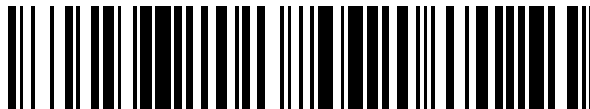


19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 578 812**

21 Número de solicitud: 201530116

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)**C12P 7/46** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.01.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.08.2016

71 Solicitantes:

**BIOLAN MICROBIOSENSORES S.L. (100.0%)
Parque Tecnológico de Bizkaia Edificio 409
48970 Zamudio (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ RIOJA, Roberto ;
MAZA DEL RÍO, Sonia;
ALONSO RODRÍGUEZ, Pablo ;
CASTAÑÓN DE LA TORRE, Sonia y
CRESPO SUSPERREGUI, Ainara**

74 Agente/Representante:

URÍZAR BARANDIARAN, Miguel Ángel54 Título: **Proceso de purificación y estabilización de la enzima malato quinona oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no; y su uso como elemento de reconocimiento biológico**

57 Resumen:

Proceso de purificación y estabilización de la enzima malato quinona oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no, a partir de *Acetobacter acetii* y *Pseudomonas aeruginosa* y su uso como elemento de reconocimiento biológico en dispositivos de medida para la determinación del ácido málico en muestras de interés y/o para la producción de isoformas recombinantes mutantes.

El proceso comprende las fases de donación, expresión y purificación. La fase de donación incluye la subclonación para formar una proteína fusionada que facilite su posterior purificación.

La enzima obtenida codifica para la proteína Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO) de *Acetobacter acetii* y *Pseudomonas aeruginosa*.

La subclonación es autorreplicable y sirve para expresar el ADN de la encima y para producir la proteína.

El organismo hospedador transformado con la subclonación puede ser tanto eucariota como procarionta; es capaz de autorreplicarse, y sirve tanto para expresar el ADN de la encima como para producir la proteína.

El método de purificación de la proteína comprende su aislamiento a partir del cultivo o a partir de las células.

ES 2 578 812 A1

DESCRIPCIÓN

PROCESO DE PURIFICACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LA ENZIMA MALATO QUINONA OXIDOREDUCTASA (MQO, EC 1.1.5.4) RECOMBINANTE O NO; Y SU USO COMO ELEMENTO DE RECONOCIMIENTO BIOLÓGICO.

ESTADO DEL ARTE

5 Frente a los métodos analíticos convencionales (HPLC con varios detectores, espectrofotometría de absorción atómica, polarografía...etc.) los métodos bioanalíticos han experimentado un gran interés gracias a la alta selectividad de los elementos de reconocimiento biológico. El ejemplo más relevante de este aumento de interés es la invención revolucionaria de los biosensores desde 1962 gracias a los trabajo de Clark y Lyon [L.C. Clark and C. Lyons, Ann. NY. Acad. Sci 120
10 (1962) 29]. Son dispositivos compactos que se basan en la integración íntima de elementos de reconocimiento biológico (ERB) en un sistema de transducción de la señal física [D.R Thévenot et al Pure. Appl. Chem 71(1999)2333]. El desarrollo de estos dispositivos pasa de forma genérica por tres líneas de investigación: la elección del sistema de transducción de la señal física adecuado, la inmovilización y/o la integración de este elemento de reconocimiento en la superficie sensora, y la
15 correlación de la señal generada con la presencia del analito de interés. Estos dispositivos compactos sufren la presencia de interferentes presentes en la matriz, lo que se puede paliar mediante desarrollos quimiométricos o aplicando al biosensor materiales compatibles con el ERB.

En el bagaje bibliográfico actual se pueden encontrar muchas invenciones centradas en esta última aproximación, la aplicación de capas protectoras que sirven tanto para proteger los ERBs
20 de los posibles inhibidores como al sistema de transducción de la señal de los interferentes. De hecho se ha usado con abundancia y con mucho éxito polímeros biocompatibles como son el acetato de celulosa [H. Gunasingham et al, Biosensors 4 (1989)349; X. Ren et al Colloids Surf B Biointerfaces 72 (2009)188; R. Vaidya and E. Wilkins, Electroanalysis 6 (1994) 617; L.N. Wu et al Electrochim. Acta 51 (2006) 1208], el quitosano [J. Lin et al Sensors Actuators B: Chem 137 (2009)
25 768; S. Hikima et al, Fereseniu's. J. Anal. Chem 345 (1993) 607; H. Yu et al, Anal. Biochem 331 (2004) 98; G. Wang et al Biosens. Bioelectron 18 (2003) 335; X. Kang et al Biosens. Bioelectron (2009) 901; J. Chem, Electroanalysis 18 (2006) 670] y el Nafion [J. Wang et al, J. Am. Chem. Soc 125(2003) 2408; S. H. Lim, Biosens. Bioelectron 20 (2005) 2341; Y-C. Tsai et al Langmuir 21 (2005) 3653; A. A Karyakin et al, Anal. Chem 72 (2000) 1720; M].

