

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 910**

51 Int. Cl.:

C12N 9/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2016 PCT/ES2016/070809**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17081355**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2016 E 16863726 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3375869**

54 Título: **Mutantes de la peroxigenasa inespecífica con alta actividad monooxigenasa y sus usos**

30 Prioridad:

13.11.2015 ES 201531641

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.10.2020

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**C/ Serrano 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**MOLINA ESPEJA, PATRICIA;
PLOUGASCA, FRANCISCO JOSÉ;
ALCALDE GALEOTE, MIGUEL y
GÓMEZ DE SANTOS, PATRICIA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 784 910 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mutantes de la peroxigenasa inespecífica con alta actividad monooxigenasa y sus usos

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular, la tecnología del ADN recombinante y la biotecnología. Específicamente, se refiere a una enzima peroxigenasa mejorada en su expresión funcional en forma activa, soluble y estable, que presenta un incremento en su actividad peroxigenasa y un descenso en su actividad peroxidasa, respecto a la enzima nativa o *wild-type*, y que se ha obtenido a través de un proceso de evolución molecular dirigida. Dicha enzima puede emplearse en procesos químicos, incluyendo transformaciones industriales como son la oxifuncionalización selectiva de enlaces carbono-hidrógeno de diversos compuestos orgánicos, preferentemente en aquellos procesos de hidroxilación que transforman el naftaleno en 1-naftol y/o el propranolol en 5'-hidroxipropranolol.

15 ESTADO DE LA TÉCNICA

Los procedimientos de síntesis orgánica, preferentemente los procesos dirigidos a la oxifuncionalización selectiva de enlaces carbono-hidrógeno de diversos compuestos orgánicos y más específicamente aquellos procesos de hidroxilación de compuestos para obtener otros productos con unas características más adecuadas para diferentes usos, como por ejemplo, síntesis de productos agroquímicos, herbicidas, insecticidas, fármacos, cosméticos y precursores de colorantes dar lugar, se lleva a cabo hoy en día mediante el uso de catalizadores químicos, tales como por ejemplo, ácido sulfónico y compuestos de platino, que son productos altamente contaminantes, con bajos números de recambio y reducida regioselectividad, además de un elevado consumo energético (elevadas temperaturas y presiones), altos costes de producción y gran liberación de residuos.

En la búsqueda de una alternativa más ecológica y para evitar con ello los inconvenientes mencionados del uso de los catalizadores químicos en este tipo de reacciones, se han utilizado microorganismos tales como *Cunninghamella*, *Bacillus cereus* ATCC14579, el alga verde *Chlorella* y varios hongos, así como enzimas que transforman, mediante procedimientos de hidroxilación, por ejemplo el naftaleno en 1-naftol. En este sentido, las enzimas con actividad monooxigenasa, que llevan a cabo la oxifuncionalización selectiva de anillos aromáticos, pueden ofrecer una alternativa más ecológica a los habituales procesos químicos.

Tomando como ejemplo el caso del hidrocarburo aromático 1-naftol, su síntesis partiendo de naftaleno se lleva a cabo con enzimas que presentan actividad monooxigenasa. En concreto, las P450 monooxigenasas, son enzimas que presentan dicha actividad y han sido sometidas a ingeniería para distintos propósitos a lo largo de los años, desde la hidroxilación selectiva de alcanos -incluyendo hidroxilación terminal- a la ciclopropanación no natural de olefinas mediante transferencia de carbono. Dichas enzimas P450 monooxigenasas transforman naftaleno a 1-naftol bien mediante la ruta *bypass* del peróxido (*peroxide shunt pathway*) o mediante su actividad natural NAD(P)H dependiente (H. J. Zhanglin, F. H. Arnold, *Nature* 1999, 399, 670-673; P. C. Cirino, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 3299-3301; P. Meinhold, et al. *Adv. Synth. Catal.* 2006, 348, 763-772; P. S. Coelho, et al. *Science*, 2013, 339, 307-310). Más recientemente, también se ha descrito la evolución de la enzima tolueno orto-monooxigenasa (TOM) y su implicación en el proceso de un sistema biocatalítico celular (K. A. Canada, et al. *J. Bacteriol.* 2002, 184, 344-349; L. Rui, et al. *Appl. Environ. Microb.* 2004, 70, 3246-3252; J. Garikipati, et al. *Appl. Environ. Microb.* 2009, 75, 6545-6552). En todos estos casos, la baja estabilidad enzimática de las enzimas mencionadas previamente, junto a los elevados requerimientos en lo que a cofactores redox de elevado coste (NAPDH) y dominios reductores asociados (flavinas) se refiere, han imposibilitado el uso industrial de las mismas en la síntesis del hidrocarburo aromático 1-naftol a partir de naftaleno.

Por otro lado, los metabolitos humanos de fármacos (*Human Drugs Metabolites*, HDMs) son el resultado del metabolismo de compuestos farmacéuticos, principalmente mediante las enzimas P450s monooxigenasas hepáticas. Para la industria farmacéutica, es clave la evaluación de la toxicidad, eficacia y actividad de estos metabolitos, pero la síntesis química de los mismos hasta ahora produce rendimientos muy bajos además de resultar harto complicada. Entre los HDMs más importantes, destacan aquellos derivados del hidrocarburo propranolol, tales como el 5'-hidroxipropranolol. El propranolol es un fármaco beta-bloqueante utilizado comúnmente para el tratamiento de la hipertensión, profilaxis de migrañas infantiles y la atenuación de manifestaciones físicas de la ansiedad. Hasta ahora, las alternativas enzimáticas conocidas para la obtención de derivados del propranolol son las enzimas P450 monooxigenasas, u otras peroxigenasas inespecíficas de hongos como *Agrocybe aegerita* (*AaeUPO*) y *Coprinellus radians* (*CraUPO*). En concreto, las P450 monooxigenasas requieren de entornos celulares y/o costosos cofactores redox (NADPH), así como dominios reductores (flavinas) asociados, además de mostrar bajas estabilidades operacionales y una regioselectividad baja. Por otro lado, las peroxigenasas específicas de hongos descritas requieren de antioxidantes como el ácido ascórbico para evitar la oxidación posterior del producto de interés.

Una de las enzimas estudiadas para la síntesis de los compuestos mencionados anteriormente, 1-naftol y 5'-hidroxipropranolol, ha sido la enzima UPO (*Unspecific PerOxygenase*, E.C.1.11.2.1) secretada por el hongo basidiomiceto *Agrocybe aegerita*, y conocida como la primera peroxigenasa aromática natural "verdadera". La enzima *AaeUPO* presenta unas propiedades que se asemejan a las de las enzimas P450 monooxigenasas, en cuanto a la oxifuncionalización selectiva de enlaces carbono-hidrógeno de diversos compuestos orgánicos. WO2015079064 describe mutante UPA para incrementar la actividad peroxigenasa y disminuir la actividad peroxidasa. La *AaeUPO* es una enzima extracelular, muy activa y estable, además de no necesitar cofactores redox ni flavoproteínas auxiliares, es decir, es autosuficiente. Con unos requerimientos mínimos, tan sólo concentraciones catalíticas de H₂O₂ (actuando éste como co-oxidante enzimático -aceptor de electrones primario- así como de fuente de oxígeno), la *AaeUPO* es capaz de realizar una enorme variedad de transformaciones de gran complejidad en síntesis orgánica, como por ejemplo la hidroxilación de compuestos aromáticos y alifáticos, la epoxidación de olefinas, la N- y S-oxidación de compuestos heterocíclicos o la rotura de enlaces éter, entre muchas otras. Asimismo, presenta actividad mono(per)oxigenasa natural, como las enzimas P450 monooxigenasas, y actividad peroxidasa sobre sustratos fenólicos (M. Kluge, et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 81, 1071-1076). La coexistencia de ambas actividades, peroxigenasa y peroxidasa, en la misma enzima resulta problemática cuando el objetivo es emplear esta enzima en un proceso industrial, ya que los productos de hidroxilación de la *AaeUPO* siempre aparecen junto a diversas cantidades de productos de oxidación derivados de los primeros. Esto es así especialmente para las hidroxilaciones aromáticas en las cuales el/los producto/s liberados por la actividad peroxigenasa puede/n a su vez ser nuevamente sustratos para la actividad peroxidasa de la UPO, promoviendo ésta la formación de quinonas que conllevan una polimerización no enzimática que afecta al rendimiento total del proceso.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de disponer de enzimas que presenten un incremento en su actividad monooxigenasa, en detrimento de su actividad peroxidasa, junto con una alta estabilidad enzimática, alta regioselectividad y que además sean autosuficientes, es decir, que no necesiten de la presencia de cofactores para llevar a cabo su actividad monooxigenasa. Es importante también tener en cuenta que dichas enzimas requieren de sistemas de expresión robustos que proporcionen altos niveles de enzima activa. Por lo tanto, dichas enzimas, gracias a las características mencionadas, serán idóneas para su uso en procedimientos de síntesis orgánica, preferentemente en procesos de oxifuncionalización, oxidación o hidroxilación selectiva de hidrocarburos en general, tanto aromáticos como alifáticos, lineales, ramificados y cíclicos, preferentemente el procedimiento de hidroxilación de compuestos aromáticos cíclicos, tanto de compuesto cíclicos simples o condensados, más preferiblemente procedimiento de hidroxilación para la síntesis de 1-naftol y/o de síntesis de 5'-hidroxipropranolol, donde dichos procesos se llevarán a cabo en un único paso, en condiciones suaves, tales como temperatura ambiente, presión atmosférica y en una solución acuosa, con bajo contenido en co-solventes orgánicos, para reducir el gasto de energía, así como de las perjudiciales consecuencias de la síntesis química.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe la evolución dirigida de la peroxigenasa inespecífica UPO (E.C. 1.11.2.1) de *A. aegerita* (*AaeUPO* de SEQ ID NO: 1), para la obtención de variantes o mutantes que muestren una expresión funcional en forma soluble, activa y altamente estable en un hospedador heterólogo eucariota, preferentemente *S. cerevisiae* o *P. pastoris*, además de mostrar un incremento en la actividad peroxigenasa y un descenso en la actividad peroxidasa, respecto a la enzima UPO *wild-type* o silvestre de *A. aegerita* (SEQ ID NO: 2) expresada en *S. cerevisiae*. Dichas variantes o mutantes, gracias a las características mencionadas, serán idóneas para su uso en, procedimientos de síntesis orgánica, preferentemente en procesos de oxifuncionalización, oxidación o hidroxilación selectiva de hidrocarburos en general, tanto aromáticos como alifáticos, lineales, ramificados y cíclicos, preferentemente el procedimiento de hidroxilación de compuestos aromáticos cíclicos, tanto de compuesto cíclicos simples o condensados, más preferiblemente procedimiento de hidroxilación para la síntesis de 1-naftol y/o de síntesis de 5'-hidroxipropranolol, donde dichos procesos se llevarán a cabo en un único paso, sin requerir la presencia de cofactores, en condiciones suaves, tales como temperatura ambiente, presión atmosférica y en una solución acuosa, con bajo contenido en co-solventes orgánicos, para reducir el gasto de energía, así como de las perjudiciales consecuencias de la síntesis química.

