

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/128325 A1

(43) Fecha de publicación internacional
28 de agosto de 2014 (28.08.2014) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 9/02 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2014/070113
- (22) Fecha de presentación internacional:
14 de febrero de 2014 (14.02.2014)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201330222
19 de febrero de 2013 (19.02.2013) ES
- (71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores: **ALCALDE GALEOTE, Miguel**; Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **MATE MATE, Diana**; Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **GONZÁLEZ PÉREZ, David**; Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **PITA MARTÍNEZ, Marcos**; Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **LÓPEZ DE LACEY, Antonio**; Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **LUDWIG, Roland**; Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **KITTL,**
- (74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
— con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: LACASSE WITH HIGH REDOX POTENTIAL, FUNCTIONAL IN BLOOD, BY MEANS OF DIRECTED EVOLUTION, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF, AND APPLICATIONS OF SAME

(54) Título : LACASA DE ALTO POTENCIAL REDOX FUNCIONAL EN SANGRE MEDIANTE EVOLUCIÓN DIRIGIDA MÉTODO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to a lacasse with high redox potential produced by means of directed molecular evolution, which is active in electrophysiological conditions, resists high halide concentrations, has a significant neutral/alkaline pH activity and is active in human blood and plasma. The invention relates to the amino-acidic sequence of said lacasse, to the nucleotide sequence encoding for said lacasse and cells that allow the production thereof. The lacasse according to the invention has applications in various sectors: nanobiotechnology, biomedicine, bioremediation processes, and paper and fine chemistry industries.

(57) Resumen: La presente invención describe una lacasa de alto potencial redox obtenida mediante evolución molecular dirigida que es activa en condiciones electrofisiológicas, que resiste elevadas concentraciones de haluros, que tiene una actividad significativa a pHs neutros/alcalinos y que es activa en sangre y plasma humano. La presente invención se refiere a la secuencia aminoacídica de dicha lacasa, a la secuencia nucleotídica que codifica para dicha lacasa y células que permiten su obtención. La lacasa de la invención presenta aplicaciones en diversos sectores: nano-biotecnología, biomedicina, procesos de biorremediación, industria papelera y química fina.



WO 2014/128325 A1

**LACASA DE ALTO POTENCIAL REDOX FUNCIONAL EN SANGRE MEDIANTE
EVOLUCIÓN DIRIGIDA MÉTODO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES**

ESTADO DE LA TÉCNICA

5 Debido a su extraordinaria versatilidad, el estudio de enzimas oxidorreductasas
ligninolíticas secretadas por hongos de podredumbre blanca es de especial interés
biotecnológico, especialmente, las lacasas de alto potencial redox, las peroxidases y
las enzimas suministradoras de peróxido de hidrógeno (Martínez, Ruiz-Dueñas et al.
2009). Particularmente, las lacasas de alto potencial redox son consideradas por
10 muchos como los biocatalizadores ecológicos del siglo XXI ya que oxidan fácilmente
cientos de compuestos utilizando el oxígeno del aire y liberando agua como único
subproducto (Mate, García-Ruiz et al. 2011). No obstante, la ausencia de actividad
catalítica a pHs neutros/básicos, junto con la inhibición por moderadas
concentraciones de diferentes sustancias (haluros, iones metálicos, ácidos grasos,
15 detergentes), siguen siendo un serio obstáculo para su explotación.

Lacasas de alto potencial redox (EC 1.10.3.2) activas bajo condiciones tan adversas
son muy deseables para ser utilizadas en aplicaciones que abarcan desde la síntesis
orgánica a la biorremediación (Gianfreda, Xu et al. 1999, Alcalde 2007). Además, esta
20 clase de lacasas pertenece al exclusivo grupo de oxidorreductasas capaces de
aceptar electrones directamente desde el cátodo de una biopila de combustible o de
un biosensor amperométrico. En efecto, el conjunto de ventajas que ofrecen las
lacasas de alto potencial redox (p. ej. altas densidades de corriente, transferencia
electrónica directa, bajo sobre potencial para la reducción del oxígeno y elevada
25 estabilidad operacional) las sitúa entre los candidatos más adecuados para la
construcción de dispositivos bioelectrónicos conteniendo enzimas inmovilizadas
(Shleev and Ruzgas 2008).

Probablemente, uno de los desafíos más atractivos en este campo se centra en
30 conseguir nanobiosensores inalámbricos implantables que trabajen en diferentes
fluidos fisiológicos (sangre, saliva, lágrimas) con el fin de detectar y registrar la
presencia de diversos metabolitos *in vivo*. Las principales deficiencias en la ingeniería
de tales dispositivos provienen de las dificultades en la miniaturización de sus
elementos individuales (antena, transductor), y en el diseño de enzimas fiables y
35 estables para catalizar la reacción del biocátodo, en el cual el oxígeno disuelto en los

fluidos se reduce a agua (Castillo, Gaspar et al. 2004, Bullen, Arnot et al. 2006). Desafortunadamente, las lacasas de alto potencial redox son inactivas a pH sanguíneo (~7.4) y están fuertemente inhibidas por concentraciones de cloruro muy inferiores a las presentes en la sangre (140-150 mM), lo que limita su aplicación específica en
5 biodispositivos así como su utilización en otros procesos que tienen lugar a pH básico y/o en los que hay iones cloruro involucrados (p. ej. el procesamiento de material derivado de colorantes, el tratamiento de aguas residuales, la remediación de contaminantes, la síntesis de compuestos farmacéuticos o el procesamiento de alimentos)(Gianfreda, Xu et al. 1999, Alcalde 2007, Rodgers, Blanford et al. 2010).

10

En esta invención se presenta la primera lacasa de alto potencial redox funcional en fluidos fisiológicos, como la sangre humana. Dicha lacasa fue creada mediante evolución dirigida y tiene una extraordinaria resistencia a haluros y una actividad significativa a pHs neutros/alcalinos. Además, los beneficios de esta lacasa de alto
15 potencial redox pueden ser extendidos a aplicaciones tales como ensayos biomédicos, procesos de biorremediación (p. ej. oxidación de pesticidas y de hidrocarburos aromáticos policíclicos o procesamiento de tintes y aguas residuales), bioblanqueo de pastas kraft y síntesis orgánica, entre otros procesos en los cuales los altos pHs y las elevadas concentraciones salinas presentes constituyen serios impedimentos (Alcalde,
20 Ferrer et al. 2006, Rodriguez Couto and Toca Herrera 2006, Kunamneni, Camarero et al. 2008, Witayakran and Ragauskas 2009).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Descripción detallada

25 La presente invención se basa en que los inventores han observado que es posible obtener lacasas termoestables funcionales en condiciones fisiológicas de pH neutro o ligeramente básicos y/o a altas concentraciones de iones haluros, como el ión cloruro, manteniendo un alto potencial redox, mediante la modificación o mutación en, al menos, un aminoácido clave de la lacasa original o parental de partida (lacasa mutante
30 OB-1), más concretamente mediante la mutación F396I de dicha lacasa OB-1. Además, se describen otras mutaciones de esta lacasa en posiciones en la secuencia original OB-1 adicionales a la mutación F396I, ya sea de forma aislada o en combinación de varias ellas, y que es común a todas esta familia de lacasas.

La presente invención describe una lacasa de alto potencial redox de secuencia SEQ ID NO 10 (Ejemplo 1), que es activa a condiciones electrofisiológicas (Ejemplo 2.1) con gran resistencia a haluros (Ejemplo 2.2) y una actividad significativa a pHs neutros/alcalinos (Ejemplo 2.2) y que presenta actividad en sangre y plasma humano (Ejemplo 2.3). Igualmente, se describe la secuencia de nucleótidos codificante de la lacasa de la invención (por ejemplo, la secuencia SEQ ID NO 9) así como construcciones genéticas necesarias para su producción.

El punto de partida fue la lacasa termoestable, lacasa OB-1, protegida por la patente ES201030723 depositada el 17 de mayo de 2010, titulada "Lacasa de alto potencial redox" (Maté et al., 2010). La lacasa OB-1 se sometió a cuatro ciclos de evolución dirigida en combinación con enfoques semi-rationales dio origen al último mutante de este proceso, la lacasa ChU-B de la invención de SEQ ID NO 10 (Ejemplo 1) cuyo sitio catalítico presenta unas características (Ejemplo 3) que lo convierten en una valiosa herramienta para diseñar lacasas con un amplio espectro de aplicaciones biotecnológicas. Esta adaptación de las lacasas a condiciones muy diferentes a las determinadas por su naturaleza permite la catálisis en condiciones extremas y abre un extenso abanico de oportunidades para su utilización en nanobiodispositivos implantables, síntesis química y en procesos de detoxificación.

20

Un resumen de los polinucleótidos y péptidos descritos en la presente invención se resumen en Tabla 1.

VARIANTE	SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS	VARIANTE	SECUENCIAS AMINOACÍDICAS
	SEQ ID N°		SEQ ID N°
OB-1	1	OB-1	2
35H10	3	35H10	4
20F1	5	20F1	6
27C7	7	27C7	8
ChU-B	9	ChU-B	10
14F1	11	14F1	12
1B1	13	1B1	14
3A7	15	3A7	16

19B12	17	19B12	18
18A10	19	18A10	20
21D9	21	21D9	22
17D4	23	17D4	24
20C3	25	20C3	26
14C5	27	14C5	28
OB-1 sin prepro-líder del factor α	29	OB-1 sin prepro-líder del factor α	30

Los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de secuencias aminoacídicas descritos en la invención corresponden a variantes obtenidas mediante evolución dirigida de la lacasa de alto potencial redox OB-1 (patente ES201030723). Dicha proteína se corresponde a la secuencia de nucleótidos, o polinucleótidos, que constituyen la secuencia codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO 2.

Por tanto, un primer objeto de la invención se refiere al polinucleótido aislado que codifica un polipéptido con actividad lacasa activo a condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o que presenta actividad en sangre y plasma humano, en adelante **polinucleótido de la invención**, caracterizado porque la secuencia aminoacídica del polipéptido que codifica presenta una identidad de al menos un 50% con la SEQ ID NO 2 (OB-1), y porque comprende al menos una alteración aminoacídica (como pueden ser por ejemplo, sustituciones, deleciones, y/o inserciones) en la posición homóloga a la posición 487 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por el aminoácido isoleucina (I). Dicha mutación se corresponde con la mutación F396I en el polipéptido maduro con actividad lacasa sin el prepro-líder del factor α .

Con la información suministrada en la presente invención un experto en la materia es capaz de identificar secuencias de nucleótidos homólogas a las descritas en la presente invención y que codifican para lacasas con características idénticas a las descritas para la lacasa de la invención. Por tanto, el polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la lacasa OB-1 con la actividad mejorada descrita, cuya secuencia de nucleótidos se corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada o en su cadena complementaria,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de (a),
- 5 o
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético.

Los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de secuencias aminoacídicas descritos en la invención corresponden a variantes obtenidas mediante evolución

10 dirigida de la lacasa de alto potencial redox OB-1 (patente ES201030723). Dicha proteína se corresponde a la secuencia de nucleótidos, o polinucleótidos, que constituyen la secuencia codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO 2.

15 Así, en un objeto preferido de la invención, la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) en la posición 396 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2 es una isoleucina (I), y se corresponde con la posición 487 de SEQ ID NO 2. En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde

20 con la SEQ ID NO 3 (lacasa mutante 35H10).

Además, se describen otras mutaciones de la lacasa de alto potencial redox OB-1 adicionales a la mutación F396I de la lacasa madura sin el prepro-líder del factor α , que es común a todas estas lacasas, ya sea de forma aislada o en combinación de

25 varias de ellas, y que mejoran la actividad en condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o que presenta actividad en sangre y plasma humano de la mutación F396I. Estas mutaciones pertenecen, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

- 30 a) La sustitución del aminoácido serina (S) por el aminoácido arginina (R) en la posición homóloga a la posición 135 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (S135R) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 226 de SEQ ID NO 2,
- b) La sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) por el aminoácido
- 35 asparagina (N) en la posición homóloga a la posición 205 de la lacasa

- madura SEQ ID NO 30 (D205N) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 296 de SEQ ID NO 2,
- 5 c) La sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 218 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (T218V) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 309 de SEQ ID NO 2,
- 10 d) La delección del aminoácido alanina (A) en la posición homóloga a la posición 389 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (A389-) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 480 de SEQ ID NO 2,
- 15 e) La sustitución del aminoácido asparagina (N) por el aminoácido ácido aspártico (D) en la posición homóloga a la posición 426 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (N426D) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 517 de SEQ ID NO 2,
- 20 f) La sustitución del aminoácido isoleucina (I) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 452 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (I452V) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 543 de SEQ ID NO 2,
- 25 g) La sustitución del aminoácido fenilalanina (F) por un aminoácido que se escoge de entre los siguientes: serina (S), prolina (P), treonina (T), alanina (A), glicina (G), arginina (R) o glutámico (E), en la posición homóloga a la posición 454 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (F454S, F454P, F454T, F454A, F454G, F454R, F454E, respectivamente) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 545 de SEQ ID NO 2,
- 30 h) La sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido serina (S) en la posición homóloga a la posición 487 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (T487S) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 578 de SEQ ID NO 2.

Así, en otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además N426D de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 517 de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolíder del factor α). En una realización

particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 5 (lacasa mutante 20F1).

5 En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 543 de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 7 (lacasa mutante 27C7).

10

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además F454E de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 545 de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 9 (lacasa mutante ChU-B).

15

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la delección del aminoácido en la posición 389 (A389-) y N426D de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 480 y 517, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 11 (lacasa mutante 14F1).

20

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas D205N y I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 296 y 543, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 13 (lacasa mutante 1B1).

25

30

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas N426D y I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 517 y 543, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 15 (lacasa mutante 3A7).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454P de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 17 (lacasa mutante 19B12).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454T de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 19 (lacasa mutante 18A10).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454A de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 21 (lacasa mutante 21D9).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454G, de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y

que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolíder del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 23 (lacasa mutante 17D4).

