

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 720**

21 Número de solicitud: 201331891

51 Int. Cl.:

C12P 13/04 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.12.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.06.2015

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (100.0%)

Ciudad Universitaria de Cantoblanco,

C/ Einstein, 3

.....**28049 Madrid ES**

72 Inventor/es:

CAVA VALENCIANO, Felipe y
ESPAILLAT FERNÁNDEZ, Akbar

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Racemasa BsrAh para la racemización de aminoácidos**

57 Resumen:

Racemasa BsrAh para la racemización de aminoácidos.

En la presente invención se incluye una racemasa de *Aeromonas hydrophila* la cual presenta un amplio espectro de racemización y por tanto permite la obtención de L aminoácidos desde el enantiómero D y de D aminoácidos desde el enantiómero L. Por tanto la presente invención también se refiere tanto al uso de dicha racemasa in vitro como a un método de racemización de aminoácidos. Además la presente invención se refiere a un método de síntesis de muropeptidos.

ES 2 538 720 A1

Racemasa BsrAh para la racemización de aminoácidos

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención describe una racemasa presente en el organismo *Aeromonas hydrophila* la cual produce la racemización reversible de aminoácidos a su forma enantiomérica (L, D). Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la biotecnología.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

En la naturaleza, de forma habitual, los aminoácidos se suelen encontrar en su forma enantiomérica L (levógira). Las proteínas que forman parte de los organismos vivos están formadas únicamente por los enantiómeros L de los aminoácidos. Sin embargo,
15 existen diversas estructuras en la naturaleza que incorporan algunos enantiómeros D (dextrógiras), como pueden ser por ejemplo, pequeños polipéptidos bacterianos, normalmente inferiores a 20 aminoácidos tales como aquellos que conforman el peptidoglicano (PG) de las paredes bacterianas (Vollmer W. *et al.*, 2008 FEMS Microbiol Rev 32: 149-167) o bien como constituyentes de péptidos no ribosomales
20 (Strieker M. *et al.*, 2010, Curr Opin Struct Biol 20: 234-240) .

Los péptidos que incluyen D-aminoácidos (es decir, aminoácidos de forma enantiomérica D), de forma habitual, no son sintetizados mediante la maquinaria habitual de formación de proteínas mediante la síntesis de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y la incorporación de los aminoácidos mediante la mediación del
25 ARN de transferencia, sino mediante la polimerización directa de unos aminoácidos a otros mediante enzimas bacterianas.

Los D-aminoácidos que forman habitualmente parte del peptidoglicano y que se denominan D-aminoácidos canónicos son los aminoácidos D-alanina y D-glutámico.
30 Sin embargo algunas bacterias son capaces de producir D-aminoácidos no canónicos (NCDAAs) y liberarlos al ambiente extracelular en altas concentraciones (Lam H *et al. Science*. 2009, 325: 1552-1555). Los NCDAAs tienen influencia en la composición y por tanto en la consistencia y resistencia del peptidoglicano en bacterias, permitiendo

que las bacterias que los incluyen presenten una mayor resistencia a los cambios ambientales a los que se enfrenta. Además de su influencia en el peptidoglicano, los NCDAAAs tienen influencia en otros procesos como por ejemplo la dispersión del biofilm que se puede formar en una superficie viva o inerte, (Kolodkin-Gal I *et al.* 2010. *Science* 328: 627-629). Además también presentan influencia en la germinación de esporas en diversas especies bacterianas como por ejemplo organismos del género *Bacillus*.

Debido a las múltiples aplicaciones de los D-aminoácidos, especialmente a su capacidad para formar péptidos antibacterianos que permitan la inhibición de biofilms, es de interés su producción a nivel industrial. Sin embargo, en la actualidad su producción resulta cara ya que se utilizan catalizadores químicos. De esta forma se puede pasar de L-aminoácidos, los cuales son abundantes en la naturaleza y baratos de obtener, a D-aminoácidos. Los catalizadores utilizados son por ejemplo el piridoxal fosfato o el ácido salicílico (Gong *et al. Inorg Chem.* 2010, 49:7692-7699). Sin embargo estos catalizadores presentan un rendimiento de reacción muy bajo además de un elevado coste, lo que hace el proceso de obtención de D-aminoácidos poco rentable económicamente. Esto provoca que el posterior uso de los mismos e investigación de nuevos compuestos que los incluyen resulte limitado dado el coste.

Para tratar de solventar los problemas incluidos en este método de obtención de aminoácidos, en la actualidad se están desarrollando otras vías de obtención de forma que se solventen las limitaciones y se acelere el proceso de obtención. De esta forma se están tratando de utilizar biocatalizadores como por ejemplo racemasas específicas de aminoácidos. Esta aproximación presenta como inconveniente que estas enzimas presentan especificidad de sustrato y por tanto sería necesaria una enzima para cada tipo de sustrato, lo que no permitiría usar mezclas complejas de L-aminoácidos como material de partida para abaratar el proceso. Además la necesidad de usar un catalizador para cada reacción implica un incremento en los costes de producción. Además, en la actualidad no se conocen suficientes enzimas mono-específicas que se puedan combinar para llevar a cabo el procedimiento.

Por tanto, resulta necesario conseguir elementos que permitan la obtención de D-aminoácidos a partir de L-aminoácidos de forma que el proceso sea barato, rápido y

sencillo, minimizando el número de agentes implicados, y que permita una multiespecificidad del proceso.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a una enzima de *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* (ATCC 7966) la cual se encuentra codificada por el locus YP_857116 de este organismo, y denominada BsrAh (*Broad spectrum racemase in Aeromonas hydrophila*, o racemasa de *Aeromonas hydrophila* de amplio espectro). Esta enzima
10 presenta multiespecificidad de racemización frente a diversos aminoácidos de forma que puede transformar enantiómeros L en enantiómeros D y viceversa. Los aminoácidos que pueden ser racemizados por esta enzima son tanto naturales como sintéticos. De esta forma la enzima puede ser utilizada para racemizar aminoácidos partiendo tanto de un sólo aminoácido como de mezclas de aminoácidos, y tanto de un
15 enantiómero puro como de mezclas de enantiómeros. La enzima de la presente invención, secuencia SEQ ID NO: 1, presenta como ventaja que para llevar a cabo la racemización de aminoácidos no requiere un aporte exógeno de energía. En la presente invención se demuestra cómo la enzima reacciona con los aminoácidos y a partir de L-aminoácidos, D-aminoácidos, puros o mezclas de estos se alcanza un
20 equilibrio que está siempre próximo a una relación 1:1 entre las formas enantioméricas de los aminoácidos sustrato.

Dada la utilidad de los enantiómeros D, resulta de especial relevancia dentro de la biotecnología la capacidad de la enzima racemasa BsrAh de racemizar de
25 enantiómero L, el cual es fácil de obtener y barato dado que es el presente de forma mayoritaria en las proteínas de los organismos en la naturaleza, a enantiómero D. También resulta interesante la capacidad de alcanzar un equilibrio de reacción, de forma que se puede ir eliminando u obteniendo el enantiómero D según se va produciendo de forma que dejando evolucionar la reacción se alcanzan de nuevo
30 ciertas cantidades del enantiómero de interés al alcanzarse el equilibrio de nuevo. El 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.

Otro elemento que resulta interesante de la racemasa BsrAh es la capacidad de racemizar los aminoácidos a partir de mezclas racémicas o enantioméricas impuras, ya que estas son más baratas y fáciles de obtener que el enantiómero de forma pura.

5 De igual forma que ocurre entre muchas de las proteínas descritas, como por ejemplo entre proteínas homólogas en diferentes organismos, BsrAh podría tener alterado algún aminoácido, con respecto a SEQ ID NO: 1 sin que se produjera una alteración sustancial en la proteína (Muth T. *et al.*, 2012, *Bioinformatics* 28, 584-589). Esto significa que esta alteración no sería determinante en el polipéptido ni para su
10 estructura ni para su actividad. La enzima BsrAh puede por lo tanto presentar variantes. Estas variantes se refieren a variaciones limitadas en la secuencia aminoacídica, que permiten el mantenimiento de la funcionalidad de la enzima descrita en la presente invención. Esto quiere decir que la secuencia de referencia y la secuencia de la variante son similares en conjunto, e idénticas en muchas regiones.
15 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 asparragina (Asn) y glutamina (Gln), entre serina (Ser) y treonina
20 (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
25 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 métodos naturales e ingeniería genética. Existiendo una serie de aminoácidos que se consideran esenciales en la
30 presente invención, como son: Cys 70, Arg 119, Arg 121, Ala 165, Ala 169, Asn 174, Pro 206, Glu 208, Gly 216, Phe 246, Gly 263, Asn 349, Thr 350, Ala 381 y Thr 396 (obtenidos mediante procedimientos informáticos, *JDet software*, Muth T *et al.*, 2012, *Bioinformatics* 28, 584-589).

Se entiende por “aminoácido no canónico” o “NCDAAs” en la presente invención, a aquellos aminoácidos distintos de alanina y ácido glutámico, y que forman parte del PG de todas las bacterias conocidas.

5 Por todo ello un primer aspecto de la invención se refiere al uso de una enzima, aislada o sintética, de ahora en adelante enzima o proteína de la invención, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95%, preferiblemente al menos un 98%, más preferiblemente al menos un 99% y aún más preferiblemente un 100% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1
10 como reactivo para la racemización de al menos un aminoácido. En una realización preferida la enzima, aislada o sintética, consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95%, preferiblemente al menos un 98%, y más preferiblemente al menos un 99% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1. De forma aún más preferible, la enzima consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.

15

El porcentaje de identidad se puede calcular mediante los métodos conocidos por el experto en la materia.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención el aminoácido se
20 selecciona de la lista que comprende: cisteína, histidina, lisina, leucina, metionina, asparragina, glutamina, arginina, serina, ornitina, homoserina y norleucina. Otra realización preferida se refiere al uso donde el aminoácido es alanina. En una realización preferida el aminoácido es un aminoácido básico, por este motivo, una realización aún más preferida se refiere al uso de la enzima del primer aspecto de la
25 invención donde el aminoácido es la lisina, la arginina, la glutamina, la histidina y/o la ornitina.

