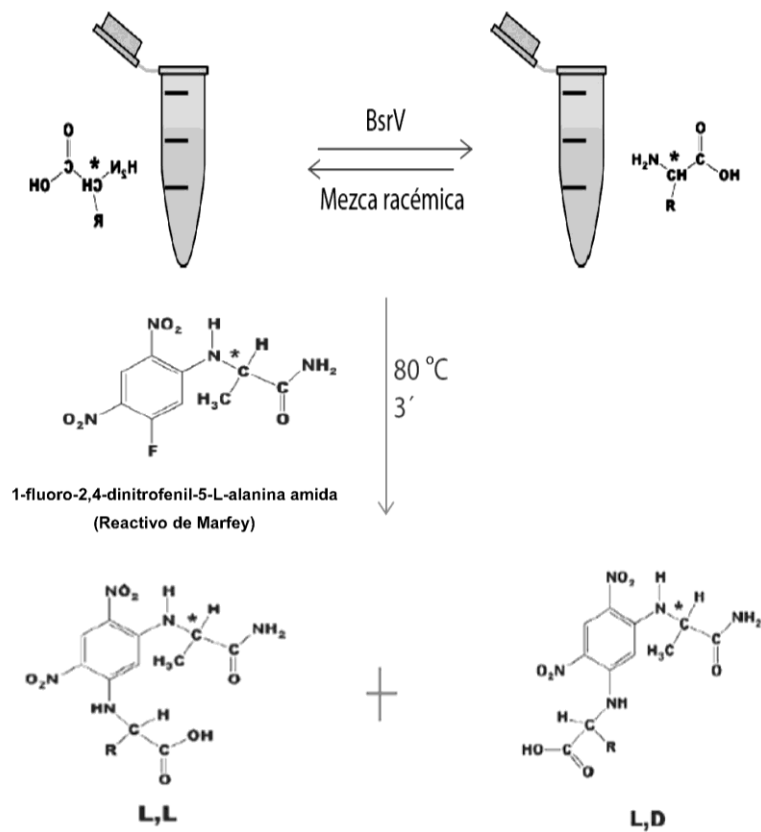


FIG.2

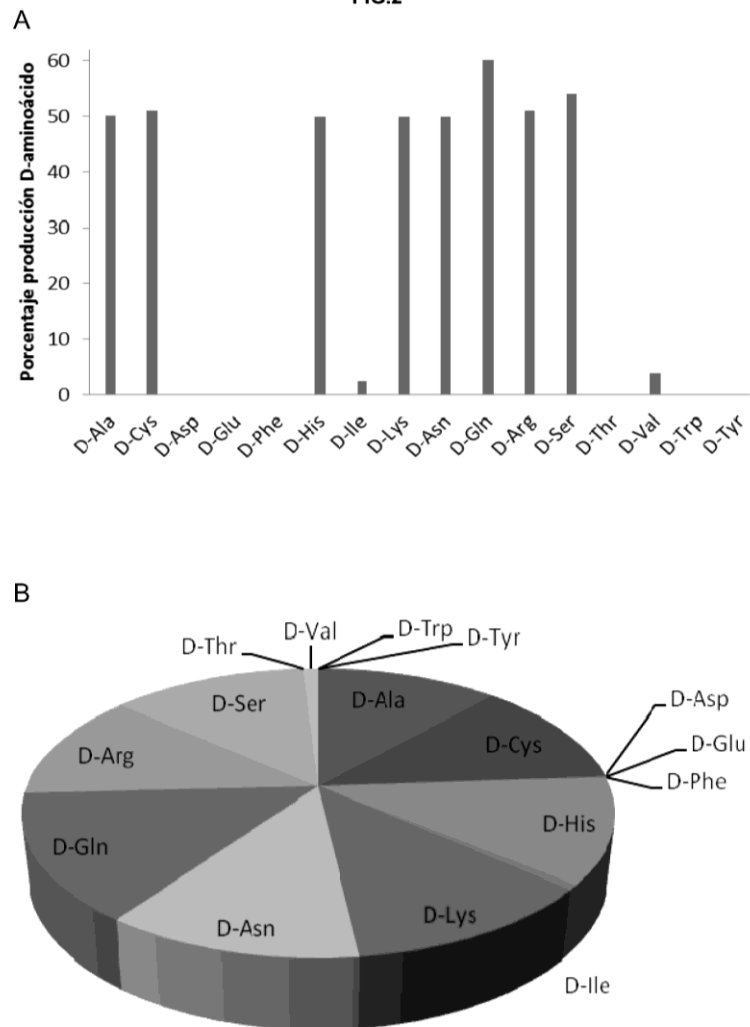


FIG.2 (cont.)