30 Por otro lado, la aplicación de enzimas producidas bajo determinadas condiciones sobre la superficie eléctrica puede aumentar la durabilidad y reproducibilidad de las determinaciones realizadas por el biosensor. Por esa razón, se ha procurado producir y purificar la enzima MQO manteniendo en la medida de lo posible intactas sus características físico-químicas originales. De esa forma, la enzima obtenida mediante el protocolo objeto de esta invención ha presentado un

Por otro lado, la aplicación de enzimas producidas bajo determinadas condiciones sobre la superficie electródica puede aumentar la durabilidad y reproducibilidad de las determinaciones realizadas por el biosensor. Por esa razón, se ha procurado producir y purificar la enzima MQO manteniendo en la medida de lo posible intactas sus características físico-químicas originales. De esa forma, la enzima obtenida mediante el protocolo objeto de esta invención ha presentado un rendimiento, grado de pureza, estabilidad y especificidad superiores a cualquier otra descrita hasta el momento [Goldie et al. 1978; Molenaar et al. 1998; Kretzschmar et al. 2002; Gurban et al. 2006; Bucur et al. 2006].

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se ha centrado en una aproximación totalmente novedosa para evitar problemas de inhibición de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, 1.1.5.4), protegerla y darle cierta durabilidad a temperatura ambiente en una matriz típicamente compleja como es el vino o el mosto de uva. Es destacable el hecho de que la sensibilidad a ciertos inhibidores e interferentes de las enzima puede depender del organismo de donde se extrae este elemento de reconocimiento biológico, de su proceso de purificación e incluso de los estabilizantes necesarios para mantener una cierta conformación estructural de la proteína. Se ha conseguido la clonación, expresión y purificación de la enzima MQO de *Acetobacter aceti* y *Pseudomonas aeruginosa* en su forma recombinante y su estabilización en una disolución específica.

Para llegar a este punto, previamente hemos testado el enzima MQO de diferentes organismos entre los que se encuentran los procedentes de *Acetobacter aceti*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Corynebacterium glutamicum*, entre otros. Pues bien, hemos testado tanto su actividad como su estabilidad en el tiempo con los siguientes resultados:

	Actividad específica (U/mg)	Estabilidad a 4°C
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	50	2 días
<i>Acetobacter aceti</i>	350	30 días
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	175	10 días

En la tabla se representan los valores de actividad específica (unidades enzimáticas por miligramo de proteína), así como la estabilidad del enzima almacenado a 4°C, en días (reteniendo más del 90% de la actividad inicial).

Se utiliza una mezcla de *Acetobacter aceti* y *Pseudomonas aeruginosa* los resultados son intermedios a los indicados en la tabla, y en cualquier caso sorprendentemente mejores que lo conseguidos a partir del *Corynebacterium glutamicum* de Molenaar.

Los porcentajes de cada uno de los dos organismos en la mezcla pueden ir desde el 0% al 100%.

- 5 Como aplicación se han fabricado biosensores con simple retención física sobre una base conductora de una alícuota líquida de esta enzima mediante una membrana de diálisis junto con el mediador químico; sin aplicación de ninguna matriz de inmovilización ni un protector. El dispositivo de medida resultante (por ejemplo, un biosensor) ha demostrado satisfactoria selectividad y estabilidad al ácido málico como sustrato en matrices típicamente complejas como son el vino
- 10 (muy rico en taninos y sulfitos) o/y el mosto de uva (con elevado grado de glucosa y ácido ascórbico por ejemplo).

Así mismo, es objeto de la invención el uso de la enzima, obtenida de acuerdo con el proceso anteriormente descrito, como elemento de reconocimiento biológico para el desarrollo de dispositivos de medida del sustrato enzimático ácido málico.

- 15 También es objeto del invento el uso de la enzima, obtenida de acuerdo con el proceso anteriormente descrito, para medir los valores de ácido málico en muestras alimentarias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- El presente invento preconiza un proceso de clonación, expresión, purificación y estabilización de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, 1.1.5.4) recombinante de *Acetobacter aceti* y/o
- 20 *Pseudomonas aeruginosa*.

1. Clonación de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, 1.1.5.4).

- La síntesis del gen de MQO de *Acetobacter aceti* y *Pseudomonas aeruginosa* se lleva a cabo mediante la utilización de oligonucleótidos sintéticos y/o productos de PCR. Las moléculas de ADN recombinante de 1563 (GenBank: DQ674275.1) y 1569 (EMBL-Bank: AE004091.2) pares de
- 25 bases (pb) resultantes, de *Acetobacter aceti* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, se clonan en un vector de clonación usando los sitios de restricción adecuados y su integridad verificada mediante secuenciación.

1.1. Subclonación de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, 1.1.5.4).

- La subclonación del gen de MQO obtenido, se lleva a cabo en un vector de expresión con origen
- 30 de replicación procariota mediante clonaje independiente de ligación (LIC). Tras verificación

mediante secuenciación, la construcción está ya preparada para inducir la expresión del gen de interés.

2. Expresión de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, 1.1.5.4) de *Acetobacter acetii* y *Pseudomonas aeruginosa*.

5 Los sistemas de expresión (vectores de expresión y organismos hospedadores) se pueden clasificar en dos grandes categorías: procariotas y eucariotas. Los sistemas de expresión procariotas son generalmente mucho más fáciles para trabajar y son útiles en la mayoría de las aplicaciones, sin embargo tienen importantes limitaciones para expresar proteínas eucariotas completamente funcionales. Esto es debido a que no realizan sobre las proteínas la mayoría de
10 las modificaciones postraduccionales que realizan las células eucariotas y que permiten a las proteínas ser plenamente funcionales.