Se entiende por “BsrAh” (*Broad spectrum racemase in Aeromonas hydrophila*, o racemasa de *Aeromonas hydrophila* de amplio espectro) o “enzima BsrAh” en la
30 presente invención a la proteína codificada por el locus YP_857116 de *Aeromonas hydrophila* y que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. La enzima de la invención participa como “catalizador” en la reacción de racemización, es decir, como racemasa.

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. La racemización es llevada a cabo por la racemasa, en la presente invención, por la enzima de la invención.

10 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. Estas 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 o 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, es decir la racemización se realiza a partir de un enantiómero puro. En una realización aún más preferida, el enantiómero puro es el enantiómero “L”.

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

30

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 BsrAh será transformada 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
5 ejemplo los D-aminoácidos o los L-aminoácidos en función del interés de cada caso. Por todo ello, otra realización preferida de este primer aspecto de la invención se refiere al uso donde la racemización se hace a partir de una mezcla de aminoácidos, donde dicha mezcla comprende cisteína, histidina, lisina, leucina, metionina, asparragina, glutamina, arginina, serina, alanina, ornitina, homoserina y/o norleucina.

10

El uso de BsrAh 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 ya que la enzima tratará de
15 alcanzar el punto de equilibrio. Dado que los procesos industriales requieren de una enzima con elevada actividad y estabilidad, esta enzima se puede encontrar por ejemplo 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
20 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
25 reticulado), y en 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 BsrAh se encuentra
30 inmovilizada.

La racemización con la enzima de la invención también se puede acoplar a la producción de un compuesto en concreto que requiera la racemización de un aminoácido. Si es una enzima enantioselectiva (es decir, que su actividad este

restringida a uno de los enantiómeros,) desplazará el equilibrio favoreciendo la producción hacia uno de los enantiómeros. Por otra parte, si la racemasa es capaz de utilizar tanto el enantiómero L como el D de los aminoácidos ya mencionados, si la reacción se acopla con otra enzima, la cual utiliza exclusivamente bien el D o el L, se
5 desplazaría el equilibrio de la reacción hacia la formación de unos de los enantiómeros, generando productos que puedan ser de interés.

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
10 que comprende cisteína, histidina, lisina, leucina, metionina, asparragina, glutamina, arginina, serina, ornitina, homoserina y norleucina con una enzima, aislada o sintética, de ahora en adelante enzima o proteína de la invención, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95%, preferiblemente al menos un 98%, más preferiblemente al menos un 99% y aún más preferiblemente un 100% de
15 identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 como reactivo para la racemización de al menos un aminoácido. En una realización preferida la enzima, aislada o sintética, consiste una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95%, preferiblemente al menos un 98%, y más preferiblemente al menos un 99% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1. De forma aún más preferible, la
20 enzima consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1. En una realización preferida el aminoácido es un aminoácido básico, por este motivo, una realización aún más preferida se refiere al método donde el aminoácido es la lisina, la arginina, la glutamina, la histidina y/o la ornitina. En una realización preferida de este aspecto de la invención el aminoácido se encuentra en forma de mezcla racémica o enantiomérica.
25 En otra realización preferida de este aspecto de la invención el aminoácido se encuentra en una forma enantiomérica pura. En una realización aún más preferida, el enantiómero puro es el enantiómero L. En otra realización preferida el aminoácido se encuentra incluido en una mezcla de aminoácidos. En otra realización preferida la enzima se encuentra aislada, es decir, no inmovilizada.

30

Dada la capacidad de la enzima BsrAh de racemizar los enantiómeros L en enantiómeros D, esta enzima puede ser utilizada por ejemplo en un sistema multienzimático para llevar a cabo un método de obtención de muropéptidos no canónicos (incorporación de un D-aminoácido diferente a la D-alanina en un

muropéptido canónico), a partir de un L-aminoácido, preferiblemente seleccionado de la lista que comprende L-cisteína, L-histidina, L-lisina, L-leucina, L-metionina, L-asparagina, L-glutamina, L-arginina, L-serina, L-homoserina, L-norleucina y L-ornitina, y un muropéptido canónico (no modificado por algún D-aminoácido distinto a los presentes de forma habitual en el peptidoglicano) o un muropéptido no canónico. El sistema multienzimático además de comprender la enzima de la invención ha de incluir al menos una L, D transpeptidasa y/o al menos una ligasa. Estas enzimas pueden ser provenientes del mismo o diferente organismo que la racemasa de la invención.

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

15 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 aminoácido C-terminal (posición 4) en un tetrapéptido.

20 Se entiende por “muropéptido no canónico” en la presente invención al muropéptido que comprende al menos un NCDAA.

Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere a un método de producción de un muropéptido que comprende:

25 a) poner en contacto al menos un L-aminoácido seleccionado de la lista que comprende L-cisteína, L-histidina, L-lisina, L-leucina, L-metionina, L-asparagina, L-glutamina, L-arginina, L-serina, L-homoserina, L-norleucina y L-ornitina con la enzima BsrAh para racemizar el aminoácido a su forma D, y

30 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.

En una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al método donde la identidad de la enzima del paso (a) con respecto a la secuencia SEQ ID NO:

1 es de al menos un 98%, más preferiblemente un 99%. En otra realización aún más preferida la enzima comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. En una realización aún más preferida, la enzima consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

5

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al método donde el muropéptido que se sintetiza es un muropéptido no canónico.

En una realización preferida de este aspecto de la invención el aminoácido del paso
10 (a) se encuentra incluido en una 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 aún más preferida la enzima LdtA carece de dominio transmembrana por lo que puede ser empleada en mezclas de
15 reacción enzimática 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 BsrAh, y/o L,D transpeptidasa y/o ligasa se encuentran aisladas (es decir, puras).

25 Se entiende por “mezcla compleja de aminoácidos” aquella mezcla que comprende varios aminoácidos donde algunos de ellos se van a racemizar y otros no, de modo que sólo se incorporan al muropéptido aquellos que racemizan. Esta mezcla conlleva que la reacción de racemización sea más económica.

30 Mediante el sistema descrito se obtienen por ejemplo, los muropéptidos muro3-X (es decir, la sustitución se realiza en la posición 4) y muro4-X (es decir, la sustitución se realiza en la posición 5). 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 seleccionado de la lista que comprende D-cisteína, D-histidina, D-lisina, D-leucina, D-metionina, D-asparragina, D-glutamina, D-arginina, D-serina, D-ornitina, D-homoserina y D-norleucina. En otra realización más preferida el aminoácido es un aminoácido básico en su forma D. En una realización
5 aún 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
10 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 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

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, 1-fluoro-2-4-dinitrofenil-5-L-alanina amida).

20 Figura 2. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de BsrAh con alanina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

Figura 3. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de
25 BsrAh con cisteína y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

Figura 4. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de
30 BsrAh con histidina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

Figura 5. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de BsrAh con lisina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

Figura 6. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de BsrAh con leucina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

5

Figura 7. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de BsrAh con metionina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

10 Figura 8. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de BsrAh con asparragina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

15 Figura 9. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de BsrAh con glutamina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

20 Figura 10. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de BsrAh con arginina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

Figura 11. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de BsrAh con serina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

25

Figura 12. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de BsrAh con ornitina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

30 Figura 13. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de BsrAh con homoserina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

Figura 14. Cromatogramas obtenidos después de realizar ensayos de racemización de

BsrAh con norleucina y ser derivatizados con FDAA y analizados en el HPLC. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 340 nm.

Figura 15. Ejemplo de producción de muropéptidos. A, esquema de la reacción acoplada de la racemasa BsrAh y la Ldt (Ld-transpeptidasa) para generar muropéptidos modificados. La enzima Ldt sustituye el amino ácido terminal en los muropéptidos. Dado que esta enzima tan solo utiliza D-aminoácidos, se desplaza el equilibrio de la reacción reduciendo progresivamente el porcentaje de aminoácidos D libres. Este hecho, a su vez, implica que la racemasa BsrAh convierte L- en D-aminoácidos para restablecer constantemente el equilibrio entre enantiómeros los cuales terminarían incorporados en su totalidad en la estructura del muropéptido. Ldt corresponde a una Ld-transpeptidasa y BsrAh a la racemasa. M4 corresponde al muropéptido habitual (N-acetilglucosamina-N-acetilmurámico-L-alanina-D-glutámico-meso-Diaminopimelico-D-alanina) y M4^{aa} corresponde a un M4 en el que se ha sustituido la alanina final por un D-aminoácido. B, cromatogramas de la reacción acoplada durante dos horas con la racemasa BsrAh y la Ldt de *Vibrio cholerae*. El eje X corresponde a tiempo representado en minutos. El eje Y a Absorbancia a 204 nm.

EJEMPLOS

20

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del uso de la enzima de la invención.

Ejemplo 1: Producción y Purificación de BsrAh

25

La racemasa de amplio espectro BsrAh se expresó de forma heteróloga en *Escherichia coli* BL21 (DE3). Para ello, el gen codificante de BsrAh (codificada por el locus YP_857116 de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) fue amplificado por PCR usando para ello oligonucleótidos (colección del laboratorio de Felipe Cava: FCP345: SEQ ID NO: 2, 5'- AAACCATGGCCCCAAGAAGATCAAGCGCT - 3', oligonucleótido sentido, y FCP388: SEQ ID NO: 3, 5'- AAAAAGCTTGCGCTTGATCTTCTTGGGGTTGGTGTAGCCCCAGATG -3', oligonucleótido antisentido) que portaban sitios de restricción apropiados (XbaI, NotI) para su posterior clonaje en el vector pET28b (Novagen). Además, el oligonucleótido

reverso adicionaba una diana de restricción Not1 permitiendo la utilización de la secuencia codificante de 6 histidinas (6His) justo antes del codón de terminación, del vector pET28b. La fusión de las 6His en el extremo C-terminal de BsrAh 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, y se eluyó la enzima 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).

10

Ejemplo 2: Ensayo *in vitro* de racemización

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

15

La enzima BsrAh utilizó varios aminoácidos como sustratos (ver figuras 1 a 14) y todos ellos los transformó en su forma enantiomérica hasta alcanzar una relación 50% aproximadamente entre las formas enantioméricas, demostrándose así que la reacción era reversible. Como la reacción de racemización alcanzaba un equilibrio, esto implica que la enzima no sólo utilizó el L-aminoácidos como sustrato sino también la forma enantiomérica D, demostrándose así la utilidad tanto en la racemización de enantiómeros L como D.