5

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454R de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolíder del factor α). En otra realización objeto particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 25 (lacasa mutante 20C3).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas N426D, F454S y T487S de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 517 y 578, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolíder del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 27 (lacasa mutante 14C5).

Considerando que las lacasas de alto potencial redox secretadas por hongos basidiomicetos ligninolíticos pueden considerarse afines en cuanto a su evolución, es de esperar que la identidad global de los genes sea de un 50% o mayor, y más concretamente al nivel de la secuencia aminoacídica correspondiente a la SEQ ID NO 2 (lacasa OB-1), sea de un 80% o mayor. La correspondencia entre la secuencia aminoacídica de la(s) lacasa(s) artificiales objetos de la invención y la secuencia de otras lacasas de alto potencial redox se pueden determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquéllas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia aminoacídica de la lacasa putativa y la secuencia aminoacídica correspondiente a la SEQ ID NO 10 de esta memoria.

Con la información suministrada en la presente invención, además un experto en la materia es capaz de combinar las mutaciones anteriormente descritas en la presente invención para generar nuevas variantes de lacasas con similar o mejorada actividad

35

en condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistentes a elevadas concentraciones de haluros y/o que presentan actividad en sangre y plasma humano.

5 El término "homología", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a unas ascendencia evolutiva común, y más concretamente a la semejanza o identidad entre los nucleótidos de dos o más polinucleótidos.

10 El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos polinucleótidos que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA. Puesto que dos proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen función y estructura similares, en general, se asume que valores superiores
15 de similitud o identidad del 30% indican estructuras homólogas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80% mantendrán las mismas propiedades de dicho péptido.

20 El término "aislado", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a nucleótidos o péptidos que: 1) se encuentran sustancialmente libres de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con él en la naturaleza, o 2) si se encuentran en su medio natural, han sido sintéticamente (no naturalmente) alterados por la intervención humana y/o introducidos en una célula que no los posee de forma nativa. Por ejemplo, un polinucleótido natural se convierte en "aislado" si ha sido
25 alterado por medio de la intervención humana (por medio de, por ejemplo pero sin limitarnos, mutagénesis dirigida, inserciones, deleciones, etc.). De la misma manera, un polinucleótido natural se convierte en "aislado" si se introduce por medios no naturales en un organismo no nativo a dicho polinucleótido (transfección). Por tanto, el término "aislado" en este último caso, es equivalente al término "heterólogo".

30 Un segundo objeto de la invención hace referencia a la secuencia aminoacídica codificada por el polinucleótido de la invención, de ahora en adelante polipéptido de la invención, y que presenta actividad lacasa activa en condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o activa en
35 sangre y plasma humano caracterizado porque su secuencia presenta una identidad

de al menos un 50% con la SEQ ID NO 2 (OB-1), y porque comprende al menos una alteración aminoacídica (como pueden ser, por ejemplo, sustituciones, deleciones, y/o inserciones) en la posición homóloga a la posición 487 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por el aminoácido isoleucina (I)
5 (mutación F396I de la lacasa madura sin el preprolídido del factor α con SEQ ID NO 30).

Así en un objeto preferido de la invención, la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) en la posición 396 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2
10 es una isoleucina (I) y se corresponde con la posición 487 de SEQ ID NO 2. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 4 (lacasa mutante 35H10).

El polipéptido de la invención también puede presentar mutaciones adicionales a la
15 sustitución del aminoácido fenilalanina (F) en la posición 396 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2 por una isoleucina (I) (F396I) y mejoran su actividad a condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o que presenta actividad en sangre y plasma humano. Estas mutaciones descritas anteriormente en esta invención pueden
20 presentarse en diversas combinaciones conjuntamente con F396I como será conocido para un experto en la materia.

Así, en otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además N426D de la lacasa madura SEQ ID NO 30
25 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 517 de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 6 (lacasa mutante 20F1).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración
30 aminoacídica F396I y además I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 543 de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 8 (lacasa mutante 27C7).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además F454E de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 545 de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la
5 invención se corresponde con la SEQ ID NO 10 (lacasa mutante ChU-B).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la delección del aminoácido en la posición 389 (A389-) y N426D de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se
10 corresponden con las posiciones 487, 480 y 517, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 12 (lacasa mutante 14F1).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas
15 D205N y I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 296 y 543, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 14 (lacasa mutante 1B1).

20 En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas N426D y I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 517 y 543, respectivamente, de la SEQ
25 ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 16 (lacasa mutante 3A7).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas
30 I452V y F454P de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 18 (lacasa mutante 19B12).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454T de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 20 (lacasa mutante 18A10).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454A de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 22 (lacasa mutante 21D9).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454G de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 24 (lacasa mutante 17D4).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454R de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 26 (lacasa mutante 20C3).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas N426D, F454S y T487S de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 545 y 578, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 28 (lacasa mutante 14C5).

Con la información suministrada en la presente invención, además un experto en la materia es capaz de combinar las mutaciones anteriormente descritas en la presente invención para generar nuevas variantes de lacasas con similar actividad.

5 El polinucleótido de la invención puede encontrarse aislado como tal o formando parte de los vectores que permiten la propagación de dichos polinucleótidos en células hospedadoras adecuadas. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un vector, en adelante vector de la invención, que comprende el polinucleótido de la invención como se describe anteriormente.

10

Los vectores adecuados para la inserción de dicho polinucleótido son vectores derivados de los vectores de expresión en procariontes tales, a título ilustrativo, como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, Co1E1, pCR1, RP4, fagos y vectores "lanzadera", tales como pSA3 y pAT28; vectores de expresión en levaduras tales como el plásmido de 2 micras de *Saccharomyces cerevisiae*), plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centrómeros y similares; vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la pVL vectores de expresión; vectores de expresión en células de plantas tales como piBi, pEarleyGate, PAVA, pCAMBIA, PGSA, PGWB, PMDC, PMY, serie de poros y similares, y otros vectores de expresión en células eucariotas, incluyendo baculovirus adecuados para la transfección de células de insecto usando cualquier sistema de baculovirus disponible comercialmente. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una "célula hospedadora" incluye cualquier célula cultivable que puede ser modificada mediante la introducción de ADN no contenido de manera natural en la célula, de aquí en adelante célula hospedadora de la invención. Preferiblemente, una célula hospedadora es aquella en la que el polinucleótido de la invención puede ser expresado, dando lugar a un polipéptido estable, modificado post-traduccionalmente y localizado en el compartimento subcelular apropiado. La elección de una célula hospedadora adecuada puede también estar influida por la elección de la señal de detección. Por ejemplo, el uso de construcciones con genes reporteros (por ejemplo, lacZ, luciferasa, timidina quinasa o GFP) puede proporcionar una señal seleccionable mediante la activación o inhibición de la transcripción del gen de interés en respuesta a una proteína reguladora de la transcripción. De cara a conseguir una selección o screening óptimo, el fenotipo de la célula hospedadora deberá ser considerado. Una célula hospedadora de la presente invención incluye células

15
20
25
30
35

procariotas y eucariotas. Las procariotas incluyen organismos gram negativos (por ejemplo, *Escherichia coli*) o gram positivos (por ejemplo, bacterias del género *Bacillus*). Las células procariotas se usarán, preferiblemente, para la propagación de la secuencia del control de la transcripción del vector que contiene el(los) polinucleótido(s) objeto(s) de la invención, lo que permitirá conseguir un mayor número de copias del vector conteniendo el(los) polinucleótido(s) objeto(s) de la invención. Entre las células hospedadoras procariotas adecuadas para la transformación de este vector se encuentran, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y otras especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*.

Las células eucariotas incluyen, entre otras, células de levadura, células de plantas, células de hongos, células de insectos, células de mamífero, y células de organismos parásitos (por ejemplo, Trypanosomas). Tal y como se emplea en esta memoria, el término levadura no incluye sólo levadura en el sentido taxonómico estricto, es decir, organismos unicelulares, sino también hongos multicelulares similares a las levaduras u hongos filamentosos. Ejemplos de especies son *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Ustilago maydis*, con *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* como organismos preferidos. Otras levaduras que pueden utilizarse en la producción de la(s) secuencia(s) poliaminoacídica(s) de la presente invención son *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Candida tropicalis*, y *Hansenula polymorpha*. Los sistemas de cultivo con células hospedadora de mamífero incluyen líneas celulares establecidas como las células COS, células L, células 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO), células madre embrionarias, con las células BHK, HeK o HeLa como células preferidas. Las células eucariotas son, preferiblemente, utilizadas para la expresión del gen recombinante mediante la aplicación de la secuencia de regulación de la transcripción o el vector de expresión de la presente invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención del polipéptido de la invención, que comprende:

- 1) Introducir el vector de la invención en una célula hospedadora adecuada (célula hospedadora de la invención),
- 2) Cultivar la célula hospedadora de la invención en un medio adecuado, y,
- 3) Purificar el polipéptido de la invención con actividad lacasa

El término "purificar" tal y como se emplea en la descripción, se refiere al aislamiento del polipéptido de la invención y a su concentración, del resto de

polipéptidos presentes en el medio de cultivo de la célula hospedadora de la invención. El aislamiento de la lacasa puede llevarse a cabo mediante técnicas de solubilidad diferencial, cromatografía, electroforesis o isoelectroenfoque. Las técnicas de cromatografía pueden estar basadas en el peso molecular, la carga iónica (basada en
5 el estado de ionización de los aminoácidos en las condiciones de trabajo) o la afinidad de la proteína y puede realizarse en columna, en papel o en placa. El aislamiento de la proteína puede realizarse, por ejemplo, mediante precipitación con sulfato amónico, cromatografía líquida rápida (FPLC, del inglés Fast Protein Liquid Chromatography) o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés High Performance Liquid
10 Chromatography), empleando sistemas automatizados que reducen notablemente el tiempo de purificación e incrementan el rendimiento de la purificación.

Un cultivo de células hospedadoras se refiere al proceso de mantener y crecer las células hospedadoras. Los cultivos celulares necesitan condiciones controladas de
15 temperatura, pH, porcentajes de gases (oxígeno y dióxido de carbono), así como la presencia de los nutrientes adecuados para permitir la viabilidad y la división celular. Los cultivos celulares pueden desarrollarse en sustratos sólidos como el agar, o en medio líquido, lo que permite cultivar grandes cantidades de células en suspensión.

20 Otro objeto de la invención se refiere al uso del polinucleótido de la invención para la obtención del polipéptido de la invención con actividad lacasa.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de la célula hospedadora de la invención para la obtención del polipéptido de la invención. Preferentemente, la célula
25 hospedadora de la invención es una levadura, más preferentemente de los géneros *Saccharomyces* sp. o *Pichia* sp, y más preferentemente aún las especies son *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*.

Las lacasas de alto potencial redox, como es el caso del polipéptido de la invención,
30 son conocidas por su gran número de aplicaciones como pueden ser, por ejemplo, su empleo en procesos de biorremediación (p. ej. oxidación de pesticidas y de hidrocarburos aromáticos policíclicos o procesamiento de tintes y aguas residuales), bi blanqueo de pastas kraft y síntesis orgánica; procesos, todos ellos, en los cuales los altos pHs y las elevadas concentraciones salinas presentes constituyen serios
35 impedimentos. Así, el polipéptido de la invención y la célula hospedadora de la

invención pueden tener cualquiera de los usos ya conocidos en el estado de la técnica para estas enzimas.

5 Como se ha comentado anteriormente en la presente invención, el desarrollo de una lacasa activa en condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o activa en sangre y plasma humano, tiene amplias aplicaciones en ensayos biomédicos. Así, otro objeto de la de la invención se refiere al uso del polipéptido de la invención en la elaboración de kits de diagnóstico con fines biomédicos para la detección de metabolitos y medición de su concentración
10 en, por ejemplo, sangre, saliva, lágrimas y/u orina.

Otro objeto particular de la invención se refiere al uso del polipéptido de la invención en la elaboración de dispositivos bioelectrónicos que contienen enzimas inmovilizadas para, por ejemplo, el diagnóstico biomédico mediante la detección de metabolitos y
15 medición de su concentración in vivo, a través de, a modo ilustrativo, nanobiodispositivos inalámbricos implantables que trabajen en diferentes fluidos fisiológicos (sangre, saliva, lágrimas y/u orina).

Los Kits de diagnóstico con fines biomédicos y los dispositivos bioelectrónicos que
20 contienen enzimas inmovilizadas descritos forman parte de la presente invención.

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
25 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración de la invención y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **Figura 1.- Evolución dirigida de la lacasa mutante OB-1.** El gen de fusión del tipo parental (mutante OB-1) (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010) está formado por el pre-líder del factor α –reemplazando la secuencia señal nativa con el fin de aumentar la secreción en *S. cerevisiae*– y por la lacasa madura. El pre-líder del factor α está representado en negro, el pro-líder del factor α en blanco y la lacasa madura en gris.
35 Las nuevas mutaciones están señaladas como estrellas y las mutaciones acumuladas

como cuadrados; A389- indica la delección de la Ala389. MAT (mejora de la actividad total en buffer de sangre): valor que indica el número de veces de mejora de la actividad lacasa detectada en el sobrenadante de cada mutante proveniente de microcultivo de *S. cerevisiae* comparada con la actividad del parental OB-1. Las medidas se hicieron por quintuplicado a partir de sobrenadantes de cultivos independientes crecidos en placas de 96 pocillos y utilizando 3 mM de ABTS como sustrato. La I_{50Cl} (I_{50} aparente para NaCl) indica la concentración de cloruro sódico a la cual la enzima retiene la mitad de su actividad inicial, determinada con sobrenadantes de cada mutante procedentes de microcultivos de *S. cerevisiae* tras 2 h de incubación. La actividad relativa a diferentes valores de pH fue evaluada utilizando 3 mM de ABTS como sustrato. Las flechas discontinuas indican el mutante empleado como parental en cada generación. N.d., no determinado. Las mutaciones silenciosas no están incluidas.