Existe una gran diversidad de vectores de expresión de proteínas heterólogas. En la presente invención se ha sobreexpresado el gen de la MQO de *Acetobacter acetii* y *Pseudomonas aeruginosa* para formar una proteína fusionada que facilite su posterior purificación. La expresión
15 de este vector se basa en la interacción de la ARN polimerasa del fago T7 con un promotor específico del mismo fago (promotor del gen f10), que es colocado delante del fragmento que queremos expresar. La expresión de la ARN polimerasa de T7, se induce con IPTG, lo cual desencadena la expresión del gen de MQO previamente descrito.

Para la expresión de la cadena polipeptídica recombinante correspondiente, 521 y 523 aminoácidos, en los casos de *Acetobacter acetii* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente, el
20 IPTG se añadió, a concentraciones entre 0.02-1 mM, a un cultivo crecido en medio nutritivo (LB o TB) con ampicilina (100-200 mg/ml), a una densidad óptica a 600 nm. entre 0.6-1. Esta adición provoca la expresión del gen de la MQO clonado detrás del promotor inducible por IPTG.

Estos vectores de expresión han de ser previamente introducidos en un organismo hospedador
25 (transformación) que aporta la maquinaria celular necesaria para la expresión del gen de MQO y la consiguiente formación de la cadena polipeptídica recombinante. A su vez facilitará el correcto plegamiento de dicha cadena para dar lugar a la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa con capacidad catalítica. El organismo hospedador ha de poseer componentes celulares que reconozcan específicamente las dianas de expresión del vector previamente introducido y que
30 porta la secuencia del gen MQO. El organismo hospedador transformado con la subclonación de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa puede ser tanto eucariota como procariota: es capaz de autorreplicarse en dicho organismo y sirve tanto para expresar el ADN de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa como para producir la proteína Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO) de *Acetobacter acetii* y/o *Pseudomonas aeruginosa* en el hospedador.

El organismo hospedador puede ser *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* y/o *Streptomyces sp.*

3. Purificación de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, 1.1.5.4) de *Acetobacter acetii* y *Pseudomonas aeruginosa*

5 El gen de interés (MQO) se encuentra clonado dentro de un vector de expresión que permite la fusión con el gen que codifica para la proteína glutatión-s-transferasa (GST) o una cola en el extremo C o N-terminal de 6 histidinas consecutivas. En el primer caso, la proteína de fusión tiene la capacidad de unirse específicamente a una resina que contenga glutatión agarosa, pues la GST es una enzima que utiliza como sustrato el glutatión. La sensibilidad de esta enzima es muy alta, lo cual permite que esta proteína fusión, pueda ser purificada en un solo paso en una columna de afinidad muy eficientemente.

Análogamente ocurre en el caso de que la proteína de fusión contenga 6 moléculas de histidinas terminales. La cromatografía de afinidad consiste en este caso en una fase sólida compuesta por una resina que pueda contener cationes divalentes de Níquel, cobalto, cobre, hierro o zinc.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

15 Para una mejor comprensión de la presente invención, se exponen los siguientes ejemplos, descritos en detalle, que deben entenderse sin carácter limitativo del alcance de la presente invención.

1.1 Clonación de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, 1.1.5.4) de *Acetobacter acetii*

20 1.1.1 Construcción del plásmido recombinante pET41 EK/LIC-MQO

Para la expresión de la enzima malato quinona oxidoreductasa (MQO) de *Acetobacter acetii* en *Escherichia coli*, como proteína de fusión con GST, se usó el vector procariótico pET41 EK/LIC (Novagen). Dicho vector está diseñado para una clonación dirigida y rápida de productos de PCR amplificados, para una posterior expresión de polipéptidos fusionados con las secuencias N-terminales GST•Tag, His•Tag y S•Tag. Utilizando cebadores diseñados específicamente para la amplificación y el vector pET41 EK/LIC, los insertos pueden ser clonados eficientemente sin necesidad de las etapas de digestión y ligación.

Se diseñaron cebadores específicos para la amplificación por PCR del gen MQO de *Acetobacter acetii* atendiendo a las instrucciones del fabricante. Como molde se utilizó un plásmido pMQ-RQ que contenía el cDNA codificante de la enzima MQO de *Acetobacter acetii*. La subclonación del gen de la MQO se lleva a cabo en un vector de expresión mediante clonaje independiente de ligación (LIC). El método LIC se basa en la actividad exonucleasa 3'→5' de la ADN Polimerasa T4

para crear extremos cohesivos de una sola hebra con una extensión de entre 12-14 bases. El producto de PCR con extremos cohesivos compatibles se genera añadiendo unas bases extra a los extremos 5' de los cebadores. El producto de PCR purificado se trata con ADN Polimerasa T4 en presencia de dATP para generar los extremos compatibles con el vector. El vector e inserto así
 5 tratados se transforman en células competentes de *E. coli*. La ligación del vector e inserto ocurre dentro de la célula dando lugar a un plásmido circular. El resultado de la reacción anterior se utilizó para transformar células competentes de *Escherichia coli* de la cepa NovaBlue. El análisis mediante PCR permitió la selección de los clones bacterianos que contenían el inserto en la orientación adecuada. La identidad de uno de los clones se confirmó determinando la secuencia
 10 del inserto, y el plásmido recombinante obtenido se denominó pET41 EK/LIC-MQO. Los transcritos de RNA mensajero que se inicien en el promotor T7 de pET41 EK/LIC-MQO codificarán la proteína de fusión GST-MQO, formada por 226 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína GST fusionados con la secuencia completa de la enzima MQO (521 aminoácidos).