La peroxigenasa UPO1 de *A. aegerita* (*AaeUPO* de SEQ ID NO: 1) se sometió a diferentes ciclos de evolución dirigida en laboratorio que se combinaron con enfoques semi-rationales (es decir, se emplearon métodos de diseño racional, semi-razional y aleatorios) para obtener las diferentes variantes descritas en la presente invención. Por un lado, la peroxigenasa UPO1 de *A. aegerita* (*AaeUPO* de SEQ ID NO: 1) se sometió a cinco ciclos de evolución dirigida dando lugar al mutante que, a partir de aquí y a lo largo de la presente invención denominaremos PaDa-I de SEQ ID NO: 14 y que está codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 13. Dicho mutante PaDa-I comprende las mutaciones L67F, I248V, F311L, V75I y V57A respecto a la *AaeUPO1* silvestre de SEQ ID NO: 2 codificada por la secuencia SEQ ID NO: 1. De la misma manera, la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal nativo de la *AaeUPO1* (SEQ ID NO: 25) también se sometió a ciclos de evolución dirigida y dio lugar a un péptido señal modificado o evolucionado de SEQ ID NO: 27, según se describe en P. Molina-Espeja, E. et al. *Appl. Environ. Microb.* 2014. 80: 3496-3507. De esta manera se obtuvo el mutante PaDa-I que comprendía el

péptido señal evolucionado (SEQ ID NO: 27), cuya secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO: 17 que codifica para el péptido PaDa-I de SEQ ID NO: 18. Dicho mutante PaDa-I según han demostrado los inventores (Molina-Espeja P. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. 80:3496-507) presenta elevada expresión funcional, constantes catalíticas mejoradas, alta termoestabilidad, y mayor resistencia a la presencia de co-solventes orgánicos respecto a la UPO *wild-type* o silvestre expresada en *S. cerevisiae*. La promiscuidad de sustrato de la enzima se conservó realizando un ensayo dual en formato *High-Throughput Screening* (HTS) para explorar tanto actividad oxidativa como de transferencia de oxígeno de las librerías de mutantes, además de incorporar un ensayo para evitar la pérdida de termoestabilidad cinética.

A partir del mutante PaDa-I descrito previamente, se llevaron a cabo dos nuevos ciclos de evolución dirigida en laboratorio que dieron lugar a la variante JaWa de SEQ ID NO: 23, con dos mutaciones añadidas en la secuencia de la proteína SEQ ID NO: 24: G241D y R257K, respecto a la secuencia del mutante PaDa-I. De esta manera se obtiene el mutante JaWa de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 19, que codifican para los péptidos de SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 20, según tengan o no el péptido señal evolucionado o modificado de SEQ ID NO: 28 codificado por la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 27. Por otro lado, estas dos nuevas mutaciones, G241D y R257K, se incorporaron también a la secuencia de la peroxigenasa *AaeUPO1* nativa (SEQ ID NO: 1) mediante mutagénesis dirigida, dando lugar a una variante que denominaremos wt-JaWa de SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 12, codificados respectivamente por las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 11, según presenten o no el péptido señal evolucionado de SEQ ID NO: 28 codificado por la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 27.

A partir del mutante JaWa de SEQ ID NO: 23 codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 24, descrito previamente, se llevaron a cabo otros tres nuevos ciclos de evolución dirigida en laboratorio que dieron lugar a la variante SoLo de SEQ ID NO: 41, con una mutación añadida en la secuencia de la proteína SEQ ID NO: 42: F191S, respecto a la secuencia del mutante JaWa. De esta manera se obtiene el mutante SoLo de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 37, que codifican para los péptidos de SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 38, según tengan o no el péptido señal evolucionado o modificado de SEQ ID NO: 28, codificado por la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 27. Por otro lado, esta nueva mutación, F191S, se incorporó también a la secuencia de la peroxigenasa *AaeUPO1* nativa (SEQ ID NO: 1) mediante mutagénesis dirigida, dando lugar a una variante que denominaremos wt-SoLo de SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 66, codificados respectivamente por las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 65, según presenten o no el péptido señal evolucionado de SEQ ID NO: 28 codificado por la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 27.

Así, las variantes descritas en la presente invención, preferentemente las variantes JaWa y SoLo, presentan todas las características y ventajas mencionadas previamente para el mutante PaDa-I, pero además, muestra un mayor incremento en la termoestabilidad (valores de $T_{50} = 59,7^{\circ}\text{C}$, un incremento en la termoestabilidad de 2°C , respecto a la variante PaDa-I), mayor estabilidad frente a la presencia de co-solventes y valores cinéticos frente a naftaleno de k_{cat}/K_m del orden de 1,56 veces superiores a los descritos para la variante PaDa-I cuando dichos mutantes se expresan en un organismo heterólogo, preferentemente en levaduras, para el caso de la variante JaWa y del orden de 1,47 veces superiores en la k_{cat} para el caso de la variante SoLo. Por tanto, las principales ventajas de las variantes con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, respecto a la *AaeUPO* silvestre, o a otras variantes del estado de la técnica, como por ejemplo, la variante PaDa-I, son:

- i) presentan una alta tasa de producción,
- ii) presentan una elevada actividad,
- iii) presentan una elevada estabilidad,
- iv) presentan un incremento del TTN de 2,5 veces (TTN de aproximadamente 50.000) para el caso de la síntesis de 1-naftol, y de 3 veces en ausencia de antioxidantes (45.000 para el mutante SoLo frente a 15.000 del mutante JaWa) o de 15 veces (3.000 en el caso de la *AaeUPO* silvestre) para la síntesis de 5'-hidroxipropranolol,
- v) presenta un incremento en la k_{cat} para 1-naftol de hasta 1,5 veces, y un aumento en la k_{cat} para 5'-hidroxipropranolol de hasta 3,6 veces,
- vi) presenta un incremento de eficiencia catalítica para naftaleno hasta valores de $6,2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$; y para 5'-hidroxipropranolol de $3,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, dos órdenes de magnitud superiores a los de cualquier enzima descrita
- vii) presentan un descenso de aproximadamente 1,5 veces en el ratio 1,4-naftoquinona:1-naftol, y hasta un 50% menos de oxidación sobre el 5'-hidroxipropranolol.
- viii) presentan una regioselectividad frente a 1-naftol de aproximadamente 97% y de aproximadamente 99% frente a 5'-hidroxipropranolol.