C

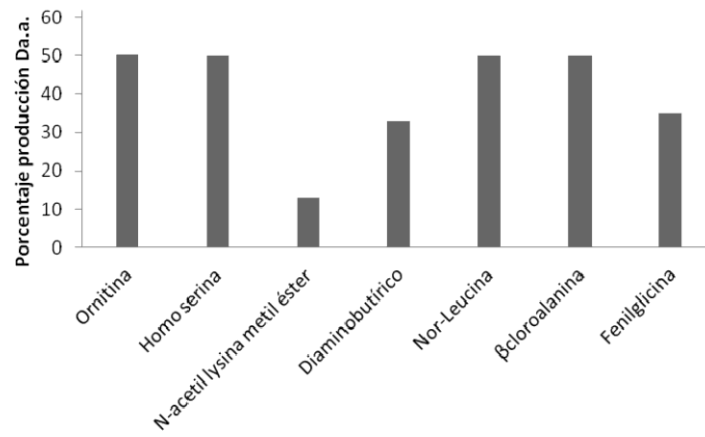


FIG 3

Porcentaje producción Laa

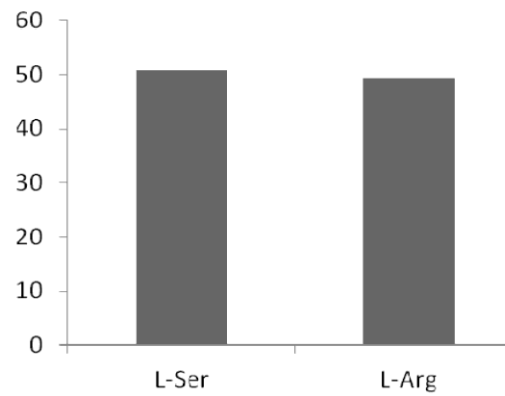
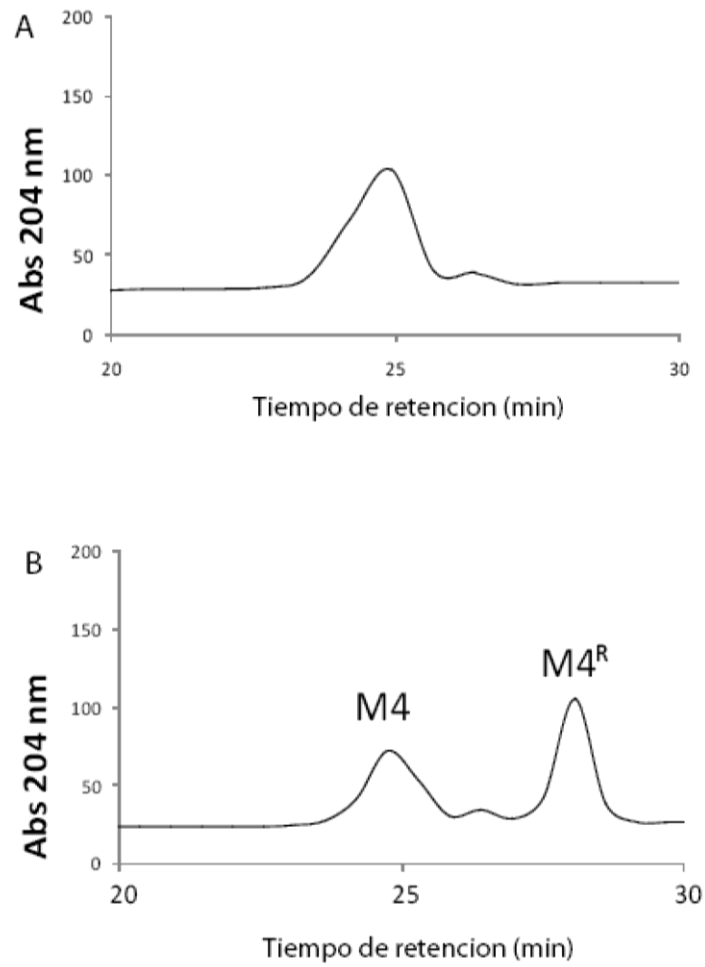


FIG.4



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid
 <120> USO DE LA RACEMASA BsrV PARA LA RACEMIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS
 <130> 1595.45
 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