1.2 Expresión de la proteína malato quinona oxidoreductasa (MQO) de *Acetobacter acetii* en 15 *Escherichia coli*

La enzima MQO de *Acetobacter acetii* se expresó, como proteína de fusión con GST, transformando células competentes de *Escherichia coli* de la cepa BL21 DE3 Star con el plásmido pET41 EK/LIC-MQO. Las bacterias se crecieron a 37 °C hasta alcanzar la fase logarítmica y la expresión de la proteína de fusión se indujo añadiendo al cultivo isopropil-beta-D-
 20 tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de entre 0,02 y 1,0 mM y continuando la incubación durante un periodo de tiempo comprendido entre 3 y 16 horas a una temperatura comprendida entre los 15 y 37 °C.

Los cultivos fueron centrifugados durante 30 minutos a 4 °C y 5.500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se recogió el precipitado. La masa celular fue conservada en congelación a -20 °C
 25 hasta el momento de su ruptura.

Para comenzar la ruptura de las células, se descongelaron y se resuspendieron en un volumen de tampón de lisis (100 mM KCl; 50 mM Tris HCl; pH 7,5) que contenía inhibidores de proteasas, (Complete™, EDTA-free, ROCHE). Seguidamente, las células se sometieron a 9 pulsos de sonicación, con un 90% de amplitud. Se centrifugaron, para separar las células no rotas y las
 30 paredes celulares (precipitado) del sobrenadante, que contenía las proteínas citoplasmáticas y las membranas celulares en suspensión. El sobrenadante se ultracentrifugó a 35.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, tras lo cual se desechó el precipitado y se recogió el sobrenadante.

1.3 Purificación de la proteína de fusión GST-MQO

El sobrenadante se sometió a cromatografía de afinidad a GST en un equipo FPLC, utilizando como tampón A: 100 mM KCl; 50 mM Tris HCl; pH 7,5 y, como tampón B, 10 mM glutatión reducido; 50 mM Tris HCl; pH 8,0. Se realizó ensayo enzimático y cuantificación de proteína de las fracciones eluidas, para realizar una selección de aquellas fracciones que tuviesen mayor actividad específica. En este momento, se cuantificó proteína mediante reactivo de Bradford en espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda y actividad enzimática, también en espectrofotómetro, a 600 nm durante 5 minutos. Los reactivos empleados para el ensayo enzimático fueron 700 µl de tampón Tris HCl 100 mM pH=8,5, 100 µl de ácido málico 1M en tampón Tris HCl 150 mM pH=7,5, 100 µl de DCPIP 2,2 mM y 100 µl de PMS 13 mM.

10 **2.1 Clonación de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, 1.1.5.4) de *Pseudomonas aeruginosa***

2.1.1 Construcción del plásmido recombinante pET101-MQO

Para la expresión de la enzima malato quinona oxidoreductasa (MQO) de *Pseudomonas aeruginosa* en *Escherichia coli*, como proteína de fusión con cola de histidinas, se usó el vector procariótico pET101 (Invitrogen). Dicho vector está diseñado para una clonación dirigida y rápida de productos de PCR amplificados, para una posterior expresión de proteínas fusionadas con la secuencia C-terminal His-Tag. Utilizando cebadores diseñados específicamente para la amplificación y el vector pET101, los insertos pueden ser clonados eficientemente sin necesidad de las etapas de digestión y ligación.

20 Se diseñaron cebadores específicos para la amplificación por PCR del gen MQO de *Pseudomonas aeruginosa* atendiendo a las instrucciones del fabricante. Como molde se utilizó un plásmido pMQ-RQ que contenía el cDNA codificante de la enzima MQO de *Pseudomonas aeruginosa*. La subclonación del gen de la MQO se lleva a cabo en un vector de expresión mediante clonaje independiente de ligación (LIC). En este caso, el método se basa en que los productos de PCR se clonan direccionalmente añadiendo 4 bases al cebador del extremo N-terminal (CACC). El extremo cohesivo en el vector de expresión (GTGG) invade el extremo 5' del producto de PCR, se une a las bases añadidas, y estabiliza el producto de PCR en la orientación adecuada. El vector e inserto así tratados se transforman en células competentes de *Escherichia coli*. El resultado de la reacción anterior se utilizó para transformar células competentes de *Escherichia coli* de la cepa NovaBlue. El análisis mediante PCR permitió la selección de los clones bacterianos que contenían el inserto en la orientación adecuada. La identidad de uno de los clones se confirmó determinando la secuencia del inserto, y el plásmido recombinante obtenido se denominó pET101-MQO. Los transcritos de RNA mensajero que se inicien en el promotor T7 de pET101-MQO codificaran la proteína de fusión MQO-6xHis, formada por los residuos de histidina del extremo C-terminal fusionados con la secuencia completa de la enzima MQO (523 aminoácidos).