Figura 2.- Actividad en fluidos fisiológicos y caracterización espectroelectroquímica. (a) Actividad de la lacasa de la invención mutante ChU-B determinada por medida del consumo de oxígeno. Para monitorizar la actividad lacasa en sangre y plasma humanos, ambos fluidos se suplementaron con 10 mM de ácido ascórbico y el pH se ajustó a 7.4 antes de añadir la enzima. **(b)** Valoración redox de la lacasa ChU-B a pH fisiológico. Cada valoración redox se llevó a cabo en ambos sentidos (es decir, de la enzima en estado totalmente oxidado a estado totalmente reducido –valoración reductora– y *vice versa* –valoración oxidativa–). Se registraron los espectros de la lacasa una vez alcanzado el equilibrio redox, obteniéndose espectros típicos de la enzima oxidada, parcialmente reducida y totalmente reducida, los cuales están representados en la figura. La equilibración del centro de cobre T1 a cada potencial aplicado fue evidente por estabilización de la absorbancia a 600 nm. Como los mediadores redox que se emplearon son transparentes a longitudes de onda superiores a 500 nm, los cambios espectroscópicos a 600 nm fueron atribuidos al Cu T1 de la lacasa. Se muestran los espectros de la valoración reductora correspondientes a la lacasa oxidada (línea continua, potencial aplicado +1000 mV vs ENH), a la lacasa parcialmente reducida (línea discontinua y discontinua con puntos, +700 mV y +600 mV vs ENH, respectivamente) y a la lacasa totalmente reducida (línea de puntos, +600 mV vs ENH). Inserto: representación de la dependencia del potencial aplicado frente a la absorbancia a 600 nm, y los parámetros promedio calculados a partir de las valoraciones reductora y oxidativa (valor del punto medio

+720 mV vs. ENH y valor de la pendiente 110 mV). (c) Voltamogramas cíclicos de reducción del oxígeno obtenidos utilizando un electrodo de grafito de baja densidad pulido con el mutante ChU-B adsorbido sobre su superficie (línea continua) y en ausencia de enzima (línea discontinua). Las medidas se llevaron a cabo en una celda electroquímica de tres electrodos conteniendo buffer fosfato sódico 100 mM pH 7.4 y tras burbujear oxígeno a una presión de 1 atm durante 15 min, y utilizando un alambre de platino como contraelectrodo y un electrodo de $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}$ como electrodo de referencia. Las medidas se realizaron empleando el equipo Autolab PGSTAT30 controlado por el software GPES 4.9.

10

Figura 3.- Caracterización bioquímica de la lacasa de la invención ChU-B. Círculos blancos, tipo parental; círculos negros, mutante ChU-B. Los perfiles de actividad frente al pH se midieron en buffer Britton y Robinson a diferentes valores de pH con 3 mM de DMP (a) o de ABTS (b) como sustratos. La actividad lacasa se normalizó con respecto al valor de pH óptimo. (c-e) Inhibición por haluros: (c) Inhibición por cloruro medida con 2.4 mM de ABTS en buffer acetato sódico 100 mM pH 4.0. (d) Inhibición por fluoruro medida con 2.4 mM de ABTS en buffer acetato sódico 100 mM pH 4.0. (e) Inhibición por cloruro de la lacasa ChU-B medida a pH 7.4 con 2.4 mM de ABTS en buffer fosfato sódico 100 mM pH 7.4. Cada valor representa el valor promedio y la desviación estándar resultado de tres experimentos independientes.

15

20

Figura 4.- Detalles de las mutaciones en la lacasa de la invención ChU-B (b) comparado con los correspondientes aminoácidos en el tipo parental (a). La estructura catalítica general está formada por el sitio de Cu T1 cercano a la superficie, aunque el cobre no está directamente expuesto al disolvente. El Cu T1 está trigonalmente coordinado por la His455, la His394 y la Cys450, ésta última formando parte del tripéptido altamente conservado en las lacasas His449-Cys450-His451, el cual conecta el sitio T1 con el cluster trinuclear situado a una distancia de 12 Å. Los electrones son transferidos desde el Cu T1 a través de una ruta de transferencia electrónica intramolecular formada por el tripéptido ya mencionado hacia el cluster trinuclear T2/T3, donde tiene lugar la unión del oxígeno y su reducción a dos moléculas de agua. Este segundo sitio activo se encuentra en el interior de la estructura de la lacasa, con el Cu T2 tricoordinado por dos residuos de His y una molécula de agua, y dos cobres T3 tetracoordinados. La entrada del oxígeno y la salida del agua al sitio T2/T3 tiene

25

30

35

lugar a través de dos canales presentes en la estructura. Se muestran las mutaciones F396I y F454E y I452V (revertida en ChU-B). Las esferas representan iones cobre. También se representan los residuos de la vía de transferencia electrónica desde el Cu T1 al cluster T2/T3 y los aminoácidos involucrados en la primera esfera de coordinación de los cobres catalíticos y sus interacciones. La superficie electrostática de la estructura proteica se muestra en el fondo. El modelo tridimensional está basado en la estructura cristalina de la lacasa de *Trametes trogii* (con un 97% de identidad de secuencia, PDB: 2HRG) (Matera, Gullotto et al. 2008).

Figura 5.- Perfiles de actividad frente al pH de la lacasa parental y de las lacasas mutantes. Las actividades se midieron en buffer Britton y Robinson 100 mM a diferentes valores de pH con 3 mM de DMP (a) o de ABTS (b) como sustratos. La actividad lacasa se normalizó con respecto al valor de pH óptimo y cada punto representa el promedio y la desviación estándar resultado de tres experimentos independientes.

Figura 6.- Visión de conjunto de las mutaciones en la estructura de la lacasa. Se detallan los residuos mutados por evolución. La primera esfera de coordinación del Cu T1 (His394, His455 y Cys450) está señalada con un círculo. El círculo concéntrico discontinuo indica la segunda esfera de coordinación. Los residuos de His de la vía de transferencia electrónica interna desde el Cu T1 al cluster T2/T3 también se resaltan. Las esferas representan iones cobre. El modelo tridimensional está basado en la estructura cristalina de la lacasa de *Trametes trogii* (con un 97% de identidad de secuencia, PDB: 2HRG) (Matera, Gullotto et al. 2008).

Figura 7.- Mutagénesis saturada en la posición 454: (a) mutante 19B12; (b) mutante 18AA10; (c) mutante 17D4; (d) mutante 21D9; (e) mutante 20C3; (f) mutante ChU-B. Las esferas representan iones cobre. También se detallan los residuos de la vía de transferencia electrónica desde el Cu T1 al cluster T2/T3. Los aminoácidos involucrados en la primera esfera de coordinación de los cobres catalíticos y sus interacciones también están representados. La superficie electrostática de la estructura proteica se muestra en el fondo. El modelo tridimensional está basado en la estructura cristalina de la lacasa de *Trametes trogii* (con un 97% de identidad de secuencia, PDB: 2HRG) (Matera, Gullotto et al. 2008).

35

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Generación de mutantes por evolución dirigida y obtención de la lacasa de la invención (mutante ChU-B)

El punto de partida de este estudio fue una lacasa de alto potencial redox (el mutante OB-1) previamente modificada a partir de la lacasa del basidiomiceto PM1 por evolución *in vitro* y diseño racional para ser altamente activa, termoestable y fácilmente secretada por levaduras (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010). Para convertir OB-1 en una lacasa tolerante a la sangre, se diseñó un ensayo de screening basado en la composición de la sangre humana. Como el plasma o la sangre reales no son adecuados para la exploración de librerías de mutantes en el contexto experimental de la evolución dirigida de enzimas, se desarrolló un medio complejo sustituto ("buffer de sangre") con el objetivo de imitar la composición de la sangre humana. Este buffer contenía un sustrato colorimétrico (ABTS) y carecía de células sanguíneas y de factores de coagulación. Además, se realizaron tres re-screenings consecutivos para descartar la selección de falsos positivos. Al igual que todas las lacasas de alto potencial redox, el mutante OB-1 no muestra actividad ni transferencia electrónica interna a pH 7.4 (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010). En consecuencia, en la primera generación el pH del buffer de sangre se estableció en 6.5, lo que resultó en un descenso en la actividad lacasa de más del 90%. En generaciones sucesivas la presión selectiva fue aumentada de manera progresiva hasta alcanzar el valor del pH fisiológico. Además, se aprovechó la elevada frecuencia de recombinación homóloga del ADN, característica de la maquinaria celular de *Saccharomyces cerevisiae*, para la generación de diversidad genética (Alcalde 2010, Gonzalez-Perez, Garcia-Ruiz et al. 2012). Así, en cada ciclo de evolución se combinaron diferentes métodos de recombinación del ADN (tanto *in vivo* como *in vitro*) para aumentar la complejidad de las librerías de mutantes. El último ciclo de evolución se dedicó a la evaluación en detalle desde un enfoque racional -mediante mutagénesis saturada y mutagénesis dirigida- de varias posiciones que conllevaron aumentos sustanciales en la actividad total (Figura 1, Tabla 2).

30

Tabla 2. Mutaciones introducidas durante el proceso de evolución dirigida. +, nueva mutación; o, mutación acumulada; ●, mutación introducida por mutagénesis dirigida; ■, mutación introducida por mutagénesis saturada; □, mutación revertida (V452I, **GTC/ATC**). Las mutación silenciosas están subrayadas; los subíndices indican el uso de codones en *S. cerevisiae*. MAT, mejora de la actividad total en buffer de sangre.

35

- Concretamente, se exploraron más de 10000 clones en cuatro ciclos de evolución molecular combinada con métodos mutagénicos y de recombinación *in vivo* (IvAM, barajado *in vivo* del ADN, IVOE) e *in vitro* (PCR propensa a error, StEP mutagénico).
- 5 En el último ciclo de evolución, la variante final (mutante ChU-B) se obtuvo tras analizar las siguientes posiciones por mutagénesis dirigida o mutagénesis saturada:
- D205N: esta mutación provocó un desplazamiento del pH óptimo de actividad de la lacasa de *Trametes versicolor* (concretamente, el pH óptimo para el DMP como sustrato aumentó 1.4 unidades) (Madzak, Mimmi et al. 2006). La misma
10 sustitución aminoacídica fue probada en este estudio, dando lugar al mutante 1B1, que presentó un comportamiento similar al de la lacasa de *T. versicolor*: el pH óptimo de actividad con DMP fue 2.0 unidades más básico. Este mutante fue finalmente excluido debido a su bajo valor de MAT y a su escasa actividad con compuestos no fenólicos a pH fisiológico.
 - 15 • N426D: esta mutación beneficiosa se descubrió en el mutante 20F1 (2G) pero se perdió debido a la baja probabilidad del entrecruzamiento con la mutación cercana I452V. El cambio N426D se introdujo en el mutante 27C7 (3G) dando lugar a la variante 3A7, la cual presentó una actividad 0.6 veces inferior.
 - Mutagénesis saturada en las posiciones 389, 396 y 454: el residuo Ala389 se
20 delecionó en el tercer ciclo de evolución (mutante 14F1, 3G), dando lugar a un valor de MAT en torno a 3 veces mayor que el del mejor parental de la generación anterior (mutante 2E3). Tras mutagénesis saturada y screening, sólo se descubrieron mutantes con la Ala inicial, lo que indica que a no ser que el residuo sea eliminado, ningún otro aminoácido ejerce un efecto más beneficioso en esta
25 posición. La Phe396 fue objeto de mutagénesis saturada ya que la mutación F396I confirió la mayor mejora de todo el experimento de evolución (un incremento de 157 veces en el mutante 35H10, 1G). Tras mutagénesis saturada y screening, todas las variantes encontradas presentaron el mismo cambio, confirmando que la Ile396 es el aminoácido más adecuado para esta posición en
30 el contexto del ensayo de screening en buffer de sangre. La mutación F454S fue descubierta en diferentes etapas del proceso de evolución (mutante 18G5 y 20H4, 1G; mutante 14C5, 3G) lo que sugiere que dicho cambio desempeña un papel importante en la tolerancia de la enzima a haluros e hidroxilos. Tras mutagénesis saturada y screening, se detectaron importantes aumentos para diferentes
35 variantes con sustituciones aminoacídicas tanto polares como apolares

(F454P/T/A/G/R/E). De este conjunto de variantes, se eligió el mutante ChU-B en base a sus valores de MAT, sus perfiles de actividad frente al pH, su $_{ap}I_{50Cl-}$ y su estabilidad. ChU-B contiene: tres mutaciones en la secuencia pro-líder del factor α (E[α 27]K e I[α 66]M y la mutación silenciosa D[α 49]D), relacionadas con la secreción de la enzima; y cinco mutaciones en la proteína madura (dos mutaciones beneficiosas, F396I y F454E; dos mutaciones silenciosas, E380E y T413T; y una mutación revertida, V452I).

Una vez obtenido el último mutante de la ruta evolutiva (mutante ChU-B), éste mostró un aumento de la actividad total en buffer de sangre de más de 40000 veces respecto al tipo parental.

Ejemplo 2. Caracterización de la actividad de la lacasa mutante ChU-B de la invención.

15 Ejemplo 2.1 Actividad de Chu-B en sangre y plasma humanos.

El comportamiento de la lacasa ChU-B mutante de la invención fue probado en sangre y plasma humanos. Para ello, el consumo de oxígeno en fluidos fisiológicos enriquecidos con ácido ascórbico (un sustrato pobre de las lacasas que se encuentra de forma natural en la sangre) fue monitorizado con un electrodo de Clark, revelando respuestas comparables para plasma y sangre (185 y 127 min^{-1} , respectivamente; Figura 2a). El incremento de 1.5 veces de la actividad de ChU-B en plasma respecto a la registrada en suero sugiere que las células sanguíneas interfieren en el método de detección. De cara a confirmar que la enzima es activa bajo condiciones fisiológicas independientemente del sustrato reductor utilizado, se midió la reducción del oxígeno frente a sustratos típicos de las lacasas (ABTS, $K_4[Fe(CN)_6]$) en buffer de sangre, obteniéndose valores similares para todos los compuestos probados (Figura 2a).