20

25

Además, se utilizaron tanto enantiómeros puros como mezclas racémicas. En las mezclas racémicas se utilizaron mezclas del mismo aminoácido tanto en su forma L como en su forma D.

30

Ejemplo 3: Cuantificación de la actividad BsrAh

Para cuantificar la actividad BsrAh es necesario separar cromatográficamente las formas enantioméricas. Esto es posible gracias al reactivo de Marfey (1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida), el cual reacciona con los grupos amino primarios de los aminoácidos alterando su tiempo de retención en cromatografía en fase reversa (ver esquema en fig. 1).

Para la derivatización se siguieron las indicaciones técnicas del distribuidor (*Thermo Scientific Pierce*). La reacción tiene lugar durante 5 min a 80°C y se detiene agregando un volumen de HCl 1 M, tal y como se describe en Bhushan R y Bruckner H, 2004 *Amino Acids* 27:231-247.

Los resultados indicaron que al cabo de 5 minutos BsrAh convirtió el 50% (alcanzado el equilibrio) de los siguientes aminoácidos: Ala (fig. 2), Cys (fig. 3), His (fig. 4), Lys (fig. 5), Leu (fig. 6), Met (fig. 7), Asn (fig. 8), Gln (fig. 9), Arg (fig. 10), Ser (fig. 11), Ornitina (fig. 12), homoserina (fig. 13) y norleucina (fig. 14). Al cabo de 90 minutos se confirmó que el resto de aminoácidos naturales no fueron racemizados en modo alguno por lo que la especificidad de BsrAh queda restringida a los aminoácidos mencionados anteriormente. Entre los aminoácidos naturales no racemizados se encuentran los siguientes: glutámico, aspártico, isoleucina, valina, treonina, fenilalanina, tirosina, triptófano y prolina.

Por lo tanto, la BsrAh es una racemasa de amplio espectro. Este amplio espectro de racemización es sorprendente puesto que no es lo esperado en racemasas mono-específicas (como pueden ser las alaninas racemasas mono-específicas).

Ejemplo 4: Formación de muropéptidos

La formación de muropéptidos mediante la enzima BsrAh consistió en el intercambio del último aminoácido terminal (alanina) por otro de interés, ver figura 15, según el protocolo descrito en Cava F *et al.* 2011 *The EMBO Journal* 30:3442-3453. En la reacción se utilizó la racemasa BsrAh y una Ldt (Ld-transpeptidasa) para generar muropéptidos modificados, en la cual a partir de una mezcla racémica, (como la Ldt es

enantioespecífica para las formas D) se desplazó el equilibrio de la reacción (favoreciendo la formación del D) y se cambió la alanina terminal por el aminoácido de interés.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 como catalizador para la racemización de al menos un aminoácido seleccionado de la lista que comprende cisteína, histidina, lisina, leucina, metionina, asparragina, glutamina, arginina, serina, ornitina, homoserina y norleucina.
5
2. Uso de una enzima según la reivindicación 1 donde la identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 es de al menos un 98%.
10
3. Uso de una enzima según la reivindicación 2 donde la identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 es de al menos un 99%.
4. Uso de una enzima según la reivindicación 3 donde la enzima comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
15
5. Uso de una enzima según la reivindicación 4 donde la enzima consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
20
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el aminoácido es al menos un aminoácido seleccionado de la lista que comprende la histidina, la lisina, la arginina, la ornitina y la glutamina.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la racemización se hace a partir de una mezcla enantiomérica.
25
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la racemización se hace a partir de un enantiómero puro.
30
9. Uso según la reivindicación 8 donde el enantiómero puro es el enantiómero L.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la racemización se hace a partir de una mezcla de aminoácidos.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde la enzima se encuentra inmovilizada.
- 5 12. Método de racemización de aminoácidos que comprende poner en contacto al menos un aminoácido seleccionado de la lista que comprende cisteína, histidina, lisina, leucina, metionina, asparragina, glutamina, arginina, serina, ornitina, homoserina y norleucina con una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 10 13. Método según la reivindicación 12 donde la identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 es de al menos un 98%.
14. Método según la reivindicación 13 donde la identidad con respecto a la secuencia
15 SEQ ID NO: 1 es de al menos un 99%.
15. Método según la reivindicación 14 donde la enzima comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
- 20 16. Método según la reivindicación 15 donde la enzima consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 donde el aminoácido es
25 al menos un aminoácido seleccionado de la lista que comprende la histidina, la lisina, la arginina, la ornitina y la glutamina.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17 donde la racemización se hace a partir de una mezcla enantiomérica.
- 30 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17 donde la racemización se hace a partir de un enantiómero puro.

20. Método según la reivindicación 19 donde el enantiómero puro es el enantiómero L.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, donde la racemización se hace a partir de una mezcla de aminoácidos.

5

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21 donde la enzima se encuentra inmovilizada.

23. Método de producción de un muropéptido que comprende:

- 10 a) poner en contacto al menos un L-aminoácido seleccionado de la lista que comprende cisteína, histidina, lisina, leucina, metionina, asparragina, glutamina, arginina, serina, ornitina, homoserina y norleucina con una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 para racemizar el aminoácido a su forma D, y
- 15 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.

24. Método según la reivindicación 23 donde la identidad de la enzima con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 es de al menos un 98%.

20

25. Método según la reivindicación 24 donde la identidad de la enzima con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 es de al menos un 99%.

26. Método según la reivindicación 25 donde la enzima comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

25

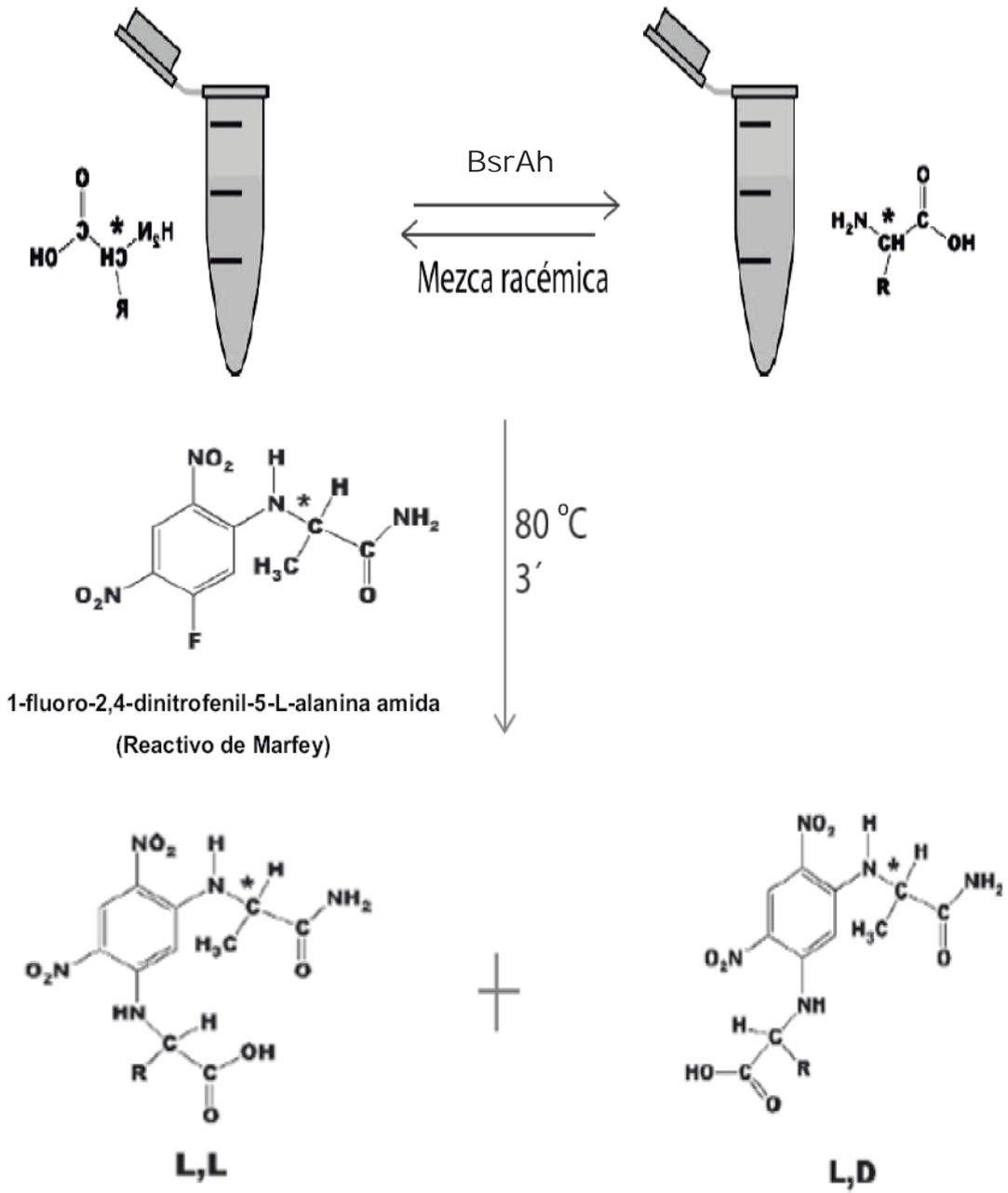
27. Método según la reivindicación 26 donde la enzima consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

30 28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27 donde el muropéptido que se sintetiza es un muropéptido no canónico.

29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28 donde el aminoácido del paso (a) se encuentra en forma de mezcla enantiomérica.

30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28 donde el aminoácido del paso (a) se encuentra en una forma enantiomérica pura.
- 5 31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 30 donde el aminoácido del paso (a) se encuentra en una mezcla de aminoácidos.