Por tanto, la presente invención proporciona nuevas peroxigenasas que presentan todas las ventajas mencionadas anteriormente respecto a la peroxigenasa nativa o *wild-type*, tales como, expresión funcional en un organismo heterólogo, preferentemente, *S. cerevisiae* o *P. pastoris*, así como respecto a otras variantes o mutantes ya conocidas en el estado de la técnica, como es la variante PaDa-I. Adicionalmente, las variantes descritas en la presente invención, presentan la mayor selectividad y el más alto número de recambio total (TTN, *total turnover*

numbers) para procedimientos de síntesis orgánica, preferentemente en procesos de oxifuncionalización u oxidación selectiva de hidrocarburos en general, tanto aromáticos como alifáticos, lineales, ramificados y cíclicos, preferentemente el procedimiento de hidroxilación de compuestos aromáticos cíclicos, tanto de compuesto cíclicos simples o condensados, más preferiblemente procedimiento de hidroxilación para la síntesis de 1-naftol y/o de síntesis de 5'-hidroxipropanolol, que se conoce para esta superfamilia de enzimas hasta la fecha. Secretadas heterológamente en forma activa, soluble y muy estable, estas variantes llevan a cabo oxigenaciones aromáticas selectivas en ausencia de cofactores NAD(P)H y dominios reductasa. Su actividad mono(per)oxigenasa autosuficiente, junto con su reducida actividad peroxidasa hacen de estas variantes de UPO un valioso biocatalizador para el futuro de aplicaciones en el campo de la síntesis orgánica.

Así, la presente invención se refiere a las secuencias aminoacídicas de dichas variantes peroxigenasas, y a las secuencias nucleotídicas que codifican para dichas variantes peroxigenasas. A continuación se muestra un listado de los polinucleótidos y polipéptidos descritos en la presente invención:

- SEQ ID NO: 1 - Secuencia nucleotídica del gen que codifica para AaeUPO1 sin péptido señal.
- SEQ ID NO: 2 - Secuencia polipeptídica de la AaeUPO1 sin péptido señal.
- SEQ ID NO: 3 - Secuencia nucleotídica del gen que codifica para AaeUPO1 con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 4 - Secuencia polipeptídica de la AaeUPO1 con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 5 - Secuencia nucleotídica del gen que codifica para AaeUPO1 con péptido señal modificado.
- SEQ ID NO: 6 - Secuencia polipeptídica de la AaeUPO1 con péptido señal modificado.
- SEQ ID NO: 7 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante wt-JaWa sin péptido señal.
- SEQ ID NO: 8 - Secuencia polipeptídica de la variante wt-JaWa sin péptido señal.
- SEQ ID NO: 9 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante wt-JaWa con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 10 - Secuencia polipeptídica de la variante wt-JaWa con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 11 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante wt-JaWa con péptido señal modificado.
- SEQ ID NO: 12 - Secuencia polipeptídica de la variante wt-JaWa con péptido señal modificado.
- SEQ ID NO: 13 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante PaDa-I sin péptido señal.
- SEQ ID NO: 14 - Secuencia polipeptídica de la variante PaDa-I sin péptido señal.
- SEQ ID NO: 15 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante PaDa-I con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 16 - Secuencia polipeptídica de la variante PaDa-I con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 17 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante PaDa-I con péptido señal modificado.
- SEQ ID NO: 18 - Secuencia polipeptídica de la variante PaDa-I con péptido señal modificado.
- SEQ ID NO: 19 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante JaWa sin péptido señal.
- SEQ ID NO: 20 - Secuencia polipeptídica de la variante JaWa sin péptido señal.
- SEQ ID NO: 21 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante JaWa con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 22 - Secuencia polipeptídica de la variante JaWa con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 23 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante JaWa con péptido señal modificado.
- SEQ ID NO: 24 - Secuencia polipeptídica de la variante JaWa con péptido señal modificado.
- SEQ ID NO: 25 - Secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal nativo de la AaeUPO1.
- SEQ ID NO: 26 - Secuencia polipeptídica del péptido señal nativo de la AaeUPO1
- SEQ ID NO: 27 - Secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal modificado que comprende las mutaciones F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D respecto a la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal nativo de la AaeUPO1 de SEQ ID NO: 26.
- SEQ ID NO: 28 - Secuencia polipeptídica del péptido señal modificado que comprende las mutaciones F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D respecto a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 26.
- SEQ ID NO: 29 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante W24F obtenida a partir del mutante PaDa-I de SEQ ID NO: 17.
- SEQ ID NO: 30 - Secuencia polipeptídica que codifica para la variante W24F obtenida a partir del mutante PaDa-I de SEQ ID NO: 18.
- SEQ ID NO: 31 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante W24F obtenida a partir del mutante JaWa de SEQ ID NO: 23.
- SEQ ID NO: 32 - Secuencia polipeptídica que codifica para la variante W24F obtenida a partir del mutante JaWa de SEQ ID NO: 24.
- SEQ ID NO: 37 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante SoLo sin péptido señal.
- SEQ ID NO: 38 - Secuencia polipeptídica de la variante SoLo sin péptido señal.
- SEQ ID NO: 39 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante SoLo con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 40 - Secuencia polipeptídica de la variante SoLo con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 41 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante SoLo con péptido señal modificado.
- SEQ ID NO: 42 - Secuencia polipeptídica de la variante SoLo con péptido señal modificado.
- SEQ ID NO: 61 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante wt- SoLo sin péptido señal.
- SEQ ID NO: 62 - Secuencia polipeptídica de la variante wt-SoLo sin péptido señal.

- SEQ ID NO: 63 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante wt- SoLo con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 64 - Secuencia polipeptídica de la variante wt- SoLo con péptido señal *wild-type*.
- SEQ ID NO: 65 - Secuencia nucleotídica que codifica para la variante wt- SoLo con péptido señal modificado.
- SEQ ID NO: 66 - Secuencia polipeptídica de la variante wt- SoLo con péptido señal modificado.

Los autores de la presente invención han utilizado una combinación metodológica basada en la evolución y la mutagénesis dirigida y han obtenido variantes o mutantes de peroxigenasas que resuelven la necesidad de un biocatalizador con elevada actividad y termoestabilidad, una alta tasa de producción funcional, además de presentar un incremento en su actividad peroxigenasa y un descenso en su actividad peroxidasa, respecto a la enzima UPO *wild-type* o silvestre, o incluso respecto a otras variantes UPO tal como la variante PaDa-I.

Las peroxigenasas de la presente invención, preferentemente las variantes denominadas JaWa y SoLo, son altamente estables frente a la temperatura (valores de $T_{50} = 59,7^{\circ}\text{C}/59,5^{\circ}\text{C}$, un incremento en la termoestabilidad de 2°C respecto a la variante PaDa-I), siendo la T_{50} la temperatura a la cual la enzima mantiene el 50% de su actividad inicial tras 10 min de incubación) y frente a la presencia de co-solventes. Dichas peroxigenasas poseen unos valores cinéticos frente a naftaleno de k_{cat}/K_m del orden de 1,56 veces superiores a los descritos para la variante PaDa-I, y del orden de 46 veces superior al descrito para *AaeUPO* silvestre frente al propranolol, expresadas en un organismo heterólogo, preferentemente en levaduras, por lo que su diseño evolutivo ha permitido:

- i) Su expresión heteróloga funcional en levadura (0,2 g/L),
- ii) Incrementar sus constantes y eficiencias catalíticas,
- iii) Incrementar la estabilidad frente a diversos factores (temperatura, co-solventes).

Por tanto, las principales ventajas de las variantes con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, respecto a la UPO silvestre, o a otras variantes del estado de la técnica, como por ejemplo, la variante PaDa-I, tal y como hemos mencionado previamente, son:

- i) presenta una alta tasa de producción,
- ii) presenta una elevada actividad,
- iii) presenta una elevada estabilidad,
- iv) presenta un incremento del TTN de hasta 2,5 veces (TTN de aproximadamente 50.000), para el caso de la síntesis de 1-naftol, y para la síntesis de 5'-hidroxipropranolol de 3 veces en ausencia de antioxidantes (45.000 para el mutante SoLo frente a 15.000 del mutante JaWa) o de 15 veces (3.000 en el caso de la *AaeUPO* silvestre),
- v) presenta un incremento en la k_{cat} para 1-naftol de hasta 1,5 veces, y un aumento en la k_{cat} para 5'-hidroxipropranolol de hasta 3,6 veces,
- vi) presenta un incremento de eficiencia catalítica para naftaleno hasta valores de $6,2 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; y para 5'-hidroxipropranolol de $3,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, dos órdenes de magnitud superiores a los de cualquier enzima descrita,
- vii) presentan un descenso de aproximadamente 1,5 veces en el ratio 1,4-naftoquinona:1-naftol, y hasta un 50% menos de oxidación sobre el 5'-hidroxipropranolol,
- viii) presenta una regioselectividad frente a 1-naftol de aproximadamente 97% y de aproximadamente 99% frente a 5'-hidroxipropranolol.