2.2 Expresión de la proteína malato quinona oxidoreductasa (MQO) de *Pseudomonas aeruginosa* en *Escherichia coli*

La enzima MQO de *Pseudomonas aeruginosa* se expresó, como proteína de fusión con 6 residuos de histidina, transformando células competentes de *Escherichia coli* de la cepa BL21 DE3 Star con el plásmido pET101-MQO. Las bacterias se crecieron a 37 °C hasta alcanzar la fase logarítmica y la expresión de la proteína de fusión se indujo añadiendo al cultivo isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de entre 0,02 y 1,0 mM y continuando la incubación durante un periodo de tiempo comprendido entre 3 y 16 horas a una temperatura comprendida entre los 15 y 37 °C.

Los cultivos fueron centrifugados durante 30 minutos a 4 °C y 5.500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se recogió el precipitado. La masa celular fue conservada en congelación a -20°C hasta el momento de su ruptura.

Para comenzar la ruptura de las células, se descongelaron y se resuspendieron en un volumen de tampón de lisis (100 mM NaCl; 10 mM imidazol; 20 mM Fosfato; pH 7,5) que contenía inhibidores de proteasas, (Complete™, EDTA-free, ROCHE). Seguidamente, las células se sometieron a 9 pulsos de sonicación, con un 90% de amplitud. Se centrifugaron, para separar las células no rotas y las paredes celulares (precipitado) del sobrenadante, que contenía las proteínas citoplasmáticas y las membranas celulares en suspensión. El sobrenadante se ultracentrifugó a 35.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, tras lo cual se desechó el precipitado y se recogió el sobrenadante.

2.3 Purificación de la proteína de fusión MQO-6xHis

El sobrenadante se sometió a cromatografía de afinidad a cola de histidinas en un equipo FPLC, utilizando como tampón A: 100 mM NaCl; 10 mM imidazol; 20 mM Fosfato; pH 7,5 y, como tampón B, 100 mM NaCl; 500 mM imidazol; 20 mM Fosfato; pH 7,5. Se realizó ensayo enzimático y cuantificación de proteína de las fracciones eluidas, para realizar una selección de aquellas fracciones que tuviesen mayor actividad específica. En este momento, se cuantificó proteína mediante reactivo de Bradford en espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda y actividad enzimática, también en espectrofotómetro, a 600 nm durante 5 minutos. Los reactivos empleados para el ensayo enzimático fueron 700 µl de tampón Tris HCl 100 mM pH=8,5, 100 µl de ácido málico 1M en tampón Tris HCl 150 mM pH=7,5, 100 µl de DCPIP 2,2 mM y 100 µl de PMS 13 mM.

30

REIVINDICACIONES

- 1.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no, caracterizado porque se obtiene a partir de una mezcla de organismos *Acetobacter aceti* y *Pseudomonas aeruginosa* en proporciones de 0% a 100% de cada organismo y porque comprende las fases de:
- 5
- a) clonación del gen de MQO de *Acetobacter aceti* y *Pseudomonas aeruginosa*, que se lleva a cabo mediante la utilización de oligonucleótidos sintéticos y/o productos de PCR; y donde las moléculas de ADN recombinante de 1563 (GenBank: DQ674275.1) y 1569 (EMBL-Bank: AE004091.2) pares de bases (pb) resultantes, de *SEQ ID NO 1* y *SEQ ID NO 3* respectivamente,
- 10 se clonan en un vector de clonación usando los sitios de restricción adecuados y su integridad verificada mediante secuenciación;
- b) expresión, usando un organismo hospedador eucariota o procariota, para formar una proteína fusionada que facilite su posterior purificación;
- c) purificación del gen de interés (MQO) que se encuentra clonado dentro de un vector de expresión que permite la fusión con el gen que codifica para la proteína glutation-s-transferasa (GST) o una cola en el extremo C o N-terminal de 6 histidinas consecutivas.
- 15
- 2.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima malato quinona oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no, a partir de *acetobacter aceti* y *Pseudomonas aeruginosa*, según reivindicación 1, caracterizado porque la clonación, a su vez, incluye la subclonación para formar una proteína fusionada que facilite su posterior purificación.
- 20
- 3.- Enzima malato quinona oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no, obtenida en el proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque codifica para las proteínas de *SEQ ID NO 2* y de *SEQ ID NO 4*.
- 4.- Enzima malato quinona oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no, según la reivindicación 3, caracterizada por ser fragmentos de 1563 (GenBank: DQ674275.1) y 1569 (EMBL-Bank: AE004091.2) nucleótidos de ADN.
- 25
- 5.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no, según reivindicación 1, caracterizado porque la clonación de la proteína de *SEQ ID NO 2* y de *SEQ ID NO 4* en *Escherichia coli*. son fragmentos de 521 y 523 aminoácidos, respectivamente.
- 30
- 6.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no, según reivindicación 2, caracterizado porque la subclonación de la

enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) sirve para expresar el ADN de *SEQ ID NO 1* y para la producción de la proteína de *SEQ ID NO 2* en *Escherichia coli*.