Las lacasas contienen cuatro cobres catalíticos organizados en dos sitios diferentes: el sitio de cobre T1, en el que tiene lugar la oxidación del sustrato; y un cluster de cobre trinuclear (con un Cu T2 y dos Cu T3), donde el oxígeno es reducido a agua (Morozova, Shumakovich et al. 2007). Si la lacasa es apropiadamente conectada a un electrodo, esto es, con el Cu T1 orientado hacia la superficie del dispositivo, dicha superficie puede reemplazar al sustrato como donador de electrones, necesarios para la catálisis. La valoración redox del sitio T1 se llevó a cabo a pH fisiológico usando una microcelda espectroelectroquímica con un electrodo capilar de oro (Figura 2b). El

mutante ChU-B exhibió un alto potencial redox (+720 mV vs. ENH) a pH 7.4, cambiando de manera reversible y cíclica desde la forma oxidada a la forma reducida. A fin de verificar que el mutante es electroquímicamente activo bajo condiciones fisiológicas, ChU-B fue adsorbido sobre electrodos de grafito de baja densidad, registrándose la respuesta electrocatalítica de reducción del oxígeno por transferencia electrónica directa a pH 7.4 (Figura 2c). No se detectó respuesta para ninguna de las otras lacasas de alto potencial redox probadas bajo las mismas condiciones.

Ejemplo 2.2.- Tolerancia de la lacasa de la invención ChU-B a cambios de pH y concentraciones de iones haluros.

Las propiedades de la lacasa ChU-B fueron investigadas en términos de su actividad frente al pH y de la inhibición por haluros. Los perfiles de actividad frente a compuestos fenólicos (DMP, 2,6-dimetoxifenol) y no fenólicos (ABTS, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)) revelaron un desplazamiento notable hacia valores más básicos, incluyendo el cambio del pH óptimo de actividad de 4.0 a 5.0-6.0 (Figuras 3a, b; y Figuras 5a,b). A pH 7.0, la lacasa ChU-B retuvo en torno al 50% y al 20% de su actividad para DMP y ABTS respectivamente, mientras que el tipo parental presentó actividad despreciable bajo dichas condiciones. Del mismo modo, la actividad de la lacasa ChU-B a pH 6.0 fue de más del 90% y del 50% para DMP y ABTS respectivamente, mientras que la del parental fue de en torno al 20%. Este drástico aumento de la actividad a pH neutro conllevó un pequeño pero perceptible incremento en la actividad de la lacasa ChU-B a un pH tan básico como es pH 8.0. Esta lacasa constituye la primera lacasa de alto potencial redox activa a pH neutros/alcalinos. Hasta la fecha, sólo la ingeniería de lacasas quiméricas había conseguido un ligero desplazamiento del perfil de pH hacia pHs alcalinos, aunque a expensas de la disminución del potencial redox (Cusano, Mekmouche et al. 2009).

Las lacasas de alto potencial redox son típicamente inhibidas por los iones haluro (fluoruro, cloruro y bromuro, pero no yoduro, el cual es sustrato de las lacasas), con una potencia inhibitoria inversamente proporcional al diámetro del anión ($F^- > Cl^- > Br^-$). Este orden es debido a la mayor dificultad que tienen los haluros más voluminosos para acceder a los sitios catalíticos de la enzima (Xu 1996, Xu 1997). La I_{50} obtenida para diferentes haluros (la concentración de haluro a la cual la enzima retiene el 50% de su actividad inicial) fue independiente del sustrato empleado (Tabla 3). La I_{50} de la lacasa ChU-B para cloruro mejoró de 176 a 1025 mM con ABTS como sustrato (Figura

3c), lo que la convierte en la I_{50Cl^-} más alta descrita hasta la fecha para lacasas de alto potencial redox producidas por hongos basidiomicetos. No fue posible medir la inhibición de la lacasa ChU-B por efecto de los iones bromuro, dado que la I_{50} para el parental ya fue superior a 1300 mM, lo cual impidió la medida por sobrepasar el límite de la solubilidad del sustrato en concentraciones salinas tan altas. Como era de esperar, la inhibición en presencia de fluoruro fue muy fuerte (del orden μM), y aunque la inhibición por fluoruro no era objetivo del estudio de evolución dirigida, la I_{50F^-} aumentó ligeramente (de 70 a 109 μM , Figura 3d). La inhibición por haluros fue también medida a pH fisiológico y la lacasa ChU-B resultó no ser sensible a concentraciones crecientes de cloruro (comprendidas entre 100 y 800 mM) (Figura 3e). La comparación de la lacasa de la invención ChU-B con otras lacasas de alto potencial redox evidenció que, dependiendo del sustrato, la lacasa de la invención ChU-B mutante fue entre 12 y 20 veces menos sensible al fluoruro que las lacasas de alto potencial redox de *Trametes trogii* y *Trametes villosa* (Xu 1996, Garzillo, Colao et al. 1998). De igual manera, la I_{50Cl^-} de la lacasa ChU-B fue entre 26 y 164 veces más alta que dichas lacasas del género *Trametes*. La lacasa del ascomiceto *Botrytis aclada* tiene la I_{50Cl^-} más alta descrita hasta la fecha (1.4 M con DMP como sustrato) (Kittl, Gonaus et al. 2012), aunque su insignificante actividad a pH neutro y su baja estabilidad impiden su uso en biocátodos implantables o en otros procesos ambientales. Además, la comparación de ChU-B con lacasas bacterianas reveló una tolerancia al cloruro 1.5 veces más alta que la de la polifenol oxidasa resistente a haluros de *Marinomonas mediterranea* (Jimenez-Juarez, Roman-Miranda et al. 2005). La tolerancia a haluros del mutante ChU-B es excepcional dado que, por regla general, las lacasas fúngicas son mucho más sensibles a la inhibición por haluros que las lacasas de bajo potencial redox propias de bacterias (Niladevi, Jacob et al. 2008, Singh, Bhalla et al. 2011).

Tabla 3. Valores de I_{50} (en mM) de la lacasa parental (mutante OB-1) y del mutante ChU-B para diferentes haluros. ^aLos experimentos se llevaron a cabo al pH óptimo de oxidación de cada sustrato. ^bn.m., no medible.

Inhibidor	Sustrato	pH ^a	Parental	Mutante ChU-B
NaF	ABTS	4.0	0.070	0.109
	DMP	5.0	0.167	0.183

NaCl	ABTS	4.0	176	1025
	DMP	5.0	208	818
NaBr	DMP	4.0	1306	n.m. ^b

Ejemplo 2.3. Actividad de la lacasa ChU-B en condiciones óptimas y en buffer de sangre.

5 Se evaluó la velocidad máxima de transformación de sustratos de la lacasa de la invención ChU-B en buffer de sangre. El efecto sinérgico de la mejora de la actividad a pH fisiológico y la fuerte tolerancia a cloruro dio lugar a velocidades iniciales de 427 y 144 mol de sustrato/min/mol de enzima para DMP y ABTS, respectivamente. En idénticas condiciones, el tipo parental apenas mostró actividad. Además, cabe
10 destacar que las velocidades de transformación del mutante ChU-B fueron 3 y 4 veces inferiores a las del parental bajo condiciones óptimas (es decir, pH ácido y en ausencia de inhibidores, Tabla 4).

15 Tabla 4. Velocidades máximas de transformación (mol sustrato/min/mol enzima) de la lacasa parental (mutante OB-1) y del mutante ChU-B bajo condiciones óptimas y en buffer de sangre. ^apH óptimo de actividad (4.0 y 5.0 para el parental y ChU-B, respectivamente). n.m., no medible.

Sustrato	pH	Parental	Mutante ChU-B
ABTS	3.0	44215 ± 1061	14895 ± 654
	7.4 (buffer de sangre)	n.m.	143 ± 9
DMP	Óptimo ^a	20820 ± 710	4767 ± 216
	7.4 (buffer de sangre)	n.m.	427 ± 32

20 Ejemplo 3. Análisis detallado de las mutaciones en la estructura de la lacasa ChU-B

Teniendo en cuenta que la inhibición por haluros e hidroxilos se presupone que tiene lugar en el cluster trinuclear T2/T3, interrumpiendo la transferencia electrónica interna,

era de esperar que las mutaciones aparecidas durante el proceso evolutivo estuvieran situadas en los alrededores del cluster T2/T3, o en cualquier de los dos canales de la enzima, bien en el de entrada del oxígeno o en el de salida del agua(Xu, Berka et al. 1998, Matera, Gullotto et al. 2008). Sin embargo, las dos mutaciones introducidas en la

5 proteína madura (F396I y F454E) se localizaron en la segunda esfera de coordinación del sitio T1 (Figura 4). En realidad, la mayoría de las mutaciones descubiertas durante el proceso evolutivo están localizadas en dicha región (a una distancia promedio del sitio T1 de 7.5 angstrom), indicando que esta zona influye de manera significativa en la inhibición de la actividad lacasa por iones haluro e hidroxilo (Figura 6, Tabla 5).

10

Tabla 5. Mutaciones introducidas en la lacasa madura a lo largo del proceso evolutivo.

^aMutaciones presentes en el mutante final ChU-B.

Mutación	Distancia al Cu T1 (Å)	Distancia al Cu T2 (Å)	Distancia al Cu T3a-Cu T3b (Å)	Dominio	Motivo de estructura secundaria
I452V	4.8	12.4	9.6	III	Loop (H451-I452)
F454E ^a	7.6	15.8	12.2	III	Hélice α (D453-A458)
F396I ^a	7.6	9.9	9.0	III	Lámina β (P395-L398)
A389-	7.7	21.4	18.4	III	Loop (L383-H394)
N426D	9.3	14.5	13.7	III	Lámina β (V424-N426)
D205N	7.8	15.2	11.8	II	Loop (L202-

N207)

La mutación F396I fue descubierta en la primera generación, siendo responsable del mayor aumento en la actividad de todo el proceso evolutivo (157 veces respecto al tipo parental). La exploración de esta posición por mutagénesis saturada no dio lugar a más mejoras (Figura 1). La Phe396, altamente conservada en las lacasas de alto potencial redox, desempeña un papel fundamental en el valor del potencial redox del sitio T1, y por consiguiente, en la catálisis de este grupo de lacasas (Matera, Gullotto et al. 2008). Este aminoácido actúa como un puente que conecta el Cu T1 y el cluster T2/T3 vía la Pro395 (contigua a la His394, ligando del Cu T1) y la His397, que coordina el Cu T2 (Figura. 4). La mutación F454E apareció al someter la posición 454 a mutagénesis saturada y al posterior screening, dado que varios mutantes descubiertos en el primer y en el tercer ciclo ya presentaron un cambio en dicha posición (Figura 1 y Figura 7). Se seleccionaron seis mutantes diferentes con sustituciones F454P/T/A/G/R/E, las cuales aumentaron la actividad en buffer de sangre hasta 2.5 veces. La mutación F454E está contigua a la His455, ligando del Cu T1. El análisis del modelo estructural reveló que esta mutación parece establecer un nuevo enlace de hidrógeno con uno de los átomos de nitrógeno del anillo de imidazol de la His455 (Figura 4). En general, se acepta que la transferencia electrónica desde el sustrato al Cu T1 es el paso limitante en la catálisis de las lacasas (Gianfreda, Xu et al. 1999, Alcalde 2007). La modificación de la segunda esfera de coordinación del Cu T1 reduce la actividad a pH ácido, probablemente debido al ajuste de la transferencia electrónica interna desde el sitio T1 al cluster T2/T3, que simultáneamente compensa la inhibición del Cu T2 haciendo que ChU-B mantenga la actividad en presencia de haluros e hidroxilos. Estos resultados concuerdan con estudios preliminares de una lacasa de bajo potencial redox producida por un ascomiceto que fue sometida a estudios de mutagénesis dirigida en la zona del sitio T1 (Xu, Berka et al. 1998).

Material y métodos

Todos los reactivos químicos fueron de la pureza más alta disponible en el mercado. Los oligonucleótidos cebadores utilizados a lo largo del proceso evolutivo (Tabla 6) fueron comprados a Isogen Life Science (De Meern, Países Bajos). Los medios de cultivo fueron preparados como se describió anteriormente (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010).

Tabla 6. Oligonucleótidos cebadores utilizados. Los codones sometidos a mutagénesis aparecen en negrita, donde N es A/T/G/C y S es G/C.

Oligonucleó tido cebador	Secuencia	Sitio de anillamiento (pb) en el vector pJRoC30
RMLN forward	5'-CCTCTATACTTTAACGTCAAGG-3'	5'-420-441-3'
RMLC reverse	5'-GGGAGGGCGTGAATGTAAGC-3'	5'-2288- 2307-3'
D205N forward	5'- CTGGTGTGCTGTCATGCA ACC CGAATTACACGTT CAGC-3'	5'-1337- 1375-3'
D205N reverse	5'- GCTGAACGTGTAATTCGG GTT GCATGACAGCGACA CCAG-3'	5'-1337- 1375-3'
N426D forward	5'- GTCTACCGCGACGTCGTC GAC ACGGGCTCGCCCG GGGAC-3'	5'-2000- 2038-3'
N426D reverse	5'- GTCCCCGGGCGAGCCCGT GTC GACGACGTCGCGG TAGAC-3'	5'-2000- 2038-3'
SAT389 forward	5'- CTCCCCGCCACCTCCGCC NNS CCCGGCTTCCCGC AC-3'	5'-1889- 1924-3'
SAT389 reverse	5'- GTGCGGGAAGCCGGG SNN GGCGGAGGTGGCGGG GAG-3'	5'-1889- 1924-3'
SAT396 forward	5'- CCCGGCTTCCCGCACCC NNS CACTTGCACGGGC ACACC-3'	5'-1910- 1948-3'
SAT396	5'-	5'-1910-

reverse	GGTGTGCCCGTGCAAGTGSNNGGGGTGCGGGAAG	1948-3'
	CCGGG-3'	
SAT454	5'-	5'-2084-
forward	CTCCACTGCCACGTCGACNNSCACCTTGAGGCTGG	2122-3'
	GTTC-3'	
SAT454	5'-	5'-2084-
reverse	GAACCCAGCCTCAAGGTGSNNGTCGACGTGGCAG	2122-3'
	TGGAG-3'	

Evolución dirigida

En cada generación, los fragmentos de PCR fueron limpiados, concentrados y cargados en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad, Hercules, CA), y purificados utilizando el kit Zymoclean gel DNA recovery (Zymo Research, Orange, CA). Los productos de PCR fueron clonados bajo el control del promotor GAL1 del vector de expresión lanzadera (donado por la Prof. F. H. Arnold del Instituto Tecnológico de California, Caltech, Pasadena, CA), reemplazando el gen parental en pJRoc30. Para eliminar el gen parental, el plásmido pJRoc30 fue linearizado con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I (New England Biolabs, Hertfordshire, UK), y el plásmido lineal fue concentrado y purificado como ya se ha descrito para los fragmentos de PCR.