El término "peroxigenasa" a efectos de la presente invención se refiere a la enzima peroxigenasa inespecífica de acuerdo con EC 1.11.2.1, que cataliza la inserción de un átomo de oxígeno procedente de H_2O_2 u otro peróxido que actúa como fuente de oxígeno, en una amplia variedad de sustratos. A efectos de la presente invención, la peroxigenasa es preferentemente, la peroxigenasa inespecífica (UPO) secretada por el hongo basidiomiceto *A. aegerita* cuya secuencia nucleotídica es SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 1 que codifica para una proteína cuya secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 2, según comprenda el péptido señal o no, respectivamente.

Los términos "donantes de oxígeno", "agente oxidante" y "oxidante" se refieren a una sustancia, molécula o compuesto que dona oxígeno a un sustrato en una reacción de oxidación. Típicamente, el donante de oxígeno se reduce (acepta electrones). Donantes de oxígeno, a modo de ejemplo, que no son limitantes, incluyen oxígeno molecular o dióxígeno (O_2) y peróxidos, incluyendo peróxidos de alquilo tales como hidroperóxido de t-butilo, hidroperóxido de cumeno, ácido peracético, y más preferiblemente peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Un "peróxido" es cualquier compuesto distinto de oxígeno molecular (O_2) que tiene dos átomos de oxígeno unidos uno a otro.

A efectos de la presente invención, el término "mutante" o "variante", utilizados indistintamente a lo largo de la presente invención y referidos a las peroxigenasas UPO de la invención obtenidas mediante los métodos descritos en el presente documento y que tienen al menos dos mutaciones, preferentemente al menos tres mutaciones, más preferentemente presenta al menos cuatro mutaciones, más preferentemente al menos cinco mutaciones, más

preferentemente al menos seis mutaciones, más preferentemente al menos siete mutaciones, más preferentemente al menos ocho mutaciones, más preferentemente al menos nueve mutaciones, más preferentemente al menos diez mutaciones, más preferentemente al menos once mutaciones y más preferentemente al menos doce mutaciones, que resultan en una mayor actividad peroxigenasa y una menor actividad oxigenasa, además de todas las ventajas mencionadas anteriormente, que la que presenta la correspondiente enzima UPO nativa o de tipo salvaje (*wild-type*) o cualquier otra variante UPO, preferentemente la variante PaDa-I, expresada en un hospedador heterólogo, preferentemente en las levaduras del género *Saccharomyces* sp. y *Pichia* sp. y más preferentemente en las especies *S. cerevisiae* y *P. pastoris*.

A efectos de la presente invención, el término "cofactor", se refiere a cualquier sustancia que es necesaria o beneficiosa para la actividad de una enzima. Un "coenzima" significa un cofactor que interactúa directamente con y sirve para promover una reacción catalizada por una enzima. Muchas coenzimas también sirven como portadores. Por ejemplo, NAD⁺ y NADP⁺ llevan átomos de hidrógeno de una enzima a otra (en forma de NADH y NADPH, respectivamente). Una "proteína auxiliar" significa cualquier sustancia proteica que sea necesaria o beneficiosa para la actividad de una enzima.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad peroxigenasa, en adelante polinucleótido de la invención, que se caracteriza por que la secuencia aminoacídica del polipéptido que codifica presenta una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO: 2 (*AaeUPO1*), y por que comprende al menos dos alteraciones aminoacídicas en las posiciones homólogas a las posiciones 241 y 257 de dicha secuencia, que sustituyen los aminoácidos: glicina (G) original por ácido aspártico (D) en la posición 241 (G241D) y arginina (R) original por lisina (K) en la posición 257 (R257K).

En una realización preferida del polinucleótido de la invención, éste se caracteriza por que la secuencia aminoacídica del polipéptido que codifica presenta una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO: 2 (*AaeUPO1*), y comprende además una alteración aminoacídica en la posición homóloga a la posición 191 de dicha secuencia SEQ ID NO: 2, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por serina (S) (F191S).

En otra realización preferida del polinucleótido de la invención, éste se caracteriza por que la secuencia aminoacídica del polipéptido que codifica presenta una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO: 2 (*AaeUPO1*), y comprende las alteraciones aminoacídicas en las posiciones homólogas a las posiciones 241, 257 y 191 de dicha secuencia, que sustituyen los aminoácidos: glicina (G) original por ácido aspártico (D) en la posición 241 (G241D), arginina (R) original por lisina (K) en la posición 257 (R257K) y fenilalanina (F) original por serina (S) (F191S).

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 peroxigenasas con características idénticas a las descritas para la peroxigenasa de la invención. Por tanto, el polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la peroxigenasa *AaeUPO1* 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), o
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético.

El término "condiciones astringentes" o "condiciones astringentes de hibridación" hace referencia a condiciones en las cuales una sonda híbrida con su secuencia blanco a un nivel superior que la de otras secuencias (es decir, al menos 2 veces superior al fondo). Las condiciones astringentes son dependientes de la naturaleza de la secuencia y pueden variar en función de las circunstancias. Controlando las condiciones de astringencia y de lavado, secuencias blanco con 100% de homología a la sonda pueden ser identificadas. Alternativamente, las condiciones de astringencia pueden ser ajustadas para permitir ciertos apareamientos no homólogos en las secuencias de manera a que niveles de homología inferior puedan ser detectados. Generalmente una sonda tiene menos de 1000 nucleótidos de longitud y opcionalmente menos de 500 nucleótidos. Un experto medio en la materia conoce extensamente las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos.

Los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de secuencias aminoacídicas descritos en la invención corresponden a variantes obtenidas mediante evolución dirigida de la peroxigenasa *AaeUPO1* (E.C. 1.11.2.1). Dicha proteína, *AaeUPO1*, se corresponde a la secuencia de nucleótidos, o polinucleótidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 1, que constituyen la secuencia codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 2, según comprenda el péptido señal o no, respectivamente.

El término "polinucleótido", tal y como se emplea en la descripción, se refiere a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos.

El término "identidad" o "porcentaje de identidad" entre dos secuencias (ácidos nucleicos o proteínas), se entiende que se designa un porcentaje de nucleótidos o de restos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se comparan, obtenido después del mejor alineamiento, siendo dicho porcentaje puramente estadístico y estando repartidas las diferencias entre las dos secuencias al azar y a lo largo de toda su longitud. Por "mejor alineamiento" o "alineamiento óptimo" se entiende que se designa el alineamiento por el cual el porcentaje de identidad determinado como se describe a continuación es el más elevado. Las comparaciones entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos tradicionalmente se llevan a cabo: comparando estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, llevándose a cabo dicha comparación por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de estas secuencias para la comparación se puede realizar, en particular con ayuda de uno de los siguientes algoritmos: el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970), el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988), los programas informáticos que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLASTP, BLASTN, BLASTX, TBLASTX, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, (*Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI*), o los servidores de internet en particular los del *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL (<http://www.embl.org>) y el proyecto Ensembl (<http://www.ensembl.org>)). Con el fin de obtener el alineamiento óptimo, se usa preferiblemente el programa BLAST, con la matriz BLOSUM 62. También se pueden usar las matrices PAM o PAM250, así como una matriz de identidad para las secuencias de nucleótidos.

En un aspecto preferido de la invención, las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas aquí descritas comprenden al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 88% de identidad, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% o un 100% de identidad sobre una secuencia de referencia, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada según se mide usando los algoritmos arriba descritos.

El término "homología" o "porcentaje de homología" (porcentaje de homología, identidad+similitud) se determina usando un software de comparación de homologías, tal como BLASP, TBLASTN o tBLASTX, del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI: *National Center of Biotechnology Information*), utilizando los parámetros específicos. A efectos de la presente invención, el término "homología" u "homólogos" se refiere a la identidad de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o a la identidad de dos o más secuencias de aminoácidos. Secuencias homólogas incluyen secuencias "parálogas" y "ortólogas". El término "parálogo" se refiere a duplicaciones de genes dentro del genoma de una especie, dando lugar a genes parálogos. El término "ortólogo" se relaciona con genes homólogos en diferentes organismos debido a la relación ancestral.

En un aspecto preferido, los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de la presente invención tienen por lo menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94% al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100%, incrementada la actividad peroxigenasa del polinucleótido que codifica para el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 18.

En un aspecto preferido, los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de la presente invención tienen por lo menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94% al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100%, disminuida la actividad peroxidasa del polinucleótido que codifica para el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 18.

El término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutación, y puede resultar en polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

El término "codifica", tal y como se emplea en la descripción, hace referencia a la correlación que existe entre los tripletes de nucleótidos o codones en una secuencia de ADN y los aminoácidos que forman los péptidos, las secuencias aminoacídicas o las proteínas. Cuando se dice que una secuencia nucleotídica codifica para un péptido, significa que cuando dicha secuencia nucleotídica sea transcrita a ARN mensajero (ARNm) y este ARNm sea traducido, se generará dicho péptido.

A efectos de la presente invención, el término "secuencia codificante" o secuencia "que codifica" para un polipéptido, proteína o enzima es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia codificante está "bajo el control" de secuencias de control de transcripción y traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante en ARNm, que luego es transcrito y traducido en la proteína codificada por la secuencia codificante. Preferiblemente, la secuencia codificante es una secuencia de ADN de doble cadena que se transcribe y traduce en un polipéptido en una célula *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de traducción en el extremo 3' (carboxilo) terminal. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limitan a, secuencias procarióticas, ADN, ADNc, sintético, o secuencia de nucleótidos recombinante. Si la secuencia codificante está destinada para expresión en una célula eucariota, una secuencia de terminación de la transcripción y señal de poliadenilación generalmente estará situada 3' a la secuencia codificante.

El término "ADNc" se define aquí como una molécula de ADN que puede ser preparada por transcripción inversa a partir de una madura, empalmada, molécula de ARNm obtenido a partir de una célula eucariota. ADNc carece de secuencias de intrones que normalmente están presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN inicial primaria es un precursor de ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes de aparecer como ARNm empalmados maduros. Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias de intrón por un proceso llamado empalme. ADNc derivado de ARNm carece de, por lo tanto, cualquier secuencia de intrón.

El término "gen", se refiere a una secuencia de ADN que codifica o corresponde a una secuencia particular de aminoácidos que comprenden la totalidad o parte de una o más proteínas o enzimas, y puede o no incluir secuencias de ADN regulatorio, tales como secuencias promotoras, que determinan por ejemplo las condiciones en que se expresa el gen. Algunos genes, que no son genes estructurales, pueden ser transcritos de ADN a ARN, pero no se traducen en una secuencia de aminoácidos. Otros genes pueden funcionar como reguladores de los genes estructurales o como reguladores de la transcripción del ADN. Un gen que codifica una proteína de la invención para su uso en un sistema de expresión, si el ADN es genómico o ADNc, se pueden aislar de cualquier fuente, particularmente a partir de un ADNc fúngico o una biblioteca genómica. Los métodos para obtener los genes son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, Sambrook et al (supra).

Así en un objeto preferido de la invención, el polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, según se describe en la presente invención, dicho polipéptido codificado comprende las sustituciones de los aminoácidos: glicina (G) en la posición 241 y arginina (R) en la posición 257, de la SEQ ID NO: 2, por los aminoácidos: ácido aspártico (D) y lisina (K), respectivamente, dando lugar a las mutaciones G241D y R257K en dicha secuencia. En una realización preferida de la invención, el polinucleótido aquí descrito comprende además de las mutaciones G241D y R257K, una alteración aminoacídica adicional en la posición homóloga a la posición 191 de dicha secuencia SEQ ID NO: 2, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por serina (S), dando lugar a la mutación (F191S).

En otra una realización particular del polinucleótido de la invención, éste puede comprender además de las dos mutaciones mencionadas anteriormente, comunes a todos los mutantes UPO obtenidos en la presente invención, o alternativamente las tres mutaciones descritas anteriormente, al menos una de las siguientes mutaciones, ya sea de forma aislada o en combinaciones de las mismas:

- a) la sustitución del aminoácido leucina (L) original por el aminoácido fenilalanina (F) en la posición homóloga a la posición 67 de la SEQ ID NO: 2 (L67F),
- b) la sustitución del aminoácido isoleucina (I) original por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 248 de la SEQ ID NO: 2 (I248V),
- c) la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) original por el aminoácido leucina (L) en la posición homóloga a la posición 311 de la SEQ ID NO: 2 (F311L),
- d) la sustitución del aminoácido valina (V) original por el aminoácido isoleucina (I) en la posición homóloga a la posición 75 de la SEQ ID NO: 2 (V75I), y
- e) la sustitución del aminoácido valina (V) original por el aminoácido alanina (A) en la posición homóloga a la posición 57 de la SEQ ID NO: 2 (V57A).

En otra realización particular del polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, respecto a una enzima UPO *wild-type* o silvestre de SEQ ID NO: 2, o respecto a una variante con actividad UPO, tal como por ejemplo, la variante PaDa-I de SEQ ID NO: 14, según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado se caracteriza por que puede comprender además la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal de SEQ ID NO: 26.

En otra realización particular del polinucleótido de la invención, que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, según se describe en este documento, dicho

polipéptido codificado se caracteriza por que la secuencia polinucleotídica que codifica para el péptido señal de SEQ ID NO: 26, posee además al menos una de las siguientes mutaciones adicionales, o cualesquiera de sus combinaciones:

- 5 a) la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) por el aminoácido tirosina (Y) en la posición homóloga a la posición 12 de SEQ ID NO: 26 (F[12]Y),
- b) la sustitución del aminoácido alanina (A) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 14 de SEQ ID NO: 26 (A[14]V),
- c) la sustitución del aminoácido arginina (R) por el aminoácido glicina (G) en la posición homóloga a la posición 15 de SEQ ID NO: 26 (R[15]G), y
- 10 d) la sustitución del aminoácido alanina (A) por el aminoácido ácido aspártico (D) en la posición homóloga a la posición 21 de SEQ ID NO: 26 (A[21]D).

15 Todas estas mutaciones y combinaciones de las mismas, dan lugar a mutantes o variantes de las peroxigenasas con un amplio espectro de aplicaciones biotecnológicas, específicamente con una alta expresión funcional, una alta actividad monooxigenasa en detrimento de la actividad peroxidasa, alta termoestabilidad y mayor resistencia a la presencia de co-solventes orgánicos, mantenimiento en la regioselectividad frente a 1-naftol, descenso en el ratio 1,4-naftoquinona:1-naftol, un incremento de eficiencia catalítica para naftaleno; además mejora la regioselectividad frente a 5'-hidroxipropranolol hasta un 99%, descendiendo hasta un 50% la oxidación de 5'-hidroxipropranolol, y con un incremento en la eficiencia catalítica para propranolol en dos órdenes de magnitud para diferentes aplicaciones, respecto a la UPO *wild-type*, o respecto a otras variantes UPO, tal como la variante PaDa-I.

25 En una realización preferida de la invención, el polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado presenta las alteraciones aminoacídicas G241D y R257K, respecto a la SEQ ID NO: 2. En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO: 9 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 10, o con la SEQ ID NO: 7 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 8 (variantes UPO wt-JaWa, con y sin péptido señal, respectivamente).

30 En otra realización preferida de la invención, el polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K y adicionalmente F191S, respecto a la SEQ ID NO: 2. En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO: 63 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 64, o con la SEQ ID NO: 61 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 62 (variantes UPO wt-SoLo, con y sin péptido señal, respectivamente).

35 En otra realización preferida de la invención, el polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado presenta las alteraciones aminoacídicas G241D y R257K, respecto a la SEQ ID NO: 2, o las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K y F191S, respecto a la SEQ ID NO: 2, y además comprende las alteraciones aminoacídicas F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D, en el péptido señal de SEQ ID NO: 26. En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se selecciona de la lista que consiste en: la SEQ ID NO: 11 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 12 (variante UPO mutante wt-JaWa con péptido señal modificado) y la SEQ ID NO: 65 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 66 (variante UPO mutante wt-SoLo con péptido señal modificado).

40 Así, en otra realización preferida de la invención, el polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K, L67F, I248V, F311L, V57A y V75I, respecto a la SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida de la invención, el polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K, F191S, L67F, I248V, F311L, V57A y V75I, respecto a la SEQ ID NO: 2. En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO: 21 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 22, o con la SEQ ID NO: 19 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 20 (variantes JaWa, con y sin péptido señal, respectivamente). En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO: 39 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 40, o con la SEQ ID NO: 37 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 38 (variantes SoLo, con y sin péptido señal, respectivamente).

60 En otra realización preferida de la invención, el polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K, L67F, I248V, F311L, V57A y V75I, respecto a la SEQ ID NO: 2, y además comprende las alteraciones aminoacídicas F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D en el péptido señal de SEQ

ID NO: 26. En otra realización preferida de la invención, el polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K, F191S, L67F, I248V, F311L, V57A y V75I, respecto a la SEQ ID NO: 2, y además comprende las alteraciones aminoacídicas F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D en el péptido señal de SEQ ID NO: 26. En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO: 23 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 24 (variante JaWa con péptido señal modificado). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO: 41 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 42 (variante SoLo con péptido señal modificado).

Considerando que las peroxigenasas 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: 4 o SEQ ID NO: 2 (peroxigenasa AaeUPO1, con y sin péptido señal, respectivamente), o de la secuencia aminoacídica correspondiente a la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 14 (variante peroxigenasa PaDa-I, con y sin péptido señal modificado, respectivamente), sea de un 70% o mayor. La correspondencia entre la secuencia aminoacídica de la(s) peroxigenasa(s) artificiales objetos de la invención y la secuencia de otras peroxigenasas se pueden determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquellas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia aminoacídica de la peroxigenasa putativa y la secuencia aminoacídica correspondiente a la SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 20 de esta memoria (variante peroxigenasa JaWa, con y sin péptido señal modificado, respectivamente) o a la SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 38 (variante peroxigenasa SoLo, con y sin péptido señal modificado, respectivamente).

Con la información suministrada en la presente invención, un experto en la materia es capaz de combinar las mutaciones anteriormente descritas para generar nuevas variantes de peroxigenasas con mejorada actividad peroxigenasa y disminuida actividad peroxidasa, estabilidad mejorada, así como el resto de características funcionales mencionadas en la presente memoria.

Otro de los objetos descrito en la presente invención se refiere a una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido con actividad peroxigenasa, que se caracteriza por que la secuencia aminoacídica del polipéptido que codifica presenta una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO: 14 (PaDa-I), y por que comprende al menos dos alteraciones aminoacídicas en las posiciones homólogas a las posiciones 241 y 257 de dicha secuencia, que sustituyen los aminoácidos: glicina (G) original por ácido aspártico (D) en la posición 241 (G241D) y arginina (R) original por lisina (K) en la posición 257 (R257K). En una realización preferida, la secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido según se describe aquí, comprende además una alteración aminoacídica adicional en la posición homóloga a la posición 191 de dicha secuencia SEQ ID NO: 14, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por serina (S) en la posición 191 (F191S).

Alternativamente, otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere a una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido con actividad peroxigenasa, que se caracteriza por que la secuencia aminoacídica del polipéptido que codifica presenta una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO: 14 (PaDa-I), y que comprende los aminoácidos alanina (A), fenilalanina (F), isoleucina (I), valina (V) y leucina (L) en las posiciones 57, 67, 75, 248 y 31 respectivamente, con respecto a la SEQ ID NO: 14, caracterizado por que comprende además al menos dos alteraciones aminoacídicas en las posiciones homólogas a las posiciones 241 y 257 de dicha secuencia, que sustituyen los aminoácidos: glicina (G) original por ácido aspártico (D) en la posición 241 (G241D) y arginina (R) original por lisina (K) en la posición 257 (R257K) y opcionalmente, también puede comprender una alteración aminoacídica adicional en la posición 191 de dicha secuencia SEQ ID NO: 14, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por serina (S) (F191S).

En una realización particular del polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, respecto a una variante con actividad UPO de SEQ ID NO: 14, según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado se caracteriza por que puede comprender además la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal de SEQ ID NO: 26.

En otra realización particular del polinucleótido de la invención, que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado se caracteriza por que la secuencia polinucleotídica que codifica para el péptido señal de SEQ ID NO: 26, posee además al menos una de las siguientes mutaciones adicionales, o cualesquiera de sus combinaciones:

- la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) por el aminoácido tirosina (Y) en la posición homóloga a la posición 12 de SEQ ID NO: 26 (F[12]Y),
- la sustitución del aminoácido alanina (A) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 14 de SEQ ID NO: 26 (A[14]V),
- la sustitución del aminoácido arginina (R) por el aminoácido glicina (G) en la posición homóloga a la posición 15 de SEQ ID NO: 26 (R[15]G), y

- d) la sustitución del aminoácido alanina (A) por el aminoácido ácido aspártico (D) en la posición homóloga a la posición 21 de SEQ ID NO: 26 (A[21]D).

5 Todas estas mutaciones y combinaciones de las mismas, dan lugar a mutantes o variantes de las peroxigenasas con un amplio espectro de aplicaciones biotecnológicas, específicamente con una alta expresión funcional, una alta actividad monooxigenasa en detrimento de la actividad peroxidasa, alta termoestabilidad y mayor resistencia a la presencia de co-solventes orgánicos, mantenimiento en la regioselectividad frente a 1-naftol, descenso en el ratio 1,4-naftoquinona:1-naftol, un incremento de eficiencia catalítica para naftaleno, descendiendo la oxidación hasta un 50% sobre el 5'-hidroxipropranolol, un incremento de eficiencia catalítica en dos órdenes de magnitud, para diferentes aplicaciones, respecto a la variante PaDa-I de SEQ ID NO: 18.

15 En una realización preferida de la invención, el polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado presenta las alteraciones aminoacídicas G241D y R257K, respecto a la SEQ ID NO: 14. En otra realización preferida de la invención, el polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con las características y ventajas mencionadas aquí, dicho polipéptido codificado presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K y F191S, respecto a la SEQ ID NO: 14. En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO: 21 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 22, o con la SEQ ID NO: 19 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 20 (variante UPO JaWa, con y sin péptido señal, respectivamente). En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO: 39 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 40, o con la SEQ ID NO: 37 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 38 (variante UPO SoLo, con y sin péptido señal, respectivamente).

25 En otra realización preferida de la invención, el polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado presenta las alteraciones aminoacídicas G241D y R257K, respecto a la SEQ ID NO: 14, y además comprende las alteraciones aminoacídicas F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D, en el péptido señal de SEQ ID NO: 26. En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO: 23 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 24 (variante UPO JaWa con péptido señal modificado).

35 En otra realización preferida de la invención, el polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, según se describe en este documento, dicho polipéptido codificado presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K y F191S, respecto a la SEQ ID NO: 14, y además comprende las alteraciones aminoacídicas F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D, en el péptido señal de SEQ ID NO: 26. En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO: 41 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 42 (variante UPO SoLo con péptido señal modificado).

40 Al igual que se ha mencionado anteriormente, con la información suministrada en la presente invención, un experto en la materia es capaz de combinar las mutaciones anteriormente descritas para generar nuevas variantes de peroxigenasas con mejorada actividad peroxigenasa y disminuida actividad peroxidasa, estabilidad mejorada, así como el resto de características funcionales mencionadas en la presente memoria.

45 Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a la secuencia aminoacídica codificada por el polinucleótido de la invención, de ahora en adelante polipéptido de la invención, caracterizado por que su secuencia presenta una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO: 2 (AaeUPO1, sin péptido señal), y porque comprende al menos dos alteraciones aminoacídicas, preferentemente sustituciones, en las posiciones homólogas a las posiciones 241 y 257 de dicha secuencia, que sustituyen los aminoácidos: glicina (G) original por ácido aspártico (D) en la posición 241 (G241D) y arginina (R) original por lisina (K) en la posición 257 (R257K).

55 En una realización preferida, el polipéptido de la invención, comprende además una alteración aminoacídica adicional, preferentemente una sustitución, en la posición homóloga a la posición 191 de la SEQ ID NO: 2, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por serina (S) en la posición 191 (F191S).

El término "péptido", "polipéptido" o "proteína", tal y como se emplea en la descripción, se refiere a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud.

60 Así, en un aspecto preferido de la invención, las sustituciones de los aminoácidos: glicina (G) en la posición 241 y arginina (R) en la posición 257 de la SEQ ID NO: 2, por los aminoácidos ácido aspártico (D) y lisina (K), respectivamente, da lugar a las mutaciones G241D y R257K, respectivamente, obteniéndose la variante wt-JaWa de SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto preferido de la invención, la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) en la posición 191 de la SEQ ID NO: 2, por el aminoácido serina (S), da lugar a la mutación F191S, obteniéndose la variante wt-SoLo de SEQ ID NO: 62.

5 El polipéptido de la invención también puede presentar mutaciones adicionales a las mencionadas anteriormente que mejoran su actividad, estabilidad, tanto térmica como en presencia de diferentes co-solventes y su expresión funcional en organismos heterólogos. Adicionalmente, las variantes con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, muestran un incremento de TTN de aproximadamente 2,5 veces, un aumento en la k_{cat} para 1-naftol hasta en 1,5 veces, un incremento de eficiencia catalítica para naftaleno hasta valores de $6,2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$, un descenso de aproximadamente 1,5 veces en el ratio 1,4-naftoquinona : 1-naftol, y una regioselectividad frente a 1-naftol de aproximadamente 97%, además de un incremento del TTN para la síntesis de 5'-hidroxipropranolol de 3 veces en ausencia de antioxidantes (45000 para el mutante SoLo frente a 15000 del mutante JaWa) o de 15 veces (3000 en el caso de la AaeUPO silvestre), un incremento en la k_{cat} para 5'-hidroxipropranolol de hasta 3,6 veces, un incremento de eficiencia catalítica para 5'-hidroxipropranolol de hasta $3,1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$, dos órdenes de magnitud superiores a los de cualquier enzima descrita y presentan hasta un 50% menos de oxidación sobre el 5'-hidroxipropranolol. Estas mutaciones descritas anteriormente en esta invención pueden presentarse en diversas combinaciones conjuntamente con las mutaciones descritas anteriormente como es conocido para un experto en la materia.

20 En un aspecto preferido, los polipéptidos de la presente invención tienen por lo menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94% al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100%, incrementada la actividad peroxigenasa respecto a la actividad peroxigenasa del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 18.

25 En un aspecto preferido, los polipéptidos de la presente invención tienen por lo menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94% al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100%, disminuida la actividad peroxidasa respecto a la actividad peroxidasa del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 18.

35 En una realización particular del polipéptido de la invención, éste puede comprender, además de las dos mutaciones mencionadas anteriormente, comunes a todos los mutantes UPO obtenidos y descritos en la presente invención, una mutación adicional que comprende la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) original por el aminoácido serina (S) en la posición homóloga a la posición 191 de la SEQ ID NO: 2 (F191S).

En una realización particular del polipéptido de la invención, éste puede comprender, además de las mutaciones mencionadas anteriormente, al menos una de las siguientes mutaciones, ya sea de forma aislada, o en combinaciones de las mismas:

- 40 a) la sustitución del aminoácido leucina (L) original por el aminoácido fenilalanina (F) en la posición homóloga a la posición 2 de la SEQ ID NO: 2 (L67F),
 b) la sustitución del aminoácido isoleucina (I) original por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 248 de la SEQ ID NO: 2 (I248V),
 45 c) la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) original por el aminoácido leucina (L) en la posición homóloga a la posición 311 de la SEQ ID NO: 2 (F311L),
 d) la sustitución del aminoácido valina (V) original por el aminoácido isoleucina (I) en la posición homóloga a la posición 75 de la SEQ ID NO: 2 (V75I) y
 e) la sustitución del aminoácido valina (V) original por el aminoácido alanina (A) en la posición homóloga a la posición 57 de la SEQ ID NO: 2 (V57A).

50 En otra realización preferida del polipéptido de la invención, éste se caracteriza por que puede comprender además la secuencia que codifica para el péptido señal de SEQ ID NO: 26.

55 En otra realización preferida del polipéptido de la invención, éste se caracteriza por que posee además al menos una de las siguientes mutaciones adicionales o cualesquiera de sus combinaciones en la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal de SEQ ID NO: 26:

- a) la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) por el aminoácido tirosina (Y) en la posición homóloga a la posición 12 de SEQ ID NO: 26 (F[12]Y)
 b) la sustitución del aminoácido alanina (A) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 14 de SEQ ID NO: 26 (A[14]V),
 60 c) la sustitución del aminoácido arginina (R) por el aminoácido glicina (G) en la posición homóloga a la posición 15 de SEQ ID NO: 26 (R[15]G), y
 d) la sustitución del aminoácido alanina (A) por el aminoácido ácido aspártico (D) en la posición homóloga a la posición 21 de SEQ ID NO: 26 (A[21]D).

Todas estas mutaciones dan lugar a mutantes o variantes de las peroxigenasas con un amplio espectro de aplicaciones biotecnológicas, específicamente con una alta expresión funcional, una alta actividad monooxigenasa y una baja actividad peroxidasa, alta termoestabilidad, mayor resistencia a la presencia de co-solventes orgánicos, mayor regioselectividad, y un incremento del TTN, para diferentes aplicaciones, respecto a la UPO *wild-type*, o respecto a otros mutantes UPO, como por ejemplo el mutante PaDa-I.

Así en una realización preferida de la invención, el polipéptido presenta las alteraciones aminoacídicas G241D y R257K respecto a la SEQ ID NO: 2. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con el péptido de SEQ ID NO: 10 o de SEQ ID NO: 8 (variante wt-JaWa, con y sin péptido señal, respectivamente).

Así en una realización preferida de la invención, el polipéptido presenta la alteración aminoacídica F191S respecto a la SEQ ID NO: 2. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con el péptido de SEQ ID NO: 64 o de SEQ ID NO: 62 (variante wt-SoLo, con y sin péptido señal, respectivamente).

En otra realización preferida de la invención, el polipéptido presenta las alteraciones aminoacídicas G241D y R257K respecto a la SEQ ID NO: 2, y además comprende las alteraciones aminoacídicas F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D, en el péptido señal de SEQ ID NO: 26. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con el péptido de SEQ ID NO: 12 (variante wt-JaWa, con péptido señal modificado, respectivamente). En otra realización preferida de la invención, el polipéptido presenta la alteración aminoacídica F191S respecto a la SEQ ID NO: 2, y además comprende las alteraciones aminoacídicas F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D, en el péptido señal de SEQ ID NO: 26. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con el péptido de SEQ ID NO: 66 (variante wt-SoLo, con péptido señal modificado, respectivamente).

Así, en otra realización preferida de la invención, el polipéptido de la invención presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K, L67F, I248V, F311L, V57A y V75I, respecto a la SEQ ID NO: 2. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con el péptido de SEQ ID NO: 22 o de SEQ ID NO: 20 (variante JaWa, con y sin péptido señal, respectivamente).

Así, en otra realización preferida de la invención, el polipéptido de la invención presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K, F191S, L67F, I248V, F311L, V57A y V75I, respecto a la SEQ ID NO: 2. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con el péptido de SEQ ID NO: 40 o de SEQ ID NO: 38 (variante SoLo, con y sin péptido señal, respectivamente).

En otra realización preferida de la invención, el polipéptido presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K, L67F, I248V, F311L, V57A y V75I, respecto a la SEQ ID NO: 2, y además comprende las alteraciones aminoacídicas F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D, en el péptido señal de SEQ ID NO: 26. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con el péptido de SEQ ID NO: 24 (variante JaWa, con péptido señal modificado).

En otra realización preferida de la invención, el polipéptido presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K, F191S, L67F, I248V, F311L, V57A y V75I, respecto a la SEQ ID NO: 2, y además comprende las alteraciones aminoacídicas F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D, en el péptido señal de SEQ ID NO: 26. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con el péptido de SEQ ID NO: 42 (variante SoLo, con péptido señal modificado).

Con la información suministrada en la presente invención, un experto en la materia es capaz de combinar las mutaciones anteriormente descritas para generar nuevas variantes de peroxigenasas con mejorada actividad peroxigenasa y disminuida actividad peroxidasa y mayor estabilidad, además de comprender las características funcionales mencionadas a lo largo de la presente memoria.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a la secuencia aminoacídica codificada por el polinucleótido de la invención, caracterizado por que su secuencia presenta una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO: 14 (PaDa-I, sin péptido señal), y por que comprende al menos dos alteraciones aminoacídicas, preferentemente sustituciones, en las posiciones homólogas a las posiciones 241 y 257 de dicha secuencia, que sustituyen los aminoácidos: glicina (G) original por ácido aspártico (D) en la posición 241 (G241D) y arginina (R) original por lisina (K) en la posición 257 (R257K). En una realización preferida, la secuencia aminoacídica codificada por el polinucleótido de la invención comprende además, una alteración aminoacídica adicional, preferentemente una sustitución, en la posición homóloga a la posición 191 de dicha secuencia SEQ ID NO: 14, que sustituye al aminoácido fenilalanina (F) original por serina (S) en la posición 191 (F191S).

Alternativamente, la presente invención también se refiere a la secuencia aminoacídica codificada por el polinucleótido de la invención, caracterizado por que su secuencia presenta una identidad de al menos un 70%

con la SEQ ID NO: 14 (PaDa-I), y que comprende los aminoácidos alanina (A), fenilalanina (F), isoleucina (I), valina (V) y leucina (L) en las posiciones 57, 67, 75, 248 y 31 respectivamente, con respecto a la SEQ ID NO: 14, caracterizado por que comprende además al menos dos alteraciones aminoacídicas en las posiciones homólogas a las posiciones 241 y 257 de dicha secuencia, que sustituyen los aminoácidos: glicina (G) original por ácido aspártico (D) en la posición 241 (G241D) y arginina (R) original por lisina (K) en la posición 257 (R257K). De manera alternativa también, la secuencia aminoacídica codificada por el polinucleótido de la invención caracterizado por que su secuencia presenta una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO: 14 (PaDa-I), y que comprende los aminoácidos alanina (A), fenilalanina (F), isoleucina (I), valina (V) y leucina (L) en las posiciones 57, 67, 75, 248 y 31 respectivamente, con respecto a la SEQ ID NO: 14, caracterizado por que comprende además al menos tres alteraciones aminoacídicas en las posiciones homólogas a las posiciones 241, 257 y 191 de dicha secuencia, que sustituyen los aminoácidos: glicina (G) original por ácido aspártico (D) en la posición 241 (G241D), arginina (R) original por lisina (K) en la posición 257 (R257K) y fenilalanina (F) original por serina (S) en la posición 191 (F191S).

Así, en un aspecto preferido de la invención, las sustituciones de los aminoácidos: glicina (G) en la posición 241 y arginina (R) en la posición 257 de la SEQ ID NO: 14, por los aminoácidos ácido aspártico (D) y lisina (K), respectivamente, da lugar a las mutaciones G241D y R257K, respectivamente, obteniéndose la variante JaWa de SEQ ID NO: 20.

En otro aspecto preferido de la invención, las sustituciones de los aminoácidos: glicina (G) en la posición 241, arginina (R) en la posición 257 y fenilalanina (F) en la posición 191 de la SEQ ID NO: 14, por los aminoácidos ácido aspártico (D), lisina (K) y serina (S), respectivamente, da lugar a las mutaciones G241D, R257K y F191S, respectivamente, obteniéndose la variante SoLo de SEQ ID NO: 38.

En otra realización preferida del polipéptido de la invención, éste se caracteriza por que puede comprender además la secuencia que codifica para el péptido señal de SEQ ID NO: 26.

En otra realización preferida del polipéptido de la invención, éste se caracteriza por que posee además al menos una de las siguientes mutaciones adicionales o cualesquiera de sus combinaciones en la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal de SEQ ID NO: 26:

- a) la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) por el aminoácido tirosina (Y) en la posición homóloga a la posición 12 de SEQ ID NO: 26 (F[12]Y),
- b) la sustitución del aminoácido alanina (A) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 14 de SEQ ID NO: 26 (A[14]V),
- c) la sustitución del aminoácido arginina (R) por el aminoácido glicina (G) en la posición homóloga a la posición 15 de SEQ ID NO: 26 (R[15]G), y
- d) la sustitución del aminoácido alanina (A) por el aminoácido ácido aspártico (D) en la posición homóloga a la posición 21 de SEQ ID NO: 26 (A[21]D).

Como se ha mencionado previamente, todas estas mutaciones dan lugar a mutantes o variantes de las peroxigenasas con un amplio espectro de aplicaciones biotecnológicas, específicamente con una alta expresión funcional, una alta actividad monooxigenasa y una baja actividad peroxidasa, alta termoestabilidad, mayor resistencia a la presencia de co-solventes orgánicos, mayor regioselectividad, y un incremento del TTN, para diferentes aplicaciones, respecto a la variante PaDa-I.

Así, en una realización preferida de la invención, el polipéptido presenta las alteraciones aminoacídicas G241D y R257K respecto a la SEQ ID NO: 14. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con el péptido de SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 20 (variante JaWa, con y sin péptido señal, respectivamente).

En otra realización preferida de la invención, el polipéptido presenta las alteraciones aminoacídicas G241D, R257K y F191S respecto a la SEQ ID NO: 14. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con el péptido de SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 38 (variante Solo, con y sin péptido señal, respectivamente).

En otra realización preferida de la invención, el polipéptido presenta las alteraciones aminoacídicas G241D y R257K respecto a la SEQ ID NO: 14, alternativamente también presenta la alteración F191S, y además, comprende las alteraciones aminoacídicas F[12]Y, A[14]V, R[15]G y A[21]D, en el péptido señal de SEQ ID NO: 26. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con el péptido de SEQ ID NO: 24 o con el péptido de SEQ ID NO: 42 (variantes JaWa o SoLo, con péptido señal modificado, respectivamente).

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso del polipéptido de la invención en procedimientos de síntesis orgánica, preferentemente en procesos de oxifuncionalización u oxidación selectiva de hidrocarburos en general, tanto aromáticos, como alifáticos lineales, ramificados y cíclicos (alcanos como propano, 2,3-dimetilbutano

o ciclohexano, ácidos grasos como el ácido láurico), cadenas hidrocarbonadas insaturadas lineales, ramificadas y cíclicas (olefinas como propeno, 2-metil-2-buteno o limoneno), más preferentemente en la producción de 1-naftol para aplicaciones en industria textil (tintes), agroquímica (herbicidas, pesticidas) o en biorremediación, más preferentemente en la producción de HDMs, y más preferentemente aún en la producción de 5'-hidroxipropranolol. También para aplicaciones cosméticas y/o alimentarias, síntesis de metabolitos para fármacos o composiciones farmacéuticas, otros procesos de biorremediación, preferentemente, transformación de PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos) recalcitrantes en derivados menos contaminantes, diseño de biosensores, preferentemente, inmunoensayos de detección mediante quimioluminiscencia y en la elaboración de dispositivos bioelectrónicos que contienen enzimas inmovilizadas. Adicionalmente, los polipéptidos descritos en la presente invención pueden transformar cualquier compuesto que sea sustrato de la AaeUPO, como por ejemplo: puede O- y N- dealquilar compuestos como el tetrahidrofurano o la lidocaína, respectivamente; compuestos heterocíclicos que presentan átomos de azufre o nitrógeno en su estructura, donde dichos compuestos pueden ser S- o N-oxigenados, como sucede con el dibenzotiofeno o la piridina, respectivamente.

El polinucleótido de la invención puede encontrarse aislado como tal o formando parte de construcciones génicas o de vectores que permiten la propagación de dichos polinucleótidos en células hospedadoras adecuadas. Tales vectores de expresión génica incluyen secuencias de control, tales como, por ejemplo, elementos de control de la traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión). Los vectores conforme a la invención pueden incluir plásmidos bacterianos y vectores virales, y otros vectores de acuerdo con los procedimientos bien conocidos y documentados en el estado de la técnica, y pueden expresarse en una variedad de sistemas de expresión diferentes, así mismo bien conocidos y documentados. Se conoce, además, una variedad de técnicas que pueden utilizarse para introducir tales vectores en células procarióticas o eucarióticas (células hospedadoras) para su expresión. Técnicas adecuadas de transformación o transfección son bien conocidas por el experto en la materia y están descritas en el estado de la técnica. 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.

El término "construcción de ácido nucleico" tal como se utiliza aquí se refiere a una molécula de ácido nucleico -de cadena sencilla o doble- que se aísla de un gen de origen natural o que es modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no lo haría de otro modo existir en la naturaleza o que es sintética. El término "construcción de ácido nucleico" es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

Los términos "vector" o "vector de expresión" se refieren al vehículo mediante el cual una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen heterólogo) se pueden introducir en una célula huésped, con el fin de transformar el anfitrión y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores comprenden típicamente el ADN de un agente transmisible, en el que el ADN extraño que codifica una proteína se inserta por la tecnología de enzima de restricción. Un tipo común de vector es un "plásmido", que generalmente es una molécula de ADN de doble cadena, que puede aceptar fácilmente ADN adicional (extraño) y que puede ser introducido fácilmente en una célula huésped adecuada. Un gran número de vectores, incluyendo vectores plasmídicos y fúngicos, se han descrito para la replicación y/o expresión en una variedad de huéspedes eucariotas y procariotas. Ejemplos no limitantes incluyen plásmidos pKK (Clonetech), plásmidos pUC, plásmidos pET (Novagen, Inc., Madison, WI), plásmidos pRSET o PrEP (Invitrogen, San Diego, CA), plásmidos pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA), pGAPZαA, pcWori+, pET-26b (+), pXTD14, pYEX-S1, pMAL, y pET22-b (+), o el plásmido utilizado en la presente invención, pJRoC30, donado por la Dra. Frances Arnold, del Instituto de Tecnología de California (CALTECH, USA). Los vectores de clonación recombinantes a menudo incluyen uno o más sistemas de replicación para la clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión. Los vectores adecuados para la inserción de dicho polinucleótido son vectores derivados de los vectores de expresión en procariotas 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 dos micras de *S. 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. Otros vectores se pueden emplear como se desee por un experto en la técnica. La experimentación de rutina en la biotecnología se puede utilizar para determinar qué vectores son los más adecuados para