FIG 1



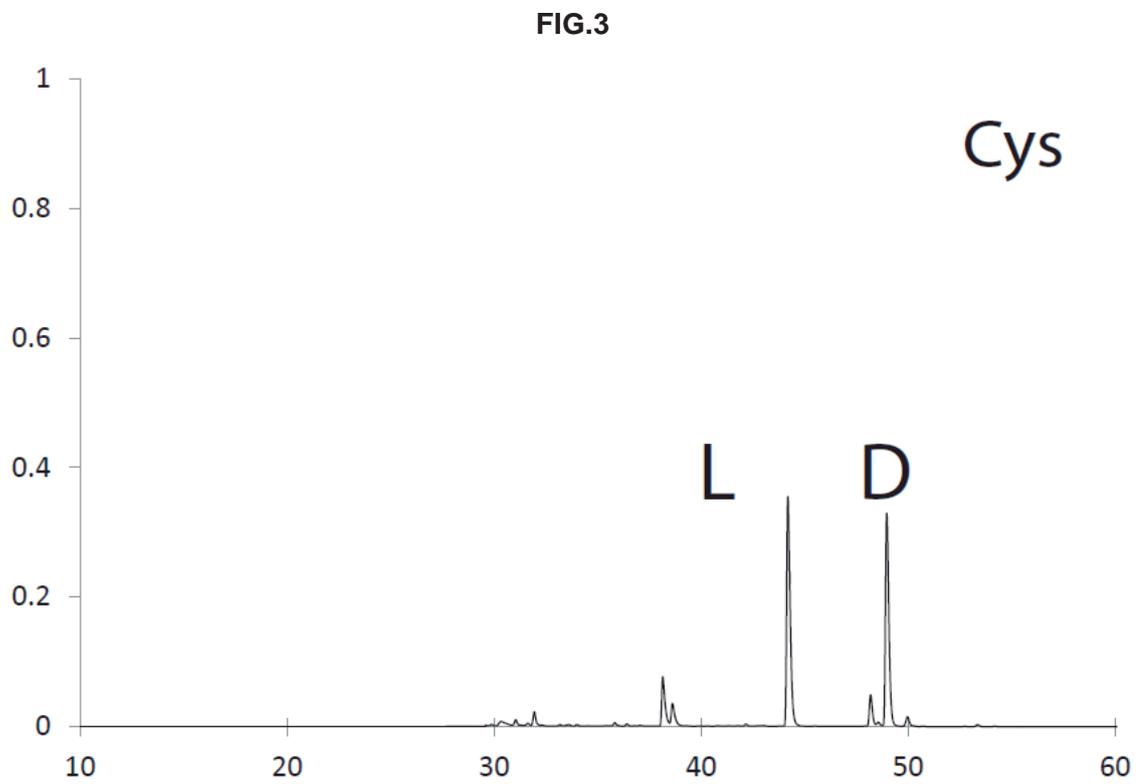
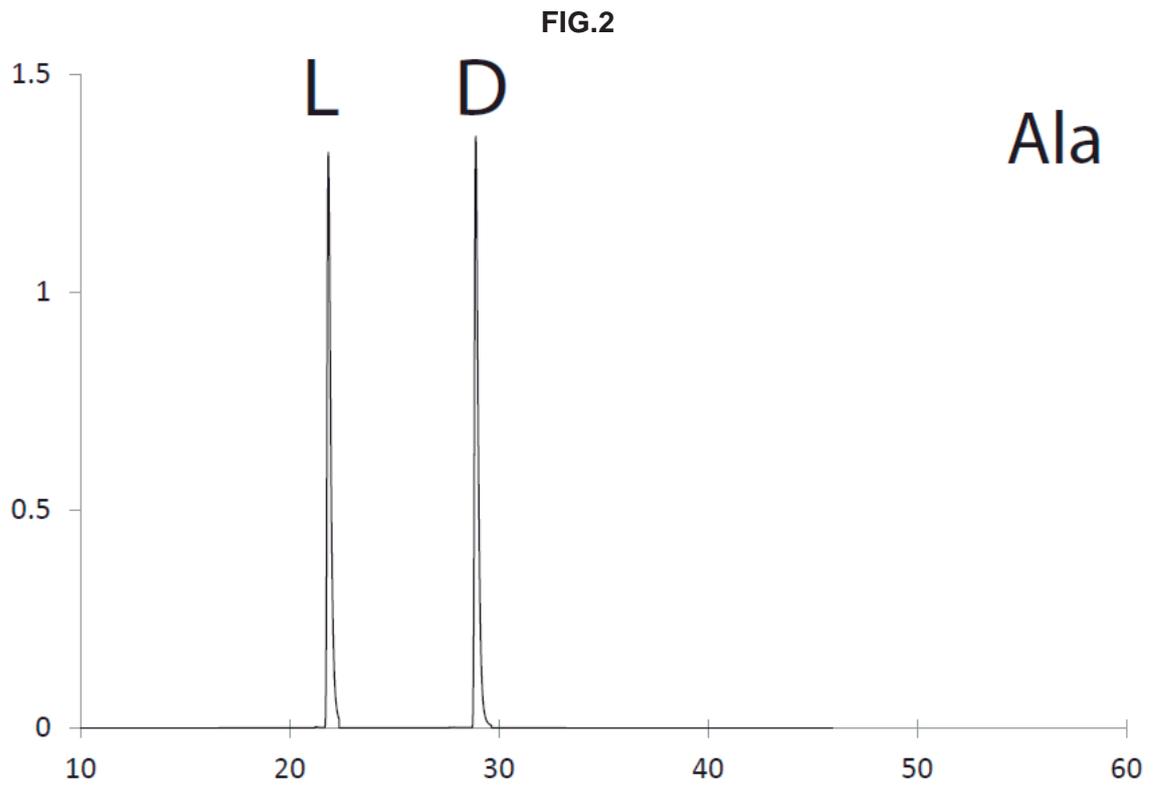