Primera generación: IvAM

Utilizando el mutante OB-1 como parental (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010), se construyó una librería de más de 3000 clones mediante ensamblaje *in vivo* de librerías de mutantes con diferentes espectros mutacionales (IvAM) (Zumarraga, Camarero et al. 2008). Se llevaron a cabo reacciones de PCR mutagénicas con *Taq*/MnCl₂ (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y con Mutazima II (kit Genemorph II Random mutagenesis, CA, EE.UU.) en un termociclador de gradiente (Mycycler, Bio-Rad) utilizando los siguientes parámetros: 95°C durante 2 min (1 ciclo); 94°C durante 0.75 min, 53°C durante 0.75 min, 74°C durante 3 min (28 ciclos); 74°C durante 10 min (1 ciclo). La amplificación con *Taq*/MnCl₂ se realizó añadiendo 90 nM de RMLN, 90 nM de RMLC, 0.1 ng/μL de ADN molde, 0.3 mM de dNTPs (0.075 mM de cada uno), 3% de DMSO, 1.5 mM de MgCl₂, 0.01 mM de MnCl₂ y 0.05 U/μL de *Taq* polimerasa en 50 μL de reacción. La amplificación con Mutazima II se llevó a cabo con 372 nM de RMLN, 372 nM de RMLC, 40 ng/μL de ADN molde, 0.8 mM de dNTPs (0.2 mM de cada uno), 3%

de DMSO y 0.05 U/ μ L de Mutazima II por 50 μ L de reacción. Bajo tales condiciones, las tasas mutacionales de *Taq/MnCl₂* y Mutazima II fueron 0-3 y 4.5-9 mutaciones por 1 kb, respectivamente. Para promover la ligación *in vivo*, se diseñaron regiones de solapamiento con 40 y 66 pb de homología con ambos extremos del vector
5 linearizado. Las dos librerías fueron mezcladas en cantidades equimolares y transformadas junto con el vector linearizado (ratio vector:librería 1:4) en células competentes de *S. cerevisiae* de la cepa deficiente en proteasas BJ5465 (LGC Promochem, Barcelona, España) utilizando el kit de transformación en levadura (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Las células transformadas se extendieron en placas
10 de SC drop-out y se incubaron durante 3 días a 30°C. A continuación, se picaron las colonias y se sometieron al ensayo de screening y a los tres re-screenings consecutivos que se describen a continuación.

Segunda generación: PCR propensa a error + IvAM

15 Empleado el mutante 35H10 de la primera generación como parental, se construyeron tres librerías de mutantes (de ~700 clones cada una) y éstas se exploraron de manera independiente. La primera librería se preparó con *Taq/MnCl₂*, la segunda con Mutazima II y la tercera con IvAM empleando las condiciones descritas para la primera generación.

20

Tercera generación: StEP mutagénico y barajado *in vivo* del ADN

Se crearon y exploraron dos librerías independientes utilizando los dos mejores mutantes del segundo ciclo, 2E3 y 20F1, como genes parentales. Para la primera librería, los parentales se sometieron de forma independiente a una reacción de PCR
25 mutagénica con *Taq/MnCl₂* y los productos mutagénicos se barajaron *in vivo* en *S. cerevisiae*. La segunda librería se preparó por recombinación *in vitro* mediante StEP (Staggered Extension Process) (Zhao, Giver et al. 1998). La PCR del StEP (con 50 μ L de volumen final) contenía 0.5 μ M de RMLN, 0.5 μ M de RMLC, 0.1 ng/ μ L de ADN molde, 0.8 mM de dNTPs (0.2 mM de cada uno), 3% de DMSO, 1 mM de MgCl₂, 0.01
30 mM MnCl₂ y 0.02 U/ μ L de la ADN polimerasa de alta fidelidad iProof (Bio-Rad). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95°C durante 2 min (1 ciclo); 94°C durante 0.5 min, 55°C durante 0.33 min (90 ciclos). La banda electroforética de ~2 kb resultado de la PCR se purificó y se utilizó como molde para una PCR mutagénica con Mutazima II. El producto mutagénico se barajó *in vivo* como se describió
35 anteriormente.

Cuarta generación: estudios de mutagénesis dirigida y mutagénesis saturada

Se construyeron tres librerías de mutagénesis saturada así como dos mutantes con una mutación específica mediante extensión por solapamiento *in vivo* (IVOE, *In Vivo* 5 Overlap Extension) (Alcalde 2010) empleando el mutante 27C7 como parental. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la polimerasa iProof.

Mutante D205N: Los oligonucleótidos cebadores para la PCR 1 fueron RMLN y D205N-REV y para la PCR2 fueron D205N-FOR y RMLC.

10 *Mutante N426D*: Los oligonucleótidos cebadores para la PCR 1 fueron RMLN y N426D-REV y para la PCR2 fueron N426D-FOR y RMLC.

Mutagénesis saturada en la posición 389: Los oligonucleótidos cebadores para la PCR 1 fueron RMLN y SAT389-REV y para la PCR2 fueron SAT389-FOR y RMLC.

Mutagénesis saturada en la posición 454: Los oligonucleótidos cebadores para la PCR 1 fueron RMLN y SAT454-REV y para la PCR2 fueron SAT454-FOR y RMLC.

15

Ensayo de screening high-throughput

Las librerías de mutantes se exploraron en un medio (buffer de sangre) que contenía el sustrato colorimétrico ABTS y que simulaba la composición de la sangre humana, salvo por la ausencia de agentes coagulantes y de células sanguíneas. La 20 composición del buffer de sangre fue: 150 mM de NaCl, 18 mM de NaHCO₃, 1 mg/mL de glucosa, 4.3 mM de urea, 0.87 mM de MgSO₄, 0.4 mM de fructosa, 0.1 mM de L-cisteína y 4.29 mM de ABTS en 100 mM de buffer fosfato sódico. El pH del buffer de sangre se estableció en 6.5 en la primera generación y se aumentó gradualmente a lo largo de la evolución hasta alcanzar el pH fisiológico (7.4) en la cuarta generación. El 25 protocolo de screening-HTP utilizado fue el descrito anteriormente (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010) con algunas modificaciones, descritas a continuación. Se picaron colonias individuales y se cultivaron en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) conteniendo 50 µL de medio mínimo por pocillo. En cada placa, la columna 6 se inoculó con el tipo parental y un pocillo se dejó sin inocular 30 (pocillo H1 – control negativo). Las placas se sellaron para evitar evaporación y se incubaron a 30°C y 80% de humedad relativa en un agitador a 225 rpm (Minitron-INFORS, Biogen, España). Tras 48 h, se añadieron 160 µL de medio de expresión de lacasa (CuSO₄ 2 mM y etanol 25 g/L de concentraciones finales) por pocillo y las placas se incubaron durante 24 h. A continuación, las placas (placas madre) se 35 centrifugaron (centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania) durante 5 min a 3000 x g a 4°C

y se transfirieron 60 μL de sobrenadante desde la placa madre a una placa réplica con ayuda de un robot (robot manipulador de líquidos Quadra, 96-320, Tomtec, Hamden, CT). Se añadieron 140 μL de buffer de sangre (a pH 6.5 en el primer ciclo, pH 7.0 en el segundo y tercer ciclo, y pH 7.4 en el cuarto) a las placas réplica, y tras agitarlas brevemente y permitir la oxidación del sustrato en buffer de sangre, se midió la absorbancia a 418 nm ($\epsilon_{\text{ABTS}^{\bullet+}} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un lector de placas (SpectraMax Plus384, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente hasta que se desarrolló color verde y la absorbancia se midió de nuevo. Las actividades relativas fueron calculadas como la diferencia de absorción antes y después de la incubación y normalizadas respecto al tipo parental usado como referencia en la correspondiente generación (los parentales de referencia fueron los siguientes: 1G, OB-1; 2G, 35H10; 3G, 2E3; 4G, 27C7). Para descartar falsos positivos, se llevaron a cabo dos re-screenings consecutivos de acuerdo con nuestro protocolo ya descrito (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010) con la modificación de emplear el buffer de sangre conteniendo 4.29 mM de ABTS para la medida de la actividad total lacasa, pero utilizando el ensayo con buffer de sangre explicado anteriormente. Adicionalmente, se introdujo un tercer re-screening con el fin de desglosar las mejoras detectadas en términos de actividad frente al pH, tolerancia a iones cloruro y termoestabilidad.

20

Producción y purificación de lacasas

Las variantes de lacasa se produjeron y purificaron a homogeneidad como se describió anteriormente (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010). Además, para los estudios espectroelectroquímicos, se llevó a cabo la sobreproducción de los mutantes en la levadura *Pichia pastoris*, tras su clonación en el vector pPICZ α A bajo el control del promotor inducible por metanol AOX1 (*Pichia* expression kit, Life Technologies, Carlsbad, CA).

Medida de la actividad lacasa en plasma y sangre humanos

La sangre humana se recogió en tubos para extracción de sangre BD Vacutainer® (Plymoth, Reino Unido). Las muestras sanguíneas se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm para obtener el plasma, extrayéndose el sobrenadante cuidadosamente y descartándose el pellet. Tanto el plasma como la sangre se suplementaron con 10 mM de ácido ascórbico (sustrato reductor) y el pH se ajustó a 7.4. La actividad del mutante ChU-B en ambos fluidos fisiológicos se determinó mediante la medida del consumo de

35

oxígeno en disolución utilizando un electrodo de Clark. Estos experimentos se llevaron a cabo usando el sistema Oxygraph (Hansatech Instruments, King's Lynn, Reino Unido) y teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción: una molécula de oxígeno es reducida por la oxidación de cuatro moléculas de sustrato. La actividad del mutante ChU-B fue también medida en buffer de sangre empleando el mismo protocolo descrito arriba y los siguientes sustratos: ferrocianuro potásico, $K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mM de concentración final); ABTS (5 mM de concentración final); y ácido ascórbico (10 mM de concentración final).

10 **Caracterización bioquímica**

Determinación de las velocidades máximas de transformación en buffer de sangre: Las velocidades de transformación se determinaron en buffer de sangre (pH 7.4) para ABTS y DMP. La reacción se inició tras la adición de la enzima (4.7 y 22.7 nM utilizando ABTS y DMP como sustrato reductor, respectivamente) a la mezcla de ensayo (1.3 mM de ABTS ó 2.8 mM de DMP en buffer de sangre). Todas las medidas se hicieron por triplicado.

Perfiles de actividad frente al pH: Los perfiles de pH se determinaron dentro del rango de pH entre 2.0 y 9.0 como se describió anteriormente (Camarero, Pardo et al. 2012).

Inhibición por haluros (determinación de la I_{50}): El efecto inhibitor del fluoruro, cloruro y bromuro se midió utilizando los sustratos ABTS y DMP a sus correspondientes valores de pH óptimo (en buffer acetato sódico 100 mM pH 4.0 para ABTS y en buffer tartrato sódico 100 mM pH 5.0 para DMP) así como a pH fisiológico (en buffer fosfato sódico 100 mM pH 7.4). Se determinó la inhibición mediante el valor de I_{50} (definida como la concentración de haluro a la cual la enzima retiene el 50% de su actividad inicial), ya que la complejidad de los puntos dificultaron el cálculo de la constante de inhibición (K_i). La mezcla de ensayo contenía 2.4 mM de ABTS ó DMP, haluro en concentraciones comprendidas entre 0 y 1100 mM, y lacasa pura (0.2 y 1.7 nM para ABTS y DMP, respectivamente). Cada punto de los datos del gráfico representa el valor promedio de tres experimentos independientes.

Termoestabilidad (determinación de T_{50}): La termoestabilidad de las distintas lacasas mutante se estimó mediante la determinación de sus valores de T_{50} como se reportó en un trabajo anterior (García-Ruiz, Mate et al. 2010).

Estudios espectroelectroquímicos

Determinación del potencial redox: La valoración redox de los mutantes de lacasa se llevó a cabo como se describió anteriormente para el parental OB-1 (Mate, Garcia-Ruiz et al. 2013) con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizó una celda micro-espectroelectroquímica conteniendo un electro capilar de oro y controlándose el potencial mediante un potenciostato de tres electrodos BAS LC-3E (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, EE.UU.), con un electrodo de Ag | AgCl | KCl (+210 mV vs ENH) como electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo.

5

10 Los espectros de absorbancia se registraron en un espectrómetro de alta resolución HR4000 con un rango de medida entre 200 y 1100 nm utilizando una lámpara DH-2000, ambos de Ocean Optics (Dunedin, FL, EE.UU.) El potencial redox del sitio T1 de la enzima se determinó por valoración redox mediada (VRM) empleándose el equipo antes descrito. La VRM se llevó a cabo mediante un complejo sistema de mediadores

15 formado por tres mediadores redox diferentes: $K_4[Fe(CN)_6]$ y $K_4[Mo(CN)_8]$ con potenciales redox formales de +430 mV y +780 mV vs ENH, respectivamente, y $K_4[W(CN)_8]$ con un potencial redox formal de +520 mV vs ENH y que fue sintetizado como se describió anteriormente (Leipoldt, Bok et al. 1974) . Todos los experimentos se realizaron en buffer fosfato sódico 50 mM pH 7.4.