<400> 1

Leu Glu Gln Pro Leu Leu Ser Arg Lys Lys Asn Val Pro Ser Met Ile
 1 5 10 15

Thr Thr Gly Asp Ile Met His Phe Lys Ala Thr Leu Leu Ser Leu Ser
 20 25 30

Ile Ala Ala Thr Leu Pro Ser Phe Ser Leu Ser Ala Ala Pro Leu His
 35 40 45

Ile Asp Thr Ala Leu Pro Asp Ala Ala Gln Ile Gln Gln Ser Asn Ser
 50 55 60

Trp Leu Glu Ile Ser Leu Gly Gln Phe Gln Ser Asn Ile Glu Gln Phe
 65 70 75 80

Lys Ser His Met Asn Ala Asn Thr Lys Ile Cys Ala Ile Met Lys Ala
 85 90 95

Asp Ala Tyr Gly Asn Gly Ile Arg Gly Leu Met Pro Thr Ile Ile Ala
 100 105 110

Gln Gly Ile Pro Cys Val Gly Val Ala Ser Asn Ala Glu Ala Arg Ala
 115 120 125

Val Arg Glu Ser Gly Phe Lys Gly Glu Leu Ile Arg Val Arg Ser Ala
 130 135 140

Ser Leu Ser Glu Met Ser Ser Ala Leu Asp Leu Asn Ile Glu Glu Leu
 145 150 155 160

Ile Gly Thr His Gln Gln Ala Leu Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Gln
 165 170 175

Ser Gly Lys Thr Leu Lys Val His Ile Ala Leu Asn Asp Gly Gly Met
 180 185 190

Gly Arg Asn Gly Ile Asp Met Thr Thr Glu Ala Gly Lys Lys Glu Ala
 195 200 205

ES 2 460 491 A1

Val Ser Ile Ala Thr Gln Pro Ser Leu Ser Val Val Gly Ile Met Thr
210 215 220

His Phe Pro Asn Tyr Asn Ala Asp Glu Val Arg Ala Lys Leu Ala Gln
225 230 235 240

Phe Lys Glu Ser Ser Thr Trp Leu Met Gln Gln Ala Asn Leu Lys Arg
245 250 255

Glu Glu Ile Thr Leu His Val Ala Asn Ser Tyr Thr Ala Leu Asn Val
260 265 270

Pro Glu Ala Gln Leu Asp Met Val Arg Pro Gly Gly Val Leu Phe Gly
275 280 285

Asp Leu Pro Thr Asn Pro Glu Tyr Pro Ser Ile Val Ser Phe Lys Thr
290 295 300

Arg Val Ser Ser Leu His His Leu Pro Lys Asp Ser Thr Val Gly Tyr
305 310 315 320

Asp Ser Thr Phe Thr Thr Ser Arg Asp Ser Val Leu Ala Asn Leu Pro
325 330 335

Val Gly Tyr Ser Asp Gly Tyr Pro Arg Lys Met Gly Asn Lys Ala Glu
340 345 350

Val Leu Ile Asn Gly Gln Arg Ala Lys Val Val Gly Val Thr Ser Met
355 360 365

Asn Thr Thr Val Val Asp Val Thr Glu Ile Lys Gly Val Leu Pro Gly
370 375 380

Gln Glu Val Val Leu Phe Gly Gln Gln Gln Lys Gln Ser Ile Ala Val
385 390 395 400

Ser Glu Met Glu Asn Asn Ala Glu Leu Ile Phe Pro Glu Leu Tyr Thr
405 410 415

Leu Trp Gly Thr Ser Asn Pro Arg Phe Tyr Val Lys
420 425

<210> 2
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido FCP56

<400> 2
aaaccatgga gcagccgctt ctcagtcgca agaag

<210> 3
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido FCP43
 <400> 3
 aaagcggccg ctttcacgta gaaacgtggg ttactggttc ccc 43

<210> 4
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido FCP17
 <400> 4
 aaaccatggg gaccacgcgt ttgttgaat tgggggtggat tgatag 46

<210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido FCP460
 <400> 5
 aaatctagat tagtcaaatt tggagacgcg tcacc 35

<210> 6
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido FCP540
 <400> 6
 aaatctagat aagacaacaa tcctactttt gtgc 34

<210> 7
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido FCP539
 <400> 7
 aaagcggccg cttcgcattt actaatgtgt tgggtgacac 39