FIG.4

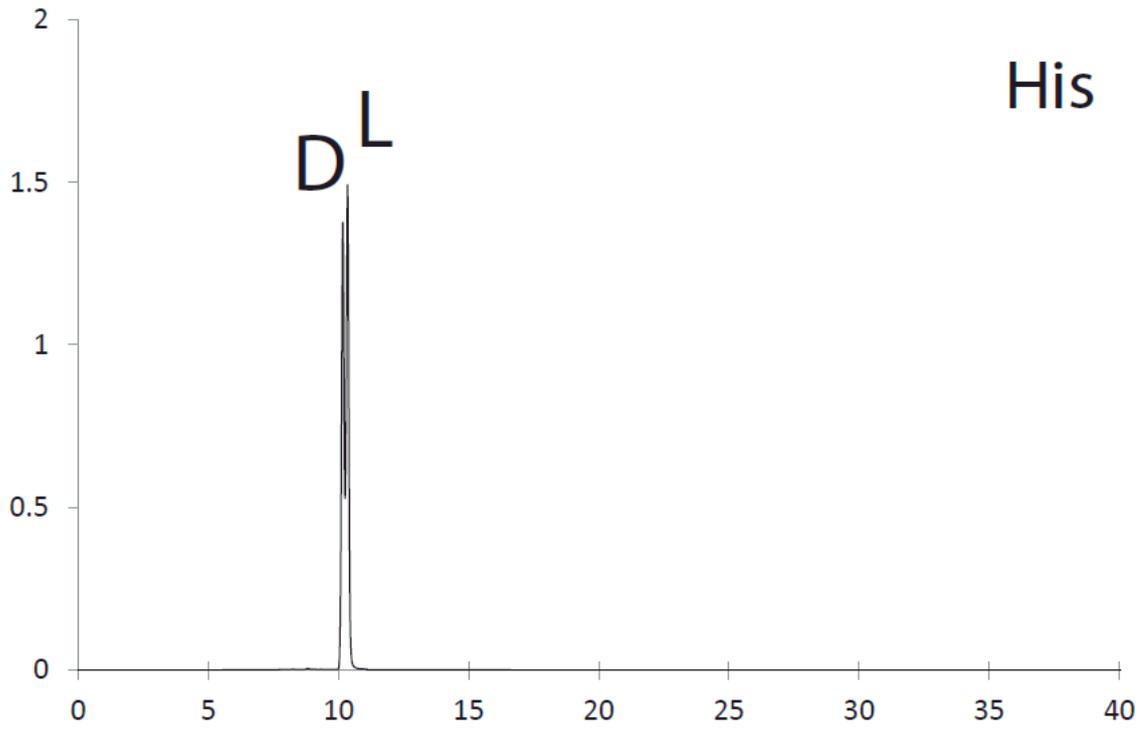


FIG.5

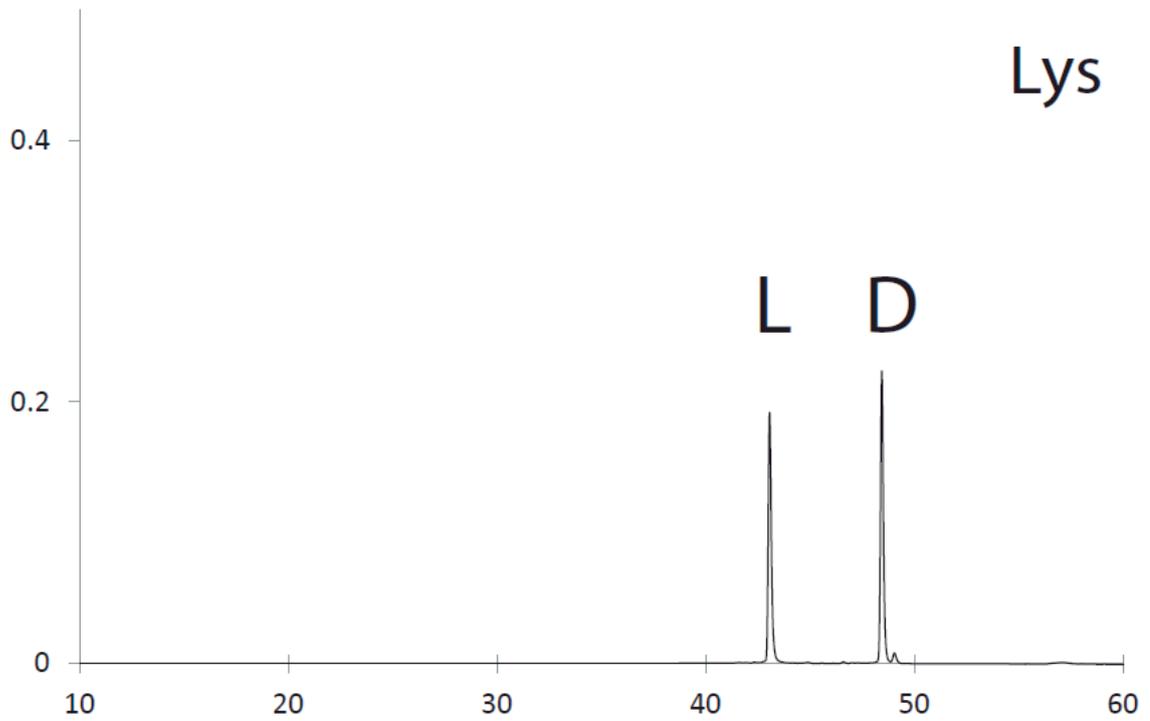


FIG.6

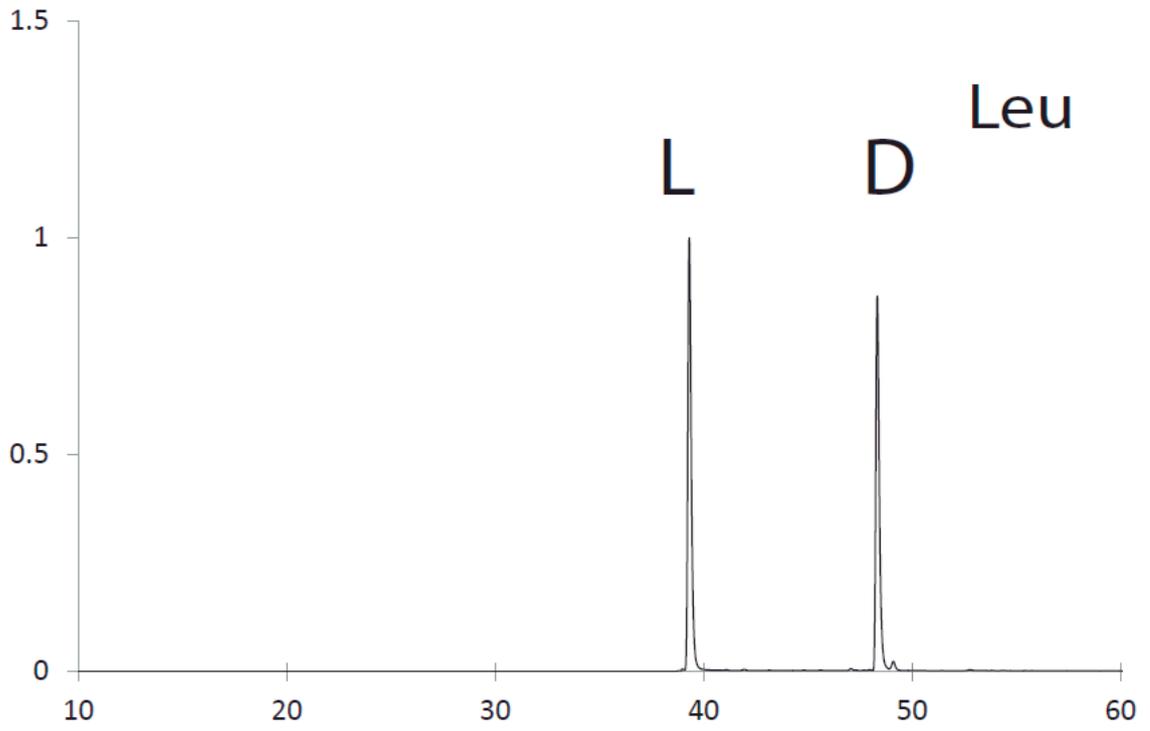


FIG.7

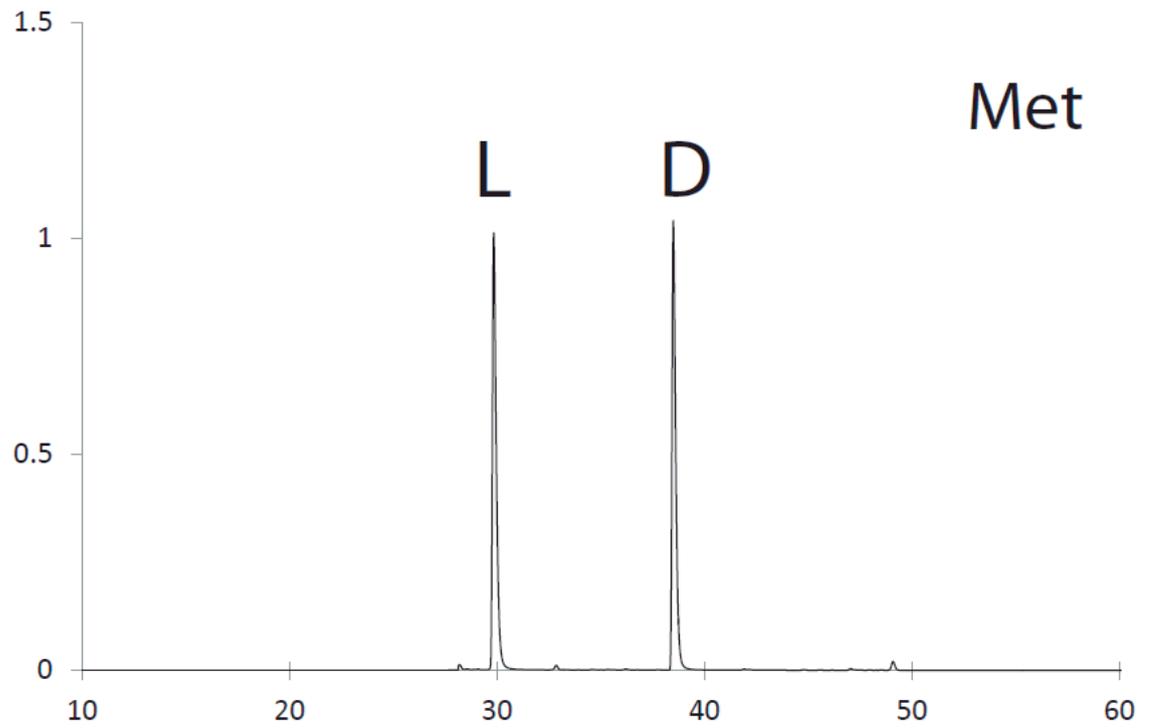


FIG.8

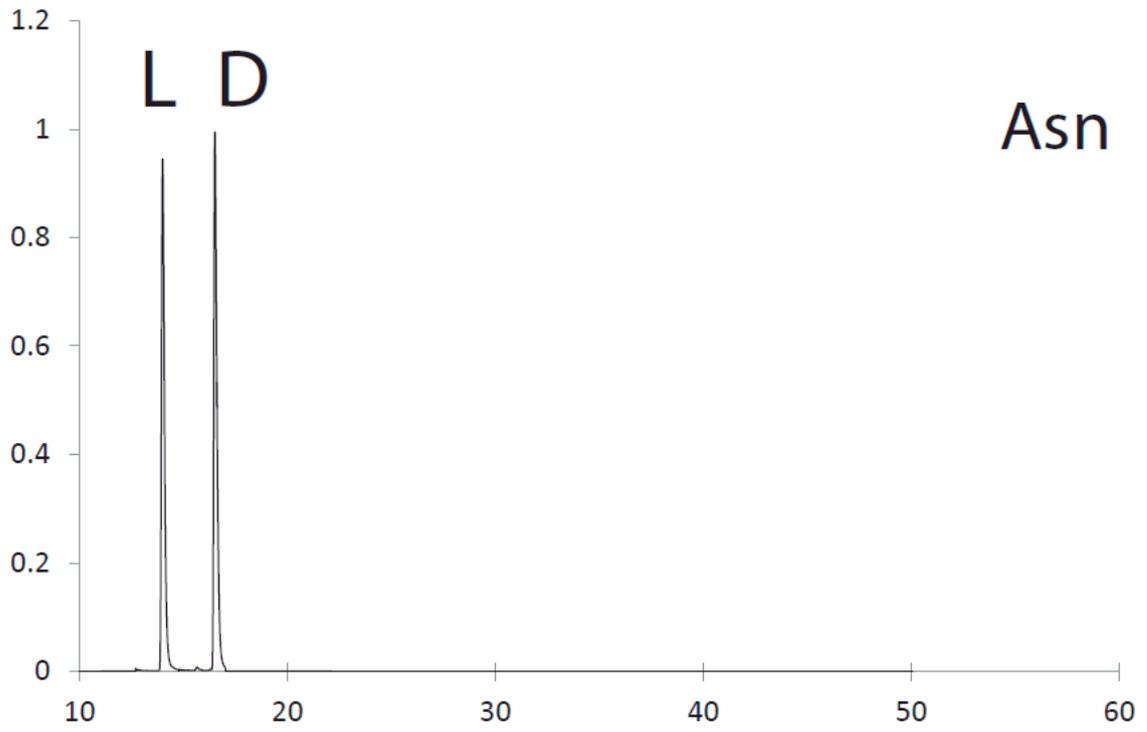


FIG.9

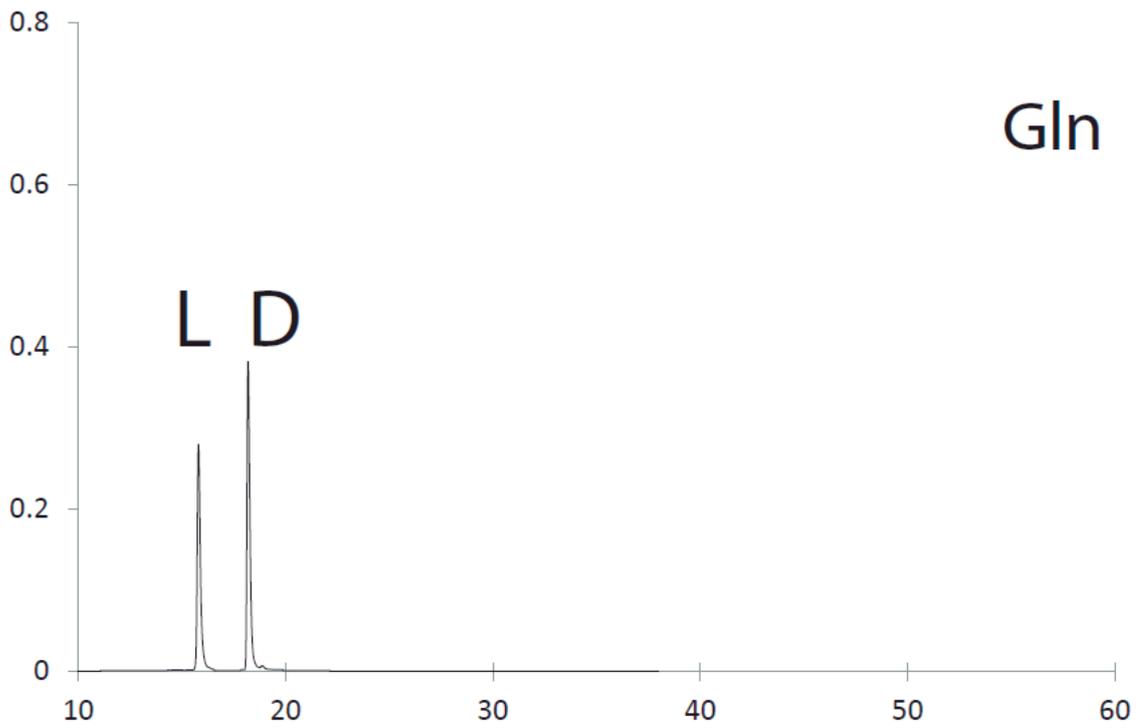


FIG.10

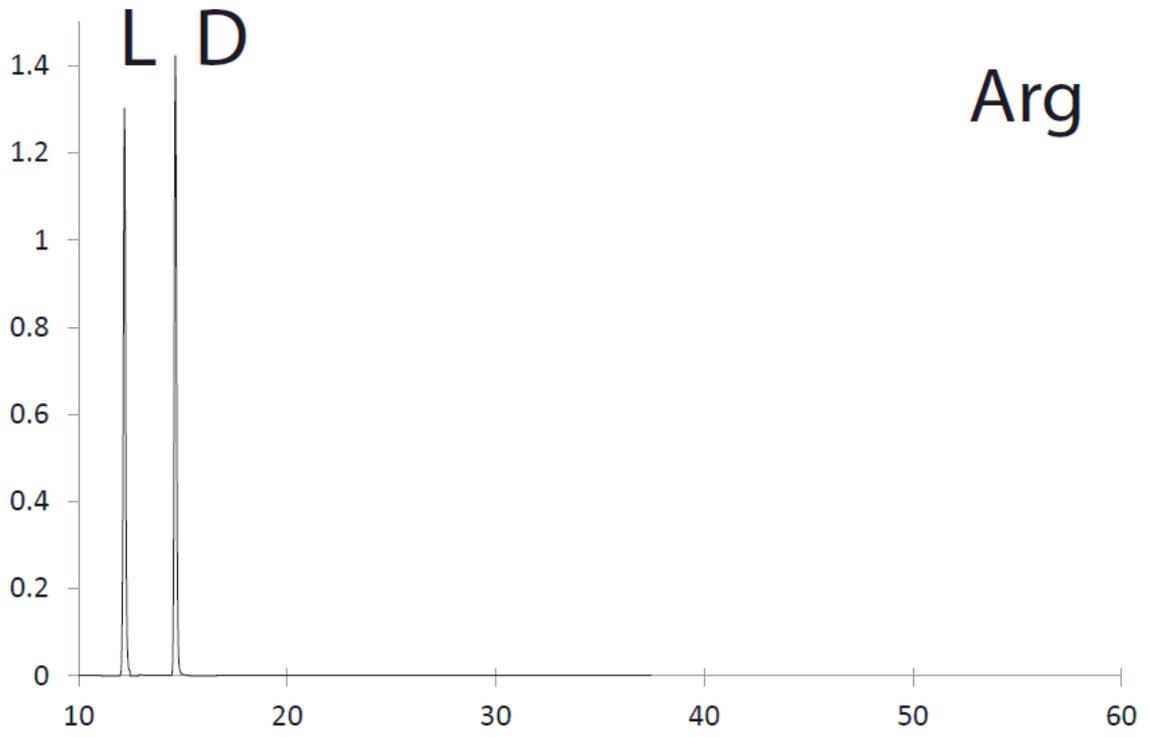


FIG.11

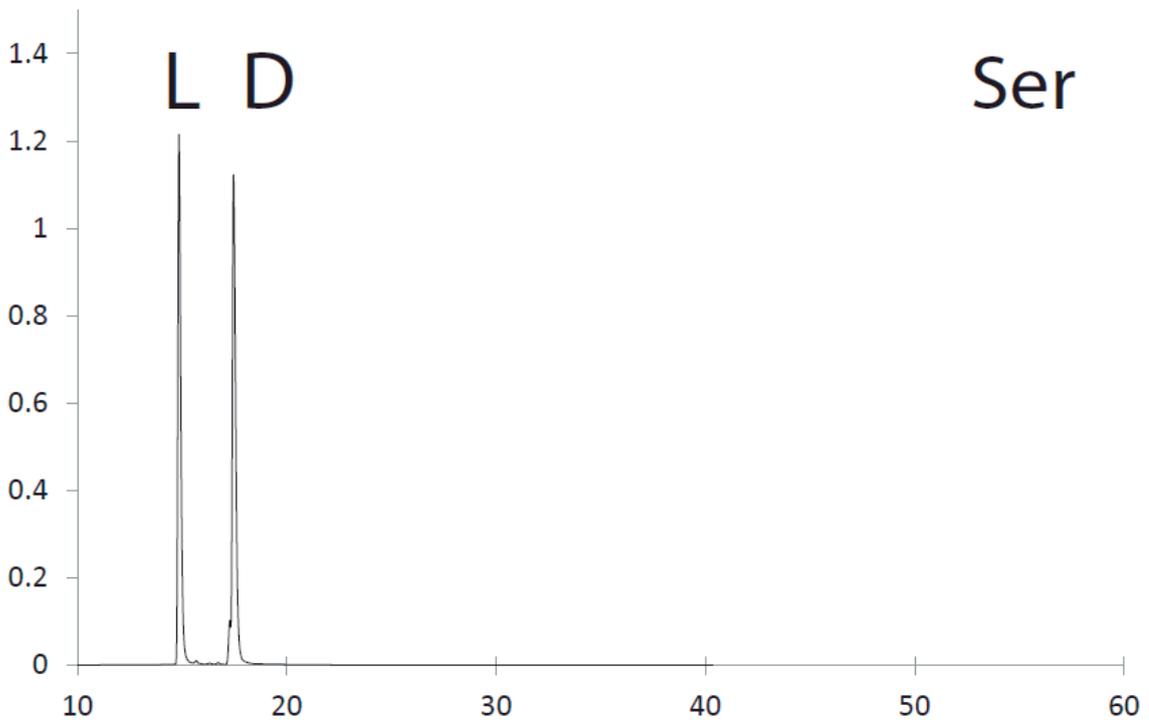


FIG.12

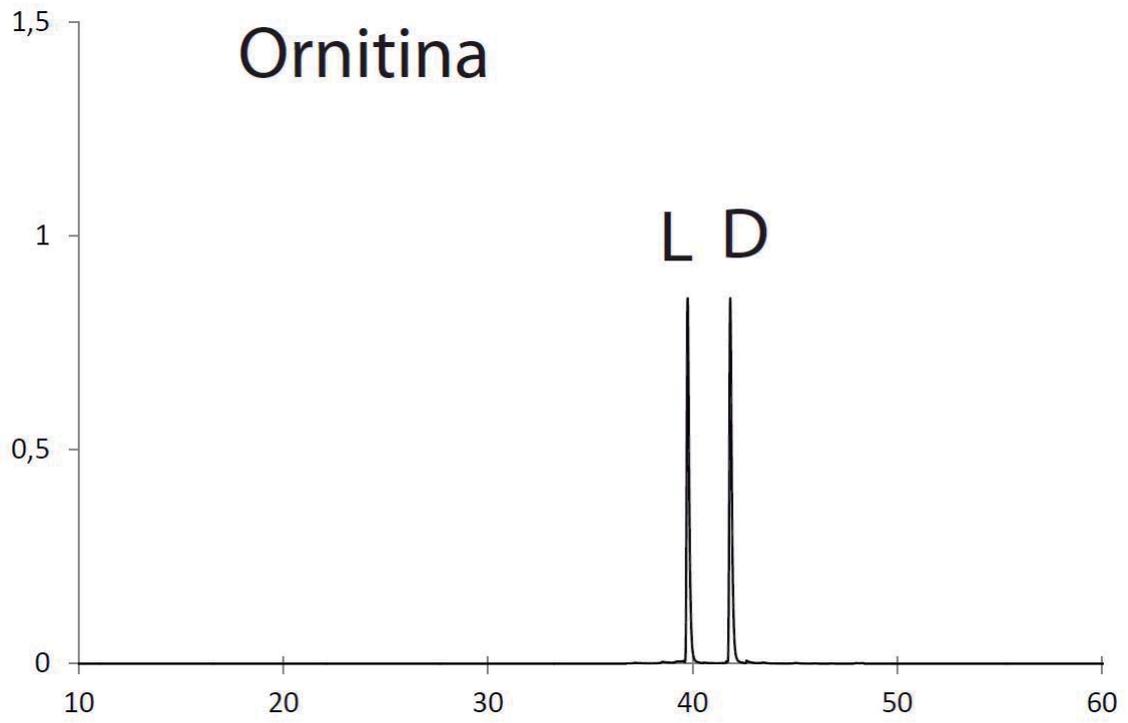


FIG.13

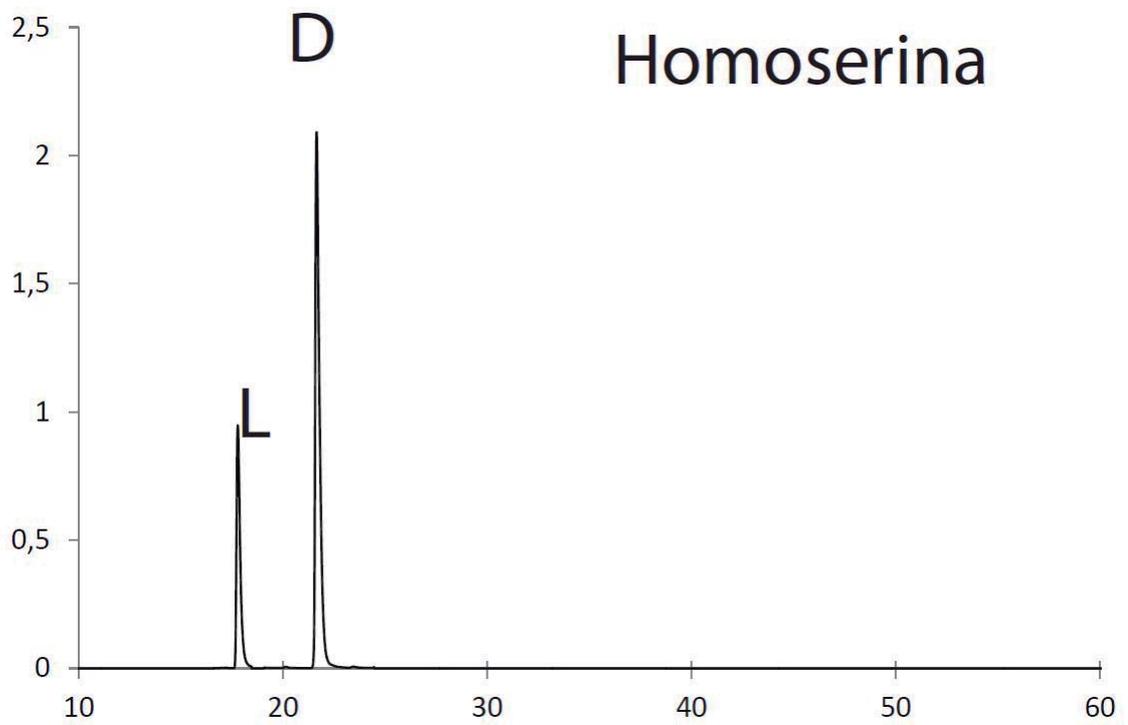


FIG.14

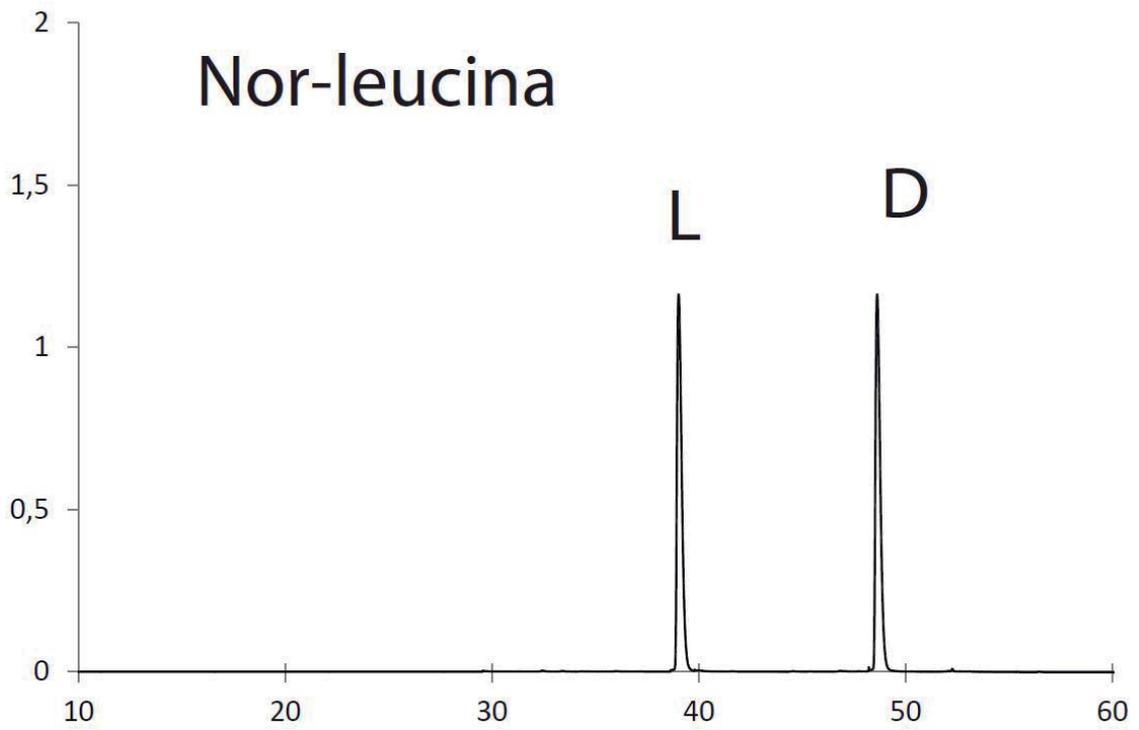


FIG.15 A

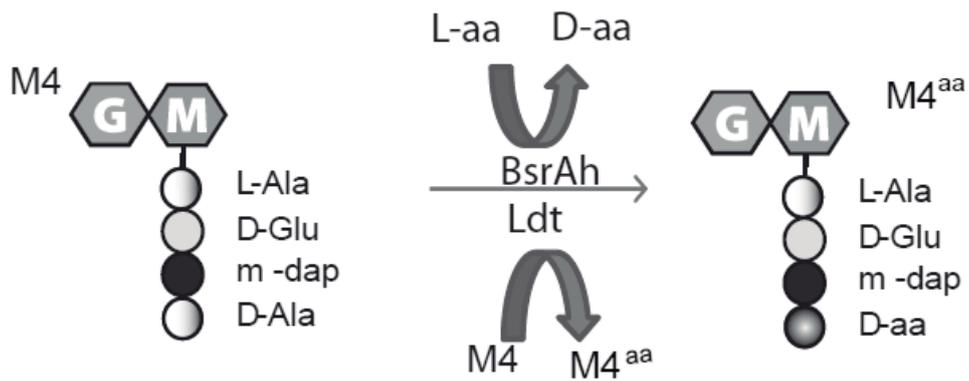
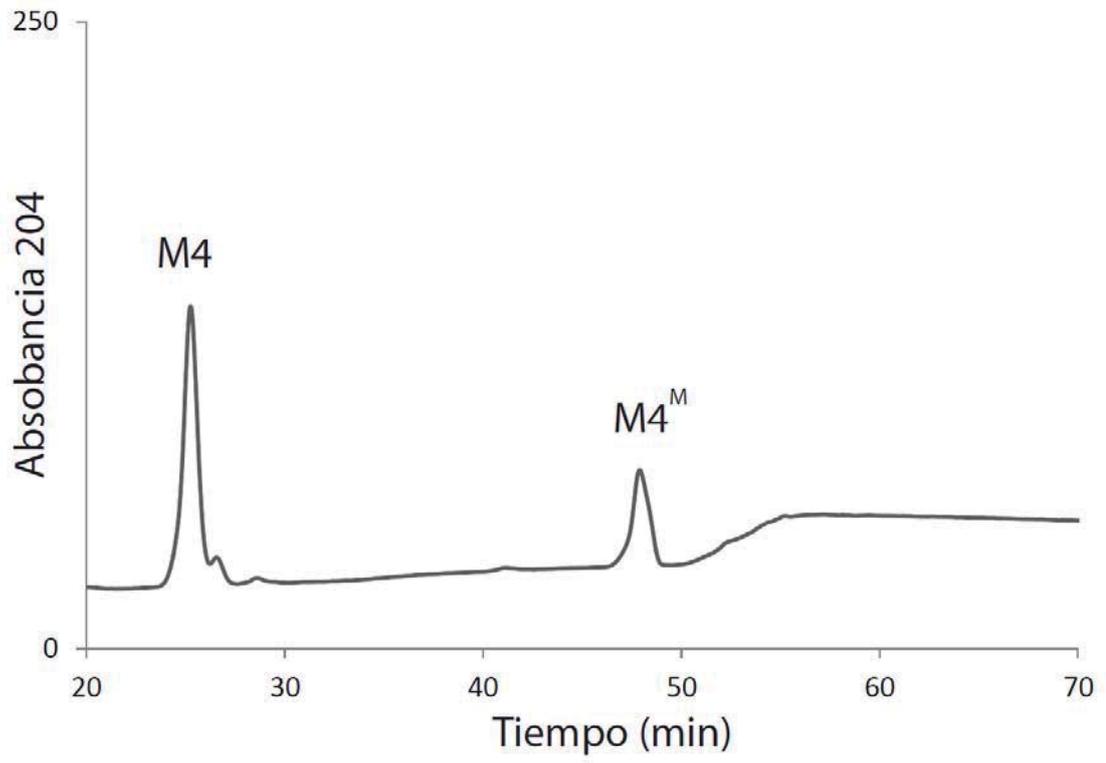