20

Medidas electroquímicas: Las medias electroquímicas se llevaron a cabo con un analizador Autolab PGSTAT30 controlado por el software GPES 4.9 (Eco Chemie, Países Bajos). Los experimentos se realizaron en una celda de vidrio para tres electrodos empleando un electrodo de Ag | AgCl | KCl como electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo. Los electrodos de grafito de baja densidad se pulieron con papel de lija y se sonicaron. Se depositó una gota de 5 μ L de lacasa (13 mg/mL) en un electrodo de grafito de baja densidad limpio y tras esperar 20 min para permitir la adsorción de la enzima en la superficie del electrodo, éste se sumergió en la celda electroquímica, la cual fue burbujeada con oxígeno gaseoso a 1 atm de presión durante 15 min. Para las medidas electrocatalíticas, las densidades de corriente se recalcularon en función del área geométrica de los electrodos y los potenciales se recalcularon en base al potencial del ENH. Los voltamogramas cíclicos fueron registrados entre +1100 mV y +210 mV vs ENH utilizando una velocidad de barrido de 10 mV/s.

35

Modelos tridimensionales

Los modelos estructurales de la lacasa parental y de las lacasas evolucionadas se generaron y analizaron como se describió anteriormente (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010).

5

REFERENCIAS

- Alcalde, M. (2007). Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications. Industrial Enzymes. J. Polaina and A. MacCabe, Springer Netherlands: 461-476.
- 10 Alcalde, M. (2010). "Mutagenesis protocols in *Saccharomyces cerevisiae* by in vivo overlap extension." *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 634: 3-14.
- Alcalde, M., M. Ferrer, F. J. Plou and A. Ballesteros (2006). "Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes." *Trends in Biotechnology* 24(6): 281-287.
- 15 Bullen, R. A., T. C. Arnot, J. B. Lakeman and F. C. Walsh (2006). "Biofuel cells and their development." *Biosens Bioelectron* 21(11): 2015-2045.
- Camarero, S., I. Pardo, A. I. Canas, P. Molina, E. Record, A. T. Martinez, M. J. Martinez and M. Alcalde (2012). "Engineering Platforms for Directed Evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*." *Applied and Environmental Microbiology*
- 20 78(5): 1370-1384.
- Castillo, J., S. Gaspar, S. Leth, M. Niculescu, A. Mortari, I. Bontidean, V. Soukharev, S. A. Dorneanu, A. D. Ryabov and E. Csoregi (2004). "Biosensors for life quality - Design, development and applications." *Sensors and Actuators B-Chemical* 102(2): 179-194.
- 25 Cusano, A. M., Y. Mekmouche, E. Meglec and T. Tron (2009). "Plasticity of laccase generated by homeologous recombination in yeast." *FEBS J* 276(19): 5471-5480.
- Garcia-Ruiz, E., D. Mate, A. Ballesteros, A. T. Martinez and M. Alcalde (2010). "Evolving thermostability in mutant libraries of ligninolytic oxidoreductases expressed in yeast." *Microbial Cell Factories* 9.
- 30 Garzillo, A. M., M. C. Colao, C. Caruso, C. Caporale, D. Celletti and V. Buonocore (1998). "Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*." *Appl Microbiol Biotechnol* 49(5): 545-551.
- Gianfreda, L., F. Xu and J.-M. Bollag (1999). "Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes." *Bioremediation Journal* 3(1): 1-26.

- Gonzalez-Perez, D., E. Garcia-Ruiz and M. Alcalde (2012). "Saccharomyces cerevisiae in directed evolution: An efficient tool to improve enzymes." *Bioengineered bugs* 3(3): 172-177.
- Jimenez-Juarez, N., R. Roman-Miranda, A. Baeza, A. Sanchez-Amat, R. Vazquez-Duhalt and B. Valderrama (2005). "Alkali and halide-resistant catalysis by the multipotent oxidase from *Marinomonas mediterranea*." *J Biotechnol* 117(1): 73-82.
- 5 Kittl, R., C. Gonaus, C. Pillei, D. Haltrich and R. Ludwig (2012). "Constitutive expression of *Botrytis aclada* laccase in *Pichia pastoris*." *Bioengineered* 3(4): 232-235.
- 10 Kunamneni, A., S. Camarero, C. Garcia-Burgos, F. J. Plou, A. Ballesteros and M. Alcalde (2008). "Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis." *Microbial Cell Factories* 7.
- Leipoldt, J. G., L. D. C. Bok and P. J. Cilliers (1974). "Preparation of Potassium Octacyanotungstate(IV)Dihydrate." *Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie* 407(3): 350-352.
- 15 Madzak, C., M. C. Mimmi, E. Caminade, A. Brault, S. Baumberger, P. Briozzo, C. Mouglin and C. Jolivald (2006). "Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis." *Protein Eng Des Sel* 19(2): 77-84.
- 20 Martinez, A. T., F. J. Ruiz-Duenas, M. J. Martinez, J. C. Del Rio and A. Gutierrez (2009). "Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill." *Curr Opin Biotechnol* 20(3): 348-357.
- Mate, D., C. Garcia-Burgos, E. Garcia-Ruiz, A. O. Ballesteros, S. Camarero and M. Alcalde (2010). "Laboratory Evolution of High-Redox Potential Laccases." *Chemistry & Biology* 17(9): 1030-1041.
- 25 Mate, D., E. Garcia-Ruiz, S. Camarero and M. Alcalde (2011). "Directed Evolution of Fungal Laccases." *Current Genomics* 12(2): 113-122.
- Mate, D. M., E. Garcia-Ruiz, S. Camarero, V. V. Shubin, M. Falk, S. Shleev, A. O. Ballesteros and M. Alcalde (2013). "Switching from blue to yellow: altering the spectral properties of a high redox potential laccase by directed evolution." *Biocatalysis and Biotransformation* 31(1): 8-21.
- 30 Matera, I., A. Gullotto, S. Tilli, M. Ferraroni, A. Scozzafava and F. Briganti (2008). "Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate." *Inorganica Chimica Acta* 361(14-15): 4129-4137.

- Morozova, O. V., G. P. Shumakovich, M. A. Gorbacheva, S. V. Shleev and A. I. Yaropolov (2007). "Blue" laccases." *Biochemistry (Mosc)* 72(10): 1136-1150.
- Niladevi, K. N., N. Jacob and P. Prema (2008). "Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and characterization." *Process Biochemistry* 43(6): 654-660.
- 5 Rodgers, C. J., C. F. Blanford, S. R. Giddens, P. Skamnioti, F. A. Armstrong and S. J. Gurr (2010). "Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?" *Trends Biotechnol* 28(2): 63-72.
- Rodriguez Couto, S. and J. L. Toca Herrera (2006). "Industrial and biotechnological applications of laccases: a review." *Biotechnol Adv* 24(5): 500-513.
- 10 Shleev, S. and T. Ruzgas (2008). "Transistor-Like Behavior of a Fungal Laccase." *Angewandte Chemie International Edition* 47(38): 7270-7274.
- Singh, G., A. Bhalla, P. Kaur, N. Capalash and P. Sharma (2011). "Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 10(4): 309-326.
- 15 Witayakran, S. and A. J. Ragauskas (2009). "Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry." *Advanced Synthesis & Catalysis* 351(9): 1187-1209.
- Xu, F. (1996). "Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition." *Biochemistry* 35(23): 7608-7614.
- 20 Xu, F. (1997). "Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases." *J Biol Chem* 272(2): 924-928.
- Xu, F., R. M. Berka, J. A. Wahleithner, B. A. Nelson, J. R. Shuster, S. H. Brown, A. E. Palmer and E. I. Solomon (1998). "Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile." *Biochem J* 334 (Pt 1): 63-70.
- 25 Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter and F. H. Arnold (1998). "Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination." *Nat Biotechnol* 16(3): 258-261.
- Zumarraga, M., S. Camarero, S. Shleev, A. Martinez-Arias, A. Ballesteros, F. J. Plou and M. Alcalde (2008). "Altering the laccase functionality by in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra." *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 71(1): 250-260.
- 30

REIVINDICACIONES

1.- Polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad lacasa activo a condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o que presenta actividad en sangre y plasma humano, caracterizado porque la secuencia aminoacídica del polipéptido que codifica presenta una identidad de al menos un 50% con la SEQ ID NO: 2 (OB-1), y porque comprende al menos una alteración aminoacídica en la posición homóloga a la posición 487 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por el aminoácido isoleucina (I) (mutación F396I).

2.- Polinucleótido según la reivindicación 1, caracterizado por que su secuencia aminoacídica posee además una de las siguientes mutaciones adicionales o cualesquiera de sus combinaciones:

- a) La sustitución del aminoácido serina (S) por el aminoácido arginina (R) en la posición homóloga a la posición 226 de SEQ ID NO 2 (S135R),
- b) La sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) por el aminoácido asparagina (N) en la posición homóloga a la posición 296 de SEQ ID NO 2 (D205N),
- c) La sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 309 de SEQ ID NO 2 (T218V),
- d) La delección del aminoácido alanina (A) en la posición homóloga a la posición 480 de SEQ ID NO 2 (A389-),
- e) La sustitución del aminoácido asparagina (N) por el aminoácido ácido aspártico (D) en la posición homóloga a la posición 517 de SEQ ID NO 2 (N426D),
- f) La sustitución del aminoácido isoleucina (I) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 543 de SEQ ID NO 2 (I452V),
- g) La sustitución del aminoácido fenilalanina (F) por un aminoácido que se escoge de entre los siguientes: serina (S), prolina (P), treonina (T), alanina (A), glicina (G), arginina (R) o glutámico (E), en la posición homóloga a la posición 545 de SEQ ID NO 2 (F454S, F454P, F454T, F454A, F454G, F454R, F454E, respectivamente), y
- h) La sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido serina (S) en la posición homóloga a la posición 578 de SEQ ID NO 2 (T487S).

- 3.- Polinucleótido según la reivindicación 1 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la SEQ ID NO 3.
- 5 4.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 5.
- 5.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 7.
- 10 6.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 9.
- 7.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 11.
- 15 8.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 13.
- 9.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 15.
- 10.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 17.
- 25 11.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 19.
- 12.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 21.
- 30 13.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 23.

- 14.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 25.
- 15.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su
5 secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 27.
- 16.- Polipéptido con actividad lacasa activa en condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o activa en
10 sangre y plasma humano caracterizado por que es codificado por alguna de las secuencias nucleotídicas según las reivindicaciones 1 a 15.
- 17.- Polipéptido según la reivindicación 16 caracterizado por que su secuencia se corresponde con alguna de las siguientes: SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8,
15 SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 22, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 28.
- 18.- Polipéptido según la reivindicación 16 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 10.
20
- 19.- Método de obtención del polipéptido según las reivindicaciones 16 a la 18 caracterizado por comprender las siguientes etapas:
- a. Introducir un vector con el polinucleótido según una de las reivindicaciones 1 a la 15 en una célula hospedadora adecuada,
 - 25 b. Cultivar la célula hospedadora en un medio adecuado, y,
 - c. Purificar el polipéptido con actividad lacasa.
- 20.- Célula hospedadora caracterizada por que comprende el polinucleótido según las reivindicaciones 1 a la 15 y es capaz de producir el polipéptido según las
30 reivindicaciones 16 a la 18.
- 21.- La célula hospedadora según la reivindicación 20 caracterizada por ser una levadura.

- 22.- La célula hospedadora según la reivindicación 21 caracterizada por pertenecer al género *Saccharomyces* sp. o *Pichia* sp, particularmente, las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*.
- 5 23.- El uso de la célula hospedadora según las reivindicaciones 20 a la 22 en procesos de biorremediación y degradación de residuos.
- 24.- Uso del polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18 en procesos de biorremediación.
- 10 25.- Uso del polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18 en procesos de bioblanqueo de pastas kraft.
- 26.- Uso del polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18 en síntesis orgánica.
- 15 27.- Kit de diagnóstico biomédico para la detección de metabolitos y medición de su concentración en diferentes muestras biológicas caracterizado por que comprende un polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18.
- 20 28.- Uso del polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18 en la elaboración de dispositivos bioelectrónicos que contienen enzimas inmovilizadas.
- 29.- Dispositivo bioelectrónico según la reivindicación 28 caracterizado por que comprende el polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18.
- 25 30.- Uso del dispositivo bioelectrónico según la reivindicación 29 para la elaboración de una composición farmacéutica de diagnóstico biomédico *in vivo*.