<210> 8
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido FCP542

ES 2 460 491 A1

<400> 8
aaatctagat aaggaggata taccatgatt cgcgtaatgc tttctcagc 49

<210> 9
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido FCP541

<400> 9
aaagcggccg cttgcaaatt ttccttgag agcagcggc 39



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ②① N.º solicitud: 201231749
②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.11.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N9/90** (2006.01)
C12P21/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LAM H. et al. D-Amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Remodeling in Bacteria. Science. 18.09.2009, Vol. 325, 1552-1555, todo el documento.	1-16
X	CAVA F. et al. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. Cellular and Molecular Life Sciences. 14.12.2010, Vol. 68, páginas 817-831, todo el documento.	1-16
X	HORCAJO P. et al. Peptidoglycan Plasticity in Bacteria: Stress-Induced Peptidoglycan Editing by Noncanonical D-Amino Acids. Microbial Drug Resistance. 01.06.2012, Volumen 18, Número 3, páginas 306-313, todo el documento.	1-16
X	CAVA F. et al. Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. The EMBO Journal. 26.07.2011, Vol. 30, páginas 3442-3453, todo el documento.	1-16
A	HEIDELBERG J. F. et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen <i>Vibrio cholerae</i> . Nature. 03.08.2000, Vol. 406, páginas 477-484, todo el documento.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.03.2014

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/4

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

C12N, C12P

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, XPESP, XPESP2, XPOAC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.03.2014

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-16

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-16

SI
NO

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

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	LAM H. et al. Science. Vol. 325, 1552-1555	18.09.2009
D02	CAVA F. et al. Cellular and Molecular Life Sciences. Vol. 68, páginas 817-831	14.12.2010
D03	HORCAJO P. et al. Microbial Drug Resistance. Volumen 18, Número 3, páginas 306-313	01.06.2012
D04	CAVA F. et al. The EMBO Journal. Vol. 30, páginas 3442-3453	26.07.2011
D05	HEIDELBERG J. F. et al. Nature. Vol. 406, páginas 477-484	03.08.2000

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto el uso de la enzima BsrV como reactivo para la racemización (reivindicaciones 1 a 7) y un método para la producción de muropéptidos utilizando dicha enzima (reivindicaciones 8 a 16).

D01 demuestra que las bacterias producen D-aminoácidos que se acumulan en concentraciones milimolares en los sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria.

D02 revisa el importante papel de los D-aminoácidos entre las bacterias.

D03 repasa los efectos de los D-aminoácidos en la biología de la pared celular bacteriana.

D04 explica que la producción de NCDAAs por la racemasa de amplio espectro BsrV en *Vibrio cholerae* requiere el factor de respuesta al estrés RpoS.

D05 expone la determinación y análisis de la secuencia genómica completa de *Vibrio cholerae* N16961.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

D01 demuestra que las bacterias producen D-aminoácidos que se acumulan en concentraciones milimolares en los sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria. Estos D-aminoácidos son sintetizados por racemasas como la BsrV de *Vibrio cholerae*, codificada por el gen vc1312, que también participa en la producción de muropéptidos. Muestra las cinéticas de acumulación de D-aminoácidos en los sobrenadantes de *Vibrio cholerae*: D-Met, D-Leu, D-Val, D-Ile y D-Ala.

D02 revisa el importante papel de los D-aminoácidos entre las bacterias, especialmente de los aminoácidos no canónicos (NCDAAs), y como son necesarios para la síntesis de muropéptidos. Expone que la racemasa BsrV de *Vibrio cholerae* es necesaria y suficiente para la síntesis de diversos D-aminoácidos incluyendo los D-aminoácidos inusuales o aminoácidos no canónicos y, así, permite la obtención de D-Met, D-Leu, D-Val y D-Ile y también D-Ala y D-Glu.

D03 repasa los efectos de los D-aminoácidos en la biología de la pared celular bacteriana incluyendo su implicación como factores clave en la formación del peptidoglicano. Detalla el papel de los NCDAAs y su síntesis mediante racemasas, como la racemasa de amplio espectro BsrV de *Vibrio cholerae* (N16961 vc1268). También define el mecanismo por el que se sintetizan los muropéptidos y las enzimas que intervienen.

D04 explica que la producción de NCDAAs por la racemasa de amplio espectro BsrV en *Vibrio cholerae* requiere el factor de respuesta al estrés RpoS y se comprobó que el 10% de los muropéptidos aislados contenían D-Met. Se detalla también la formación de estos muropéptidos y las enzimas que intervienen en su síntesis.

Los documentos mencionados anticipan el uso de la enzima BsrV de *Vibrio cholerae* como reactivo para la racemización de aminoácidos como los que son objeto de la presente invención. También divulgan el método de producción de muropéptidos empleando dicha enzima y las ligasas y transpeptidasas de *Vibrio cholerae* LdtA, Vc-Ddl y/o Vc-MurF. Por tanto, las reivindicaciones 1 a 16 no son nuevas ni presentan actividad inventiva.