- 5 7.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no, según reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque, incluye un organismo hospedador, tanto eucariota como procariota, y transformado con la subclonación de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, 1.1.5.4), que es capaz de autorreplicarse, y sirve tanto para replicar el ADN de *SEQ ID NO 1* como para producir la proteína de *SEQ ID NO 2* en *Escherichia coli*.
- 8.- Un organismo hospedador según la reivindicación 7, caracterizado por ser *Escherichia coli*.
- 10 9.- Un organismo hospedador según la reivindicación 7, caracterizado por ser *Pichia pastoris*.
- 10.- Un organismo hospedador según la reivindicación 7, caracterizado por ser *Streptomyces*.
- 11.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no, según reivindicación 5, caracterizado porque comprende su aislamiento a partir del cultivo.
- 15 12.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no, según reivindicación 5, caracterizado porque comprende su aislamiento a partir de las células.
- 20 13.- Uso de la enzima malato quinona oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no obtenida en el proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 en la medición de ácido málico en muestras alimentarias.
- 14.- Uso de la enzima malato quinona oxidoreductasa (MQO, EC 1.1.5.4) recombinante o no obtenida en el proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 para la producción de isoformas recombinantes mutantes.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Biolan Microbiosensores, S.L.

<120> Proceso de purificación y estabilización de la enzima malato quinona oxidoreductasa (mqo,
5 ec 1.1.5.4) recombinante o no; y su uso como elemento de reconocimiento biológico

<210> 1

<211> 1563

<212> DNA

<213> Acetobacter aceti

10 <400> 1

atggacccag ccctgcctgc atgtaagatg caaaaggcag atgCGGctga caatgCGgag 60

accacgatga gttccaccac gaccgatacc gcttcttctg ttgatgctgt cctgattggt 120

ggtggcgtga tgagcgccac actgggaacc ctgctgcggc agcttcagcc ggattggagc 180

atcagcattt ttgaacgctt ggatagcgtg gcggaagaaa gctccaatgc ctggaataat 240

15 gccggcacag gccactccgc cctgtgtgag ctgaattaca cgccacagcg ggcagatggt 300

agcgttgata ttaccaaggc tatcaacgta aacgaacagt ttcaggtttc ccgccagttc 360

tggacatatc tggttgagca gaacattctt gagtctgcgc gtgatttctt gacccccgtg 420

ccacatatga gctttgtctg gggggataaa aatgtgtcct tctgcaggc acgttacaag 480

gCGttaaGcg cacatccgct gttttccggc atggagtta cgcaggatca ggggcaaatt 540

20 gcacaatggg cgccgttggg tatgCGcaac cgccccgCag ggcaaaatct ggcggttacc 600

cgcagcctgc gtggcacaga cgtaaacttt ggtgcgftaa cgcgtctgct gtttacgtat 660

ctggtcacca cgccagcctg cacattgcat acgCGgcatg atgtgcatga tatccgCCgt 720

gattcagacg gccgctgggt gatcaagggtg caggatacac gcctgaacac ggagcgtgag 780

ES 2 578 812 A1

gtaagggcgc ggtttgtgtt tattggtggt ggtgggggtg cgctgccgct cctgcaaaaa 840
acgggtattc cggaatctcg cggcgttggg ggtttcccgg tgagcgggca gttcctgcgc 900
tgcacaaatc cggatcttat tgcccagcat catgccaaga ttacggcaa ggcctctgtt 960
5 ggtgcgccgc ccatgtctgt tccgcatctg gatacacgca tgatagatgg cacgcccgca 1020
ttgtgtttg gcccatatgc tggttttcc acccggtttt tgaaaaatgg ttctctgctg 1080
gatctgccgc gttctattcg ggccagcaac ttggtgcca tgctggctgt ggcgcgtgat 1140
aactggccac ttaccaata tctgatcgaa caggttttgc agtctcaca cgatcggatc 1200
aaggcgtgc gggactttat acccgatgca caggccaagg attgggaact ggtcgtggct 1260
10 ggccagcgtg tgcagattat taagaaagat gccaaaaaag gcggtgttct gcaatttggc 1320
acggaagtta ttccagcgc agatggctct gtggcggccc ttctgggggc ttctccgggg 1380
gcatcaaccg cagccccaat tatgctgaca gtgctgaaaa aatgctttgc cagcaagttg 1440
cctgagtggg atgcaaagct gaagcagatt attcatcct atggccagaa actggcggat 1500
aatccggaac ttgtgcgca gctctttgat aaaagcacca gtgttctggg gctgaaagaa 1560
15 gtc 1563
<210> 2
<211> 521
<212> PRT
<213> Acetobacter aceti
20 <400> 2
MDPALPACKM QKADAADNAE TTMSSTTTDT ASSVDVVLIG GGVMSATLGT LLRQLQPDWS 60
ISIFERLDSV AEESNAWNN AGTGHSALCE LNYTPQRADG SVDITKAINV NEQFQVSRQF 120
WTYLVEQNIL ESARDFLTPV PHMSFVWGDK NVSFLQARYK ALSAHLPLFSG MEFTQDQGQI 180

ES 2 578 812 A1

AQWAPLVMRN RPAGQNLAVT RSLRGTDVNF GALTRLLFTY LVTTACTLH TRHDVHDIRR 240
DSDGRWVIKV QDTRLNTERE VKARFVFIGG GGGALPLLQK TGIPESRGVG GFPVSGQFLR 300
CTNPDLIAQH HAKIYGKASV GAPPMSVPHL DTRMIDGTPA LLFGPYAGFS TRFLKNGSLL 360
5 DLPRSIRASN FGAMLAVARD NWPLTKYLIE QVLQSHNDRI KALRDFIPDA QAKDWELVVA 420
GQRVQIIKGD AKKGGVLQFG TEVISSADGS VAALLGASPG ASTAAPIMLT VLKKCFASKL 480
PEWDAKLLKQI IPSYGQKLAD NPELCAQLFD KSTSVLGLKE V 521