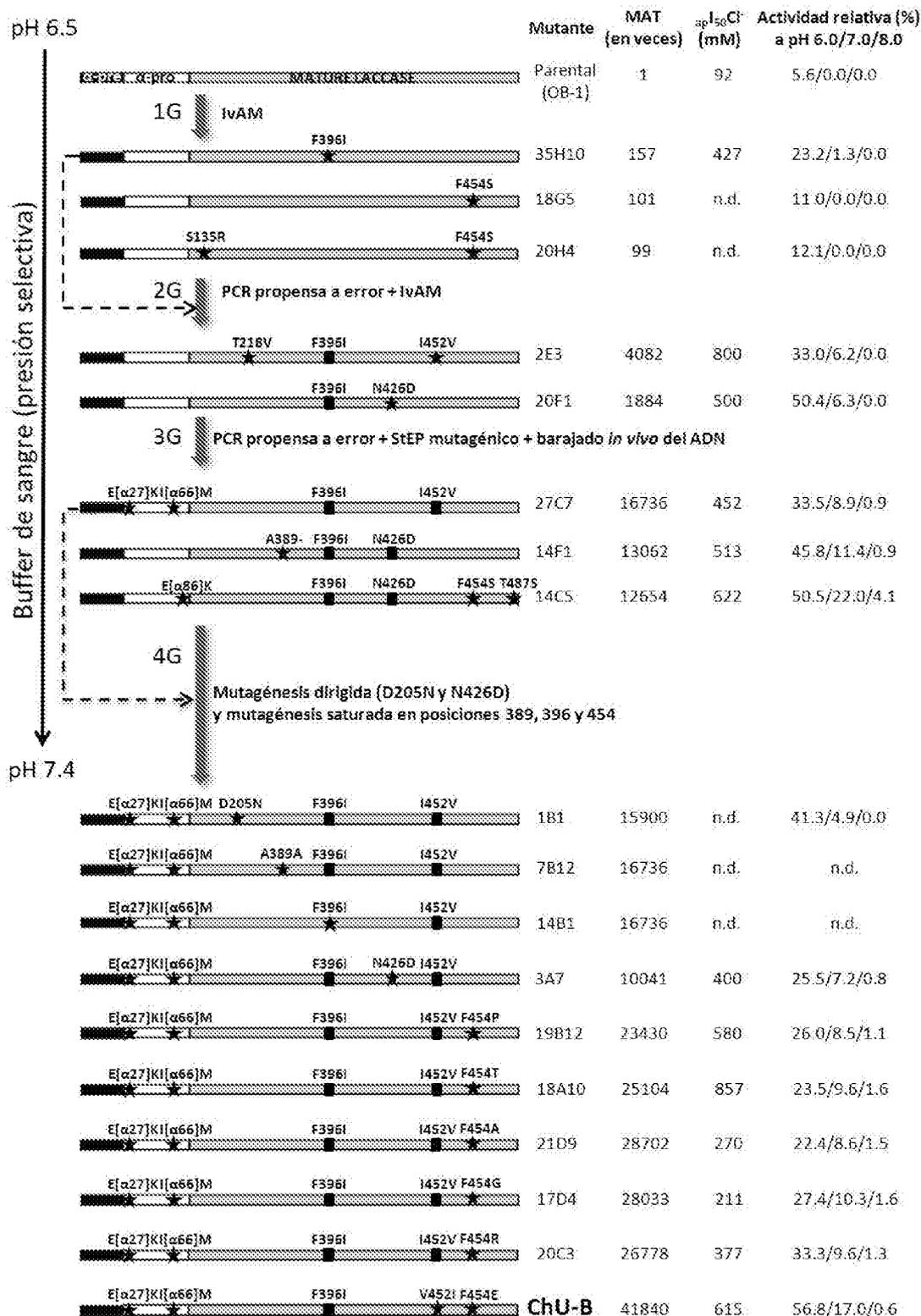


Fig. 1

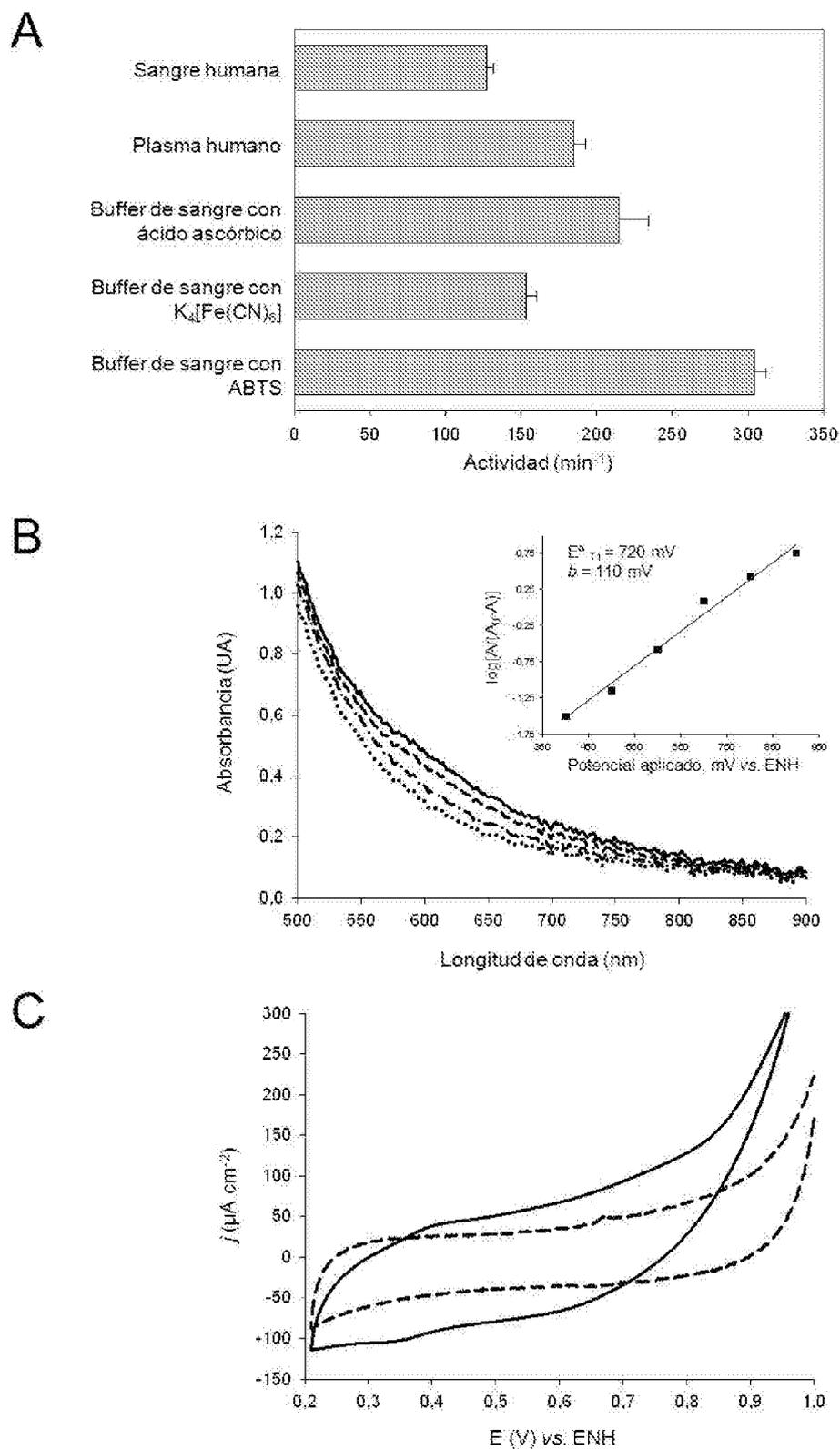


Fig. 2

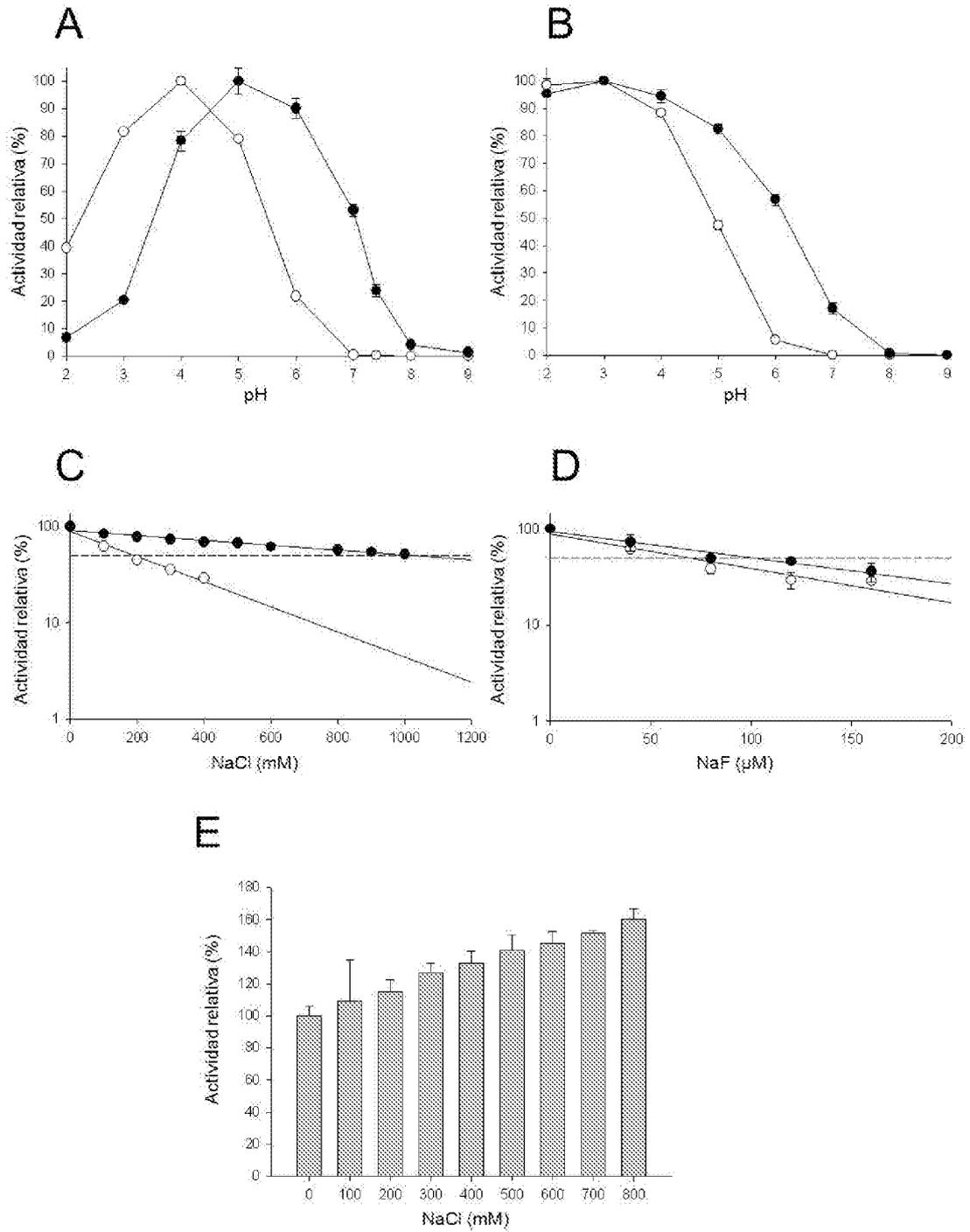


Fig. 3

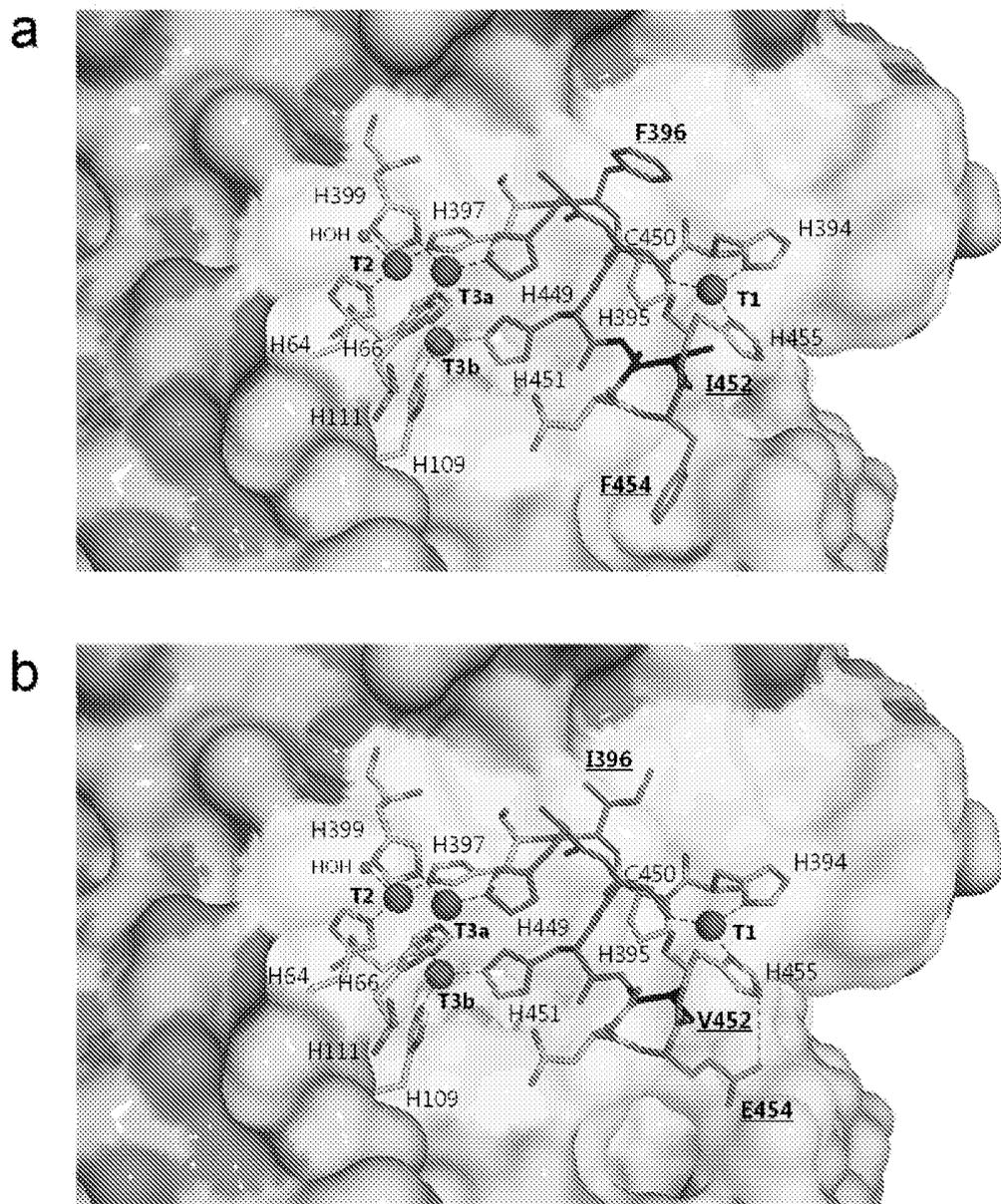


Fig. 4

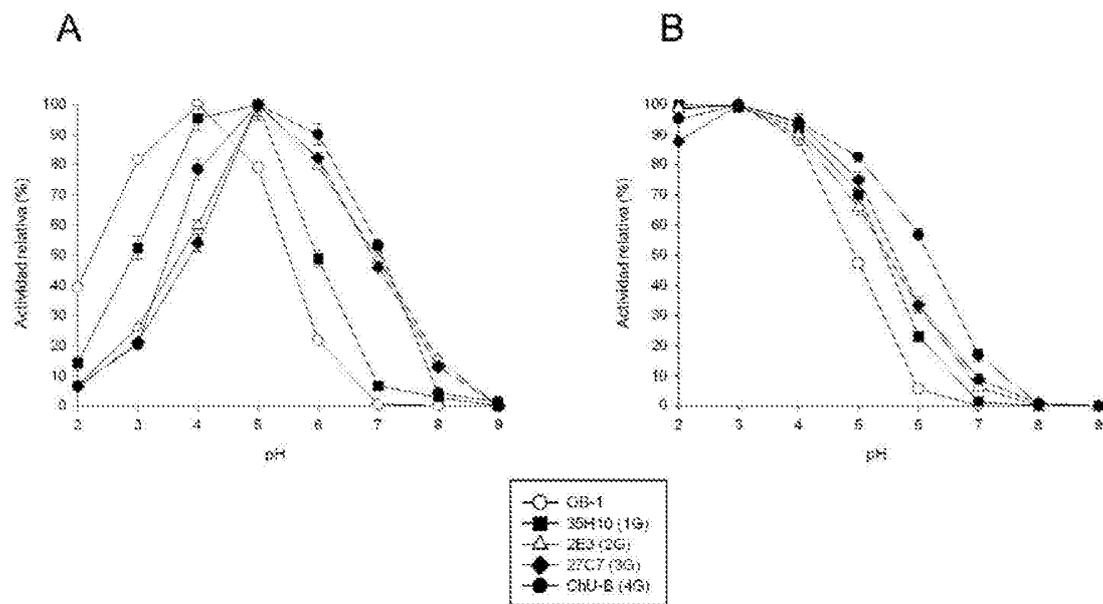


Fig. 5

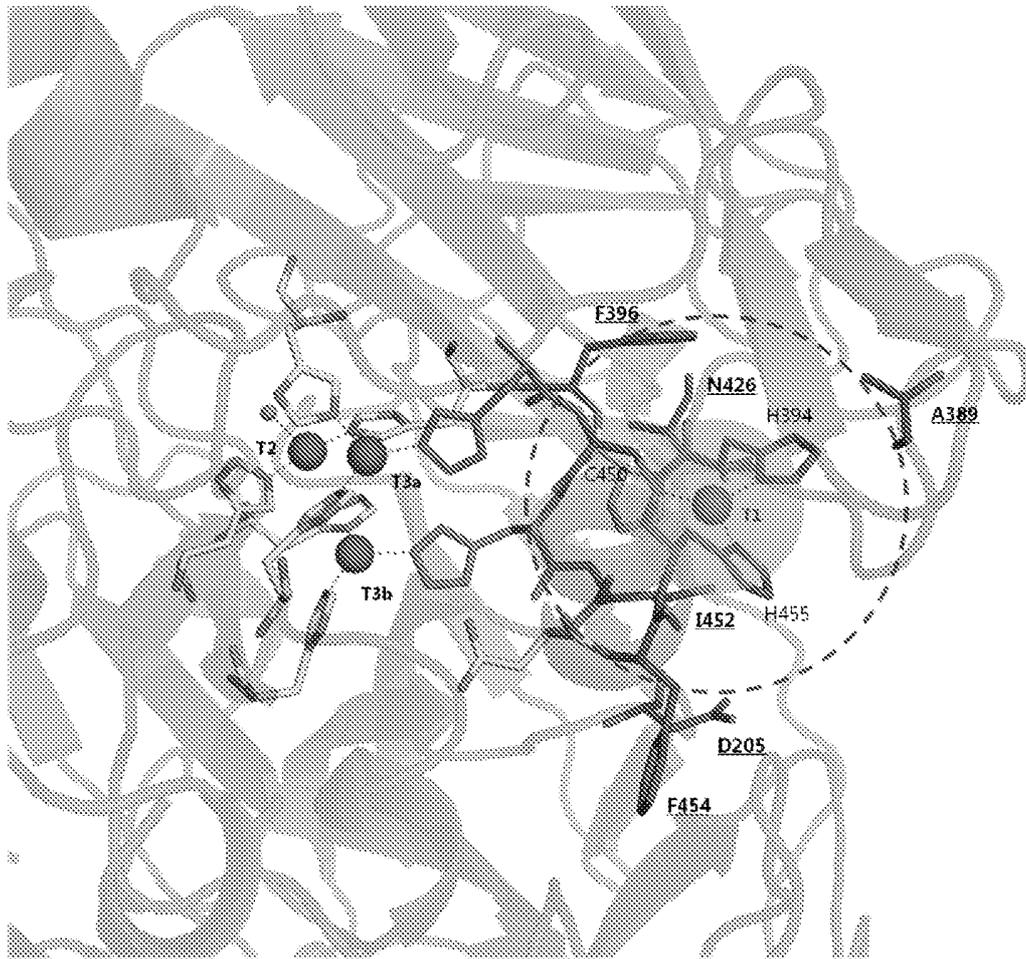


Fig. 6

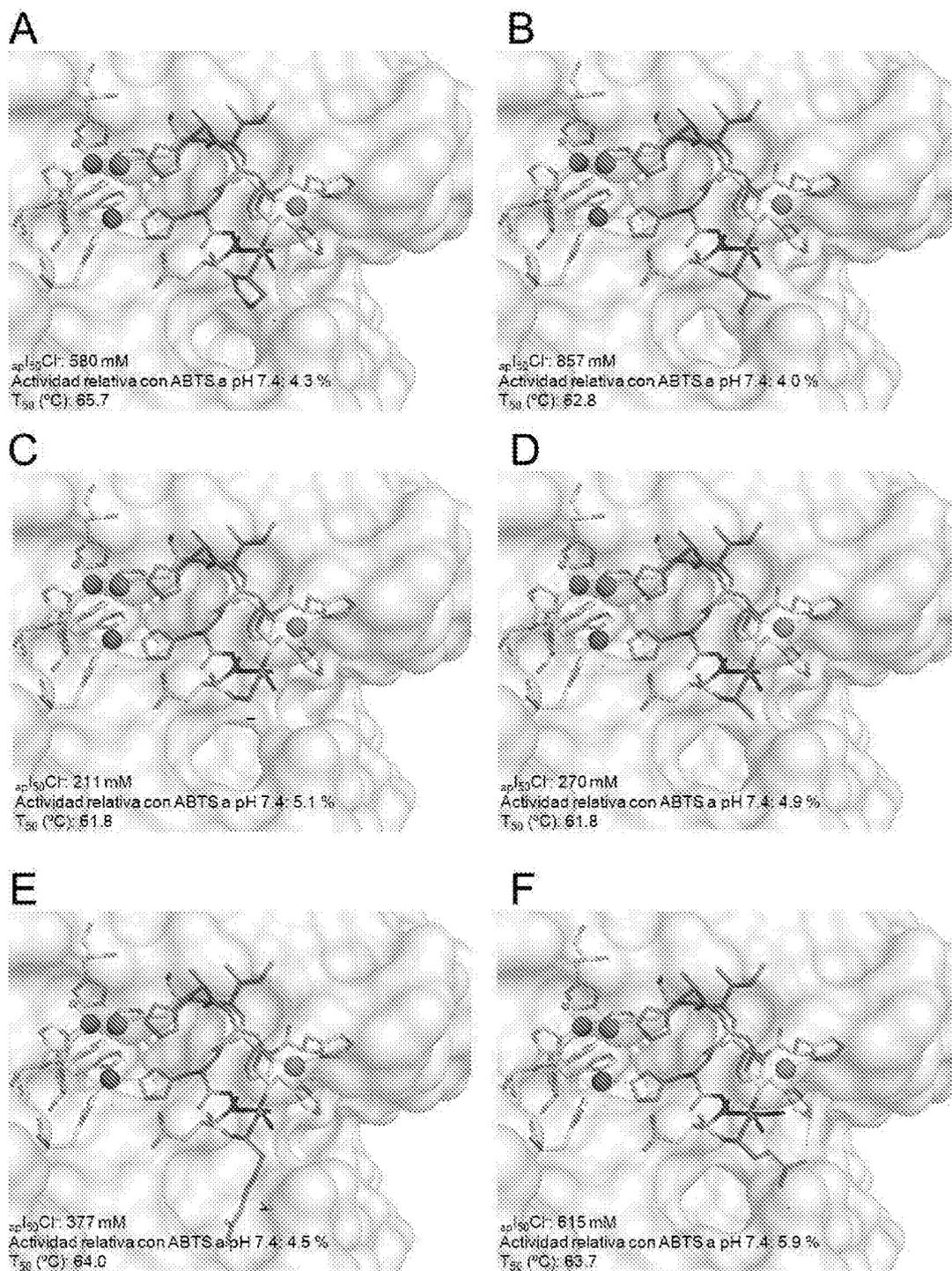


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/02 (2006.01)

C12N15/52 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011144784 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS- CSIC) 24/11/2011, the whole document.	1-30
A	WO 2009127702 A2 (NOVOZYMES AS.) 22/10/2009, the whole document.	1-30
A	PARDO, I. et al., 'Development of chimeric laccases by directed evolution.', BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2012 Dec, Vol. 109, No. 12, ISSN: 0006-3592(print), ISSN: 1097-0290(electronic), Pages 2978-2986. doi: 10.1002/bit.24588. Epub: 12/07/ 2012, the whole document.	1-30
A	MATE, D.M. et al., 'Directed evolution of fungal laccases.', CURRENT GENOMICS, 2011 Apr, Vol. 12, No. 2, Pages 113-122, ISSN: 1389-2029, doi: 10.2174/138920211795564322, the whole document.	1-30

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23/05/2014

Date of mailing of the international search report
(28.05.2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
J. Vizán Arroyo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498573

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070113

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATE, D.M. et al., 'Laboratory evolution of high-redox potential laccases.', CHEMISTRY & BIOLOGY, 2010 Sep, Vol. 17, No. 9, Pages 1030-1041, ISSN: 1074-5521, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.07.010, the whole document.	1-30
A	CAMARERO, S. et al., 'Engineering platforms for directed evolution of Laccase from Pycnoporus cinnabarinus.', APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2012 Mar, Vol. 78, No. 5, Pages 1370-1384, ISSN: 1098-5336 (Electronic), doi: 10.1128/AEM.07530-11, the whole document.	1-30
P,X	MATE, D.M. et al., 'Blood tolerant laccase by directed evolution', CHEMISTRY & BIOLOGY, 2013 Feb 21, Vol. 20, No.2, Pages 223-231, ISSN: 1074-5521(print), ISSN: 1879-1301(electronic), doi: 10.1016/j.chembiol.2013.01.001, the whole document.	1-30
P,X	MATE, D.M. et al., 'Functional expression of a blood tolerant laccase in Pichia pastoris.', BMC BIOTECHNOLOGY, 2013 Apr 30, Vol. 13, No. 38, ISSN: 1472-6750, doi: 10.1186/1472-6750-13-38, the whole document.	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070113

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2011144784 A1	24.11.2011	ES2370216 A1 ES2370216 B1	13.12.2011 19.10.2012