FIG.15 B



ES 2 538 720 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid
<120> Racemasa BsrAh para la racemización de aminoácidos
<130> ES1595.48
<160> 3
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 408
<212> PRT
<213> Aeromonas hydrophila
<400> 1
Met His Lys Lys Thr Leu Leu Ala Thr Leu Ile Leu Gly Leu Leu Ala
1 5 10 15
Gly Gln Ala Val Ala Ala Pro Tyr Leu Pro Leu Ala Ser Asp His Arg
20 25 30
Asn Gly Glu Val Gln Thr Ala Ser Asn Ala Trp Leu Glu Val Asp Leu
35 40 45
Gly Ala Phe Glu His Asn Ile Gln Thr Leu Lys Asp Arg Leu Gly Asp
50 55 60
Lys Gly Pro Lys Ile Cys Ala Ile Met Lys Ala Asp Ala Tyr Gly His
65 70 75 80
Gly Ile Asp Leu Leu Val Pro Ser Val Val Lys Ala Gly Ile Pro Cys
85 90 95
Ile Gly Ile Ala Ser Asn Glu Glu Ala Arg Val Ala Arg Glu Lys Gly
100 105 110
Phe Thr Gly Arg Leu Met Arg Val Arg Ala Ala Thr Pro Ala Glu Val
115 120 125
Glu Gln Ala Leu Pro Tyr Lys Met Glu Glu Leu Ile Gly Ser Leu Val
130 135 140
Ser Ala Gln Gly Ile Ala Asp Ile Ala Gln Arg His His Thr Asn Ile
145 150 155 160
Pro Val His Ile Ala Leu Asn Ser Ala Gly Met Ser Arg Asn Gly Ile
165 170 175
Asp Leu Arg Leu Ala Asp Ser Lys Glu Asp Ala Leu Ala Met Leu Lys
180 185 190
Leu Lys Gly Ile Thr Pro Val Gly Ile Met Thr His Phe Pro Val Glu
195 200 205