<210> 3

<211> 1569

10 <212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 3

atgaaaaaaaa tcttattgat gcttttgctc gtcagcgtgc tgggttgctc caaaaacagc 60
gtcgaatcgg aaaaaccggt cgacgtgctc ctgatcgggtg gcggcatcat gagcgccacc 120
15 ctgggtacct atctgaacga actggaacca ggctggacca tcgagatggt cgagcgctg 180
gacaaggctg ccgaagaaag ctccaacggc tggaacaacg cgggcaccgg tcaactcggcg 240
ttctgcgaac tgaactacac cagcgaggcc gcggacggct cgatggatat cagcaaggcg 300
gtggcgatca acgagaactt cgagatctcc aagcagttct gggcctacca ggtcgaccgc 360
aagggtctga acgatccgaa gtcggtcatc aacaacgtcc cgacatgag cttcgtctgg 420
20 ggcgacgaca acgtcgctt cctcaagaag cgccacgccg ccctgcagca cagctcgctg 480
ttccgcgga tggagtactc ggaagacccc gagcagatca agcagtggtt gccgctggtg 540
atggaaggcc gcgagccggg gcagaagatc gccgccacgc gcatgtcgat cggcaccgac 600
gtcaactcgc gcgagatcac tcgccaactg gtgggctcgc tgtcggccaa ggacaccttc 660

ES 2 578 812 A1

aagctgcgcc tgcaacatga ggtccgcgac ctcaagcgca acgacgacaa cacctggacc 720
gtgacatgg ccgacctggc caatggcgac aaggaaacca gcgtaaggc caggttcgtc 780
ttcatcggcg ccggcggcgg cgcgctgaag ctgctgcaga tgtccggcat ccccgaggcc 840
5 gaaggctacg ccggcttccc ggtgggcggt tcgttctcgc ccaccaccaa cccggacgtg 900
gtcaagcgcc acctggccaa ggtctacgga aaggcttcgg tgggttcgcc gccgatgtcg 960
gtgccgcacc tcgacacccg catgatcgac ggcaagccgg ttctgctgtt cggtcggtc 1020
gccactttct ccaccaagtt cctgaagaac ggctcgtgt gggacctgcc gggctcggtg 1080
accagcggca acatcggccc gatgttcaac gccggcatcg acaactcga ttcagccag 1140
10 tacctgatcg gccagctgat gctcagccag gacgaccgca tggcctcgtc gcgagagtac 1200
ttcccggaag cccgcgacga ggactggaag ctggtgcagg ccggccagcg cgtgcagatc 1260
atcaagaagg acgccgagaa aggcggcgta ctgcaattcg gcaccgaagt ggtgaccgca 1320
gcgacggct ccgtcggcg cctgctcggc gcctcggcg gcgcctcgac cgccgcgccg 1380
atcatgctgt cgggtctgga gaaggcctc aaggacaagg tcgctacccc cgagtggcag 1440
15 gcacgcctga aggaaatcgt gccgtcttac gggcgcaagc tgaacaacga catcgagctg 1500
accaacagca cccgtgcctg gagcagcgag cgctgcaac tgatccacgt gccggtacag 1560
ccggaggcc 1569

<210> 4

<211> 523

20 <212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 4

MKKILLMLLC VSVLGCSKNS VESEKPV DVL LIGGGIMSAT LGTYLNELEP GWTIEMVERL 60

ES 2 578 812 A1

DKVAEESSNG WNNAGTGHSA FCELNYTSEA ADGSMDISKA VAINENFEIS KQFWAYQVDR 120

KVLNDPKSFI NNVPHMSFVW GDDNVAFLKK RHAALQHSSL FRGMEYSEDP EQIKQWVPLV 180

MEGREPGQKI AATRMSIGTD VNFGEITRQL VGSLSAKDTF KLRLQHEVRD LKRNDNTWT 240

5 VTMADLANGD KETSVKARFV FIGAGGGALK LLQMSGIPEA EGYAGFPVGG SFLATTNPDV 300

VKRHLAKVYG KASVGSPMS VPHLDTRMID GKPVLLFGPF ATFSTKFLKN GSLWDLPGSV 360

TSGNIGPMFN AGIDNFDLSQ YLIGQLMLSQ DDRMASLREY FPEARDEDWK LVQAGQRVQI 420

IKKDAEKGGV LQFGTEVVTA ADGSVAALLG ASPGASTAAP IMLSVLEKAF KDKVATPEWQ 480

ARLKEIVPSY GRKLNDIEL TNSTRAWSSSE RLQLIHVPVQ PEA 523



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201530116

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.01.2015

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N9/04** (2006.01)
C12P7/46 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HARPER, S. et al. "Purification of proteins fused to glutathione S-transferase". METHODS MOL BIOL. 2011. Vol. 681, páginas 259-280, todo el documento.	1,2,5-12,14
X	BORNHORST, J.A. et al. "Purification of proteins using polyhistidine affinity tags". METHODS ENZYMOL. 2000. Vol. 326, páginas 245-254, todo el documento.	1,2,5-12,14
X	BASE DE DATOS EMBL/UNIPROTKB [en línea], [recuperado el 25.02.2016], "Probable malate:quinone oxidoreductase. <i>Acetobacter aceti</i> ". 05.02.2008. N° de acceso A9X6Q2, todo el documento especialmente, secuencia página 3.	3,4,13,14
X	BASE DE DATOS EMBL/UNIPROTKB [en línea], [recuperado el 25.02.2016], "Probable malate:quinone oxidoreductase. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ". 01.03.2001, n° de acceso Q9HYF4, todo el documento especialmente, secuencia página 4.	3,4,13,14
X	GURBAN, A.-M. "Malate biosensors for the monitoring of malolactic fermentation: Different approaches". ANALYTICAL LETTERS. 2006. Vol. 39, N° 8, páginas 1543-1558, todo el documento.	13