-----	-----	-----	-----
WO2009127702 A2	22.10.2009	US2011091934 A1 EP2268802 A2 TW200948964 A	21.04.2011 05.01.2011 01.12.2009
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070113

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/02 (2006.01)

C12N15/52 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 2011144784 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS- CSIC) 24/11/2011, todo el documento.	1-30
A	WO 2009127702 A2 (NOVOZYMES AS.) 22/10/2009, todo el documento.	1-30
A	PARDO, I. et al., 'Development of chimeric laccases by directed evolution.', BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2012 Dec, Vol. 109, No. 12, ISSN: 0006-3592(print), ISSN: 1097-0290(electronic), Páginas 2978-2986. doi: 10.1002/bit.24588. Epub: 12/07/ 2012, todo el documento.	1-30
A	MATE, D.M. et al., 'Directed evolution of fungal laccases.', CURRENT GENOMICS, 2011 Apr, Vol. 12, No. 2, Páginas 113-122, ISSN: 1389-2029, doi: 10.2174/138920211795564322, todo el documento.	1-30

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
23/05/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
28 Mayo 2014 (28.05.2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado

J. Vizán Arroyo

Nº de teléfono 91 3498573

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070113

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	MATE, D.M. et al., 'Laboratory evolution of high-redox potential laccases.', CHEMISTRY & BIOLOGY, 2010 Sep, Vol. 17, No. 9, Páginas 1030-1041, ISSN: 1074-5521, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.07.010, todo el documento.	1-30
A	CAMARERO, S. et al., 'Engineering platforms for directed evolution of Laccase from Pycnoporus cinnabarinus.', APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2012 Mar, Vol. 78, No. 5, Páginas 1370-1384, ISSN: 1098-5336 (Electronic), doi: 10.1128/AEM.07530-11, todo el documento.	1-30
P,X	MATE, D.M. et al., 'Blood tolerant laccase by directed evolution', CHEMISTRY & BIOLOGY, 2013 Feb 21, Vol. 20, No.2, Páginas 223-231, ISSN: 1074-5521(print), ISSN: 1879-1301(electronic), doi: 10.1016/j.chembiol.2013.01.001, todo el documento.	1-30
P,X	MATE, D.M. et al., 'Functional expression of a blood tolerant laccase in Pichia pastoris.', BMC BIOTECHNOLOGY, 2013 Apr 30, Vol. 13, No. 38, ISSN: 1472-6750, doi: 10.1186/1472-6750-13-38, todo el documento.	1-30

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2014/070113

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2011144784 A1	24.11.2011	ES2370216 A1	13.12.2011
-----	-----	ES2370216 B1	19.10.2012
WO2009127702 A2	22.10.2009	US2011091934 A1	21.04.2011
-----	-----	EP2268802 A2	05.01.2011
-----	-----	TW200948964 A	01.12.2009
-----	-----	-----	-----