ES 2 538 720 A1

Glu Lys Glu Asp Val Lys Met Gly Leu Ala Gln Phe Lys Leu Asp Ser
 210 215 220

Gln Trp Leu Leu Glu Ala Gly Lys Leu Asp Arg Ser Lys Ile Thr Ile
 225 230 235 240

His Ala Ala Asn Ser Phe Ala Thr Leu Glu Val Pro Asp Ala Tyr Phe
 245 250 255

Asp Met Val Arg Pro Gly Gly Leu Leu Tyr Gly Asp Ser Ile Pro Ser
 260 265 270

Tyr Thr Glu Tyr Lys Arg Val Met Ala Phe Lys Thr Gln Val Ala Ser
 275 280 285

Val Asn His Tyr Pro Ala Gly Asn Thr Val Gly Tyr Asp Arg Thr Phe
 290 295 300

Thr Leu Lys Arg Asp Ser Trp Leu Ala Asn Leu Pro Leu Gly Tyr Ser
 305 310 315 320

Asp Gly Tyr Arg Arg Ala Leu Ser Asn Lys Ala Tyr Val Leu Ile Gln
 325 330 335

Gly Gln Lys Val Pro Val Val Gly Lys Thr Ser Met Asn Thr Ile Met
 340 345 350

Val Asp Val Thr Asp Leu Lys Gly Val Lys Pro Gly Asp Glu Val Val
 355 360 365

Leu Phe Gly Arg Gln Gly Glu Ala Glu Val Lys Gln Ala Asp Leu Glu
 370 375 380

Glu Tyr Asn Gly Ala Leu Leu Ala Asp Met Tyr Thr Ile Trp Gly Tyr
 385 390 395 400

Thr Asn Pro Lys Lys Ile Lys Arg
 405

<210> 2
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sentido

<400> 2
 aaaccatggc cccaagaaga tcaagcgct

29

<210> 3
 <211> 46
 <212> DNA

ES 2 538 720 A1

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido antisentido

<400> 3

aaaaagcttg cgcttgatct tcttgggggtt ggtgtagccc cagatg

46



- ②① N.º solicitud: 201331891
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.12.2013
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P13/04** (2006.01)
C12P21/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2012164697 A1 (BRAZEAU BRIAN J et al.) 28.06.2012, especialmente párrafos 18,80,387.	1-22
A	BASE DE DATOS [online] UniProtKB/TrEMBL. Número de acceso: A0KLG5, 13.11.2013. [recuperado el 07.04.2015]. Recuperado de internet: < http://www.uniprot.org/uniprot/A0KLG5.txt?version=53 >, todo el documento.	1-22
A	LAM, H et al. D-amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Re-Modeling in Bacteria. PMC. 2010 [on-line], páginas 1-8 y material suplementario. [Recuperado el 07.04.2015]. Recuperado de internet: < http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC2759711&blobtype=pdf >, especialmente página 3; figura 4A; tablas S2 y S3.	1-22
A	CAVA, F et al. Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. The EMBO Journal. 2011, vol. 30 (16), páginas 3442-3453, especialmente páginas 3442-3444,3452.	23-31

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
16.04.2015

Examinador
J. Collado Martínez

Página
1/5

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

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, TXPUS, NPL, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI-EMBL, NCBI, DGENE.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.04.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-31	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-31	SI
	Reivindicaciones	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	US 2012164697 A1 (BRAZEAU BRIAN J et al.)	28.06.2012
D02	BASE DE DATOS [online] UniProtKB/TrEMBL. Número de acceso: A0KLG5.	13.11.2013
D03	LAM, H et al. PMC. 2010 [on-line], páginas 1-8 y material suplementario.	2010
D04	CAVA, F et al. The EMBO Journal. 2011, vol. 30 (16), páginas 3442-3453.	2011

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 solicitud tiene por objeto el uso de una alanina-racemasa de *Aeromonas hydrophila* para la racemización de al menos uno de los siguientes aminoácidos: cisteína, histidina, lisina, leucina, metionina, asparragina, glutamina, arginina, serina, ornitina, homoserina y norleucina. Asimismo, la solicitud se refiere a un método de producción de un muropéptido, que comprende la obtención de la forma D de al menos uno de los aminoácidos anteriores mediante el empleo de la citada racemasa de *A. hydrophila*.

El documento D01 menciona el posible uso de una aminoácido-racemasa de *A. hydrophila* con amplia especificidad de sustrato para la obtención de D-triptófano a partir de L-triptófano (ver párrafos 18, 80 y 387).

El documento D02 divulga las características de la enzima alanina-racemasa de *A. hydrophila* anotadas en una base de datos de secuencias biológicas (ver todo el documento).

El documento D03 divulga la capacidad de *A. hydrophila* de producir algunos D-aminoácidos distintos de la alanina (ver página 3; figura 4A; tablas S2 y S3).

El documento D04 se refiere a un estudio sobre la incorporación de D-aminoácidos no canónicos (siglas inglesas NCDAAs) al peptidoglicano (ver páginas 3442-3444, 3452).

NOVEDAD (art. 6.1 de la LP 11/1986)

Reivindicaciones 1-22

Los documentos del estado de la técnica más cercanos al objeto de la reivindicaciones independientes 1 y 12 son D01, D02 y D03. Los documentos D01 y D02 divulgan una alanina-racemasa de *A. hydrophila*, que presenta una secuencia con un 100 % de identidad con la SEQ ID NO:1 de la presente solicitud. Además, ambos documentos sugieren que la citada racemasa poseería una amplia especificidad de sustrato. Por su parte, el documento D03 hace referencia al locus *AHA_2607*, que corresponde precisamente a la alanina-racemasa de *A. hydrophila* que posee un 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1. Adicionalmente, este último documento menciona la producción por parte de *A. hydrophila* de D-isoleucina, D-leucina y D-metionina. Sin embargo, D03 no indica expresamente que la enzima responsable de la producción de esos tres D-aminoácidos sea la citada racemasa del locus *AHA_2607*.

De lo expuesto se sigue que ninguno de los tres documentos anteriores divulgaría las características de las reivindicaciones 1 ó 12, por cuanto no mencionan el uso particular de la alanina-racemasa de *A. hydrophila* para la racemización de cisteína, histidina, lisina, leucina, metionina, asparragina, glutamina, arginina, serina, ornitina, homoserina o norleucina. Por lo tanto, el objeto de dichas reivindicaciones independientes 1 y 12, y el de sus reivindicaciones dependientes 2-11 y 13-22, cumpliría con el requisito de novedad establecido en el art. 6.1 de la LP 11/1986.

Reivindicaciones 23-31

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación independiente 23 es D04. Dicho documento divulga un método de producción de un muropéptido que comprende obtener NCDAAs (como, por ejemplo, D-metionina y D-leucina) a partir de L-aminoácidos mediante el empleo de una racemasa y, posteriormente, poner en contacto dichos NCDAAs con un muropéptido y una L, D transpeptidasa y/o una ligasa. Sin embargo, D04 no anticipa de forma idéntica o implícita todas las características del método objeto de la reivindicación 23, ya que en D04 no se hace mención al empleo de una racemasa particular con una identidad de secuencia de al menos el 95% con la SEQ ID NO:1 de la presente solicitud. Por lo tanto, se considera que la reivindicación independiente 23 y sus reivindicaciones dependientes 24-31 satisfarían el requisito de novedad del art. 6.1 de la LP 11/1986.

ACTIVIDAD INVENTIVA (art. 8.1 de la LP 11/1986)

Reivindicaciones 1-22

Como ya se ha indicado, la diferencia entre los documentos D01, D02 y D03 y el objeto de las reivindicaciones independientes 1 y 12 es que dichos documentos del estado de la técnica no mencionan de forma expresa que la enzima alanina-racemasa de *A. hydrophila*, que posee un 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 de la presente solicitud, pueda emplear como sustratos al menos uno de los aminoácidos particulares definidos en las citadas reivindicaciones, a saber: cisteína, histidina, lisina, leucina, metionina, asparragina, glutamina, arginina, serina, ornitina, homoserina y norleucina. A este respecto, los inventores han llevado a cabo una serie de experimentos y análisis para determinar qué aminoácidos, alternativos a la alanina, pueden servir como sustratos de la alanina-racemasa de *A. hydrophila*. Así pues, se considera que el uso particular de dicha enzima para la racemización de cisteína, histidina, lisina, leucina, metionina, asparragina, glutamina, arginina, serina, ornitina, homoserina y/o norleucina, no resultaría obvio para un experto en la materia a la vista meramente de lo divulgado en D01, D02 ó D03, ni tampoco combinando las enseñanzas de dichos documentos.

En conclusión, el objeto de las reivindicaciones independientes 1 y 12, y consecuentemente el de sus reivindicaciones dependientes 2-11 y 13-22, cumpliría con el requisito de actividad inventiva establecido en el art. 8.1 de la LP 11/1986.

Reivindicaciones 23-31

La diferencia esencial entre el documento D04 y el objeto de la reivindicación independiente 23 consiste, como ya se ha indicado anteriormente, en que D04 no divulga un método que comprenda el uso de una racemasa con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO:1. Por otra parte, el uso de esta racemasa concreta se considera, como se acaba de exponer, inventivo, y ello conferiría actividad inventiva al método de las reivindicaciones 23-31 que comprende dicho uso (art. 8.1 de la LP 11/1986).