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 n°:

Fecha de realización del informe
26.02.2016

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

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, BIOSIS, REISTRY, HCAPLUS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.02.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	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.

Consideraciones:

La invención consiste en las enzimas malato quinona oxidoreductasa de *Acetobacter aceti* y *Pseudomonas aeruginosa* de SEQ ID nºs 2 y 4, su procedimiento de obtención y su uso.

Deben hacerse las siguientes comentarios sobre las reivindicaciones:

1) Reivindicación 1 y las demás en la medida en que dependen de ella.

No se trata de una invención de "Product by process". En la presente solicitud, los productos reivindicados, las enzimas malato quinona oxidoreductasas de *Acetobacter aceti* y de *Pseudomonas aeruginosa* (MQO EC 1.1.5.4), se caracterizan por sus secuencias de aminoácidos SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 4 y no por los procedimientos por los que son obtenidas y purificadas. La reivindicación principal debería ser la que hace referencia al producto.

2) Falta de Unidad de Invención

En la solicitud, se reivindican dos productos diferentes y existe falta de unidad de invención.

Invención 1: MQO de *Acetobacter aceti*, de SEQ ID nº 2, procedimiento de obtención y uso.

Invención 2: MQO de *Pseudomonas aeruginosa*, de SEQ ID nº 4, procedimiento de obtención y uso.

3) Reivindicación 3.- Una enzima no se caracteriza porque **codifica** para una proteína de SEQ ID nºs 2 y 4. Se caracteriza porque **tiene** una secuencia de aminoácidos. Una secuencia de **ADN** SEQ ID X **codifica** para una **proteína** de SEQ ID Y.

4) Reivindicación 4.- Una enzima es una proteína y se caracteriza por estar formada por aminoácidos, no por nucleótidos.

5) Reivindicación 5.- Los fragmentos de 521 y 523 aminoácidos, son características de las enzimas y no del procedimiento

6) Reivindicación 6.- En una clonación/subclonación, el material que se manipula es ADN no una proteína.

7) Reivindicaciones 8, 9 y 10, no dependen de la reivindicación 7.

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	HARPER, S. et al. "Purification of proteins fused to glutathione S-transferase". METHODS MOL BIOL. 2011. Vol. 681, páginas 259-280.	
D02	BORNHORST, J.A. et al. "Purification of proteins using polyhistidine affinity tags". METHODS ENZYMOL. 2000. Vol. 326, páginas 245-254.	
D03	BASE DE DATOS EMBL/UNIPROTKB [en línea], [recuperado el 25.02.2016], "Probable malate:quinone oxidoreductase. <i>Acetobacter acetii</i> ". 05.02.2008. Nº de acceso A9X6Q2.	
D04	BASE DE DATOS EMBL/UNIPROTKB [en línea], [recuperado el 25.02.2016], "Probable malate:quinone oxidoreductase. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ". 01.03.2001, nº de acceso Q9HYF4.	
D05	GURBAN, A.-M. "Malate biosensors for the monitoring of malolactic fermentation: Different approaches". ANALYTICAL LETTERS. 2006. Vol. 39, Nº 8, Páginas 1543-1558.	

El documento D01, describe el método de purificación de proteínas fusionadas a glutatión-S-transferasa, método estándar ampliamente descrito en el estado de la técnica.

El documento D02, también describe un método de purificación de proteínas, esta vez unidas a una cola de histidinas. El método es también utilizado de forma rutinaria en los procesos de purificación de proteínas.

El documento D03, describe la malato quinona oxidorreductasa de *Acetobacter acetii* de SEQ ID nº 2.

El documento D04, describe la malato quinona oxidorreductasa de *Pseudomonas aeruginosa* de SEQ ID nº 4.

El documento D05, describe el uso de la malato quinona oxidorreductasa como biosensor en la fermentación maloláctica.

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

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-14

1) Las enzimas malato quinona oxidorreductasa de *Acetobacter acetii* y *Pseudomonas aeruginosa* de SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 4, han sido previamente descritas en los documentos D03 y D04.

2) Los procedimientos utilizados para obtener y purificar las enzimas malato quinona oxidorreductasa de *Acetobacter acetii* y *Pseudomonas aeruginosa* de SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 4, son métodos estándar del estado de la técnica. Los documentos D01 y D02, son revisiones sobre los mismos.

3) El uso de la malato quinona oxidorreductasa como biosensor en procesos de obtención de alimentos en los que se produce ácido málico, es estándar en el estado de la técnica como describe el documento D05.

Las reivindicaciones 1-14 no son nuevas y no tienen actividad inventiva. No cumplen los requisitos de los Art. 6 y 8 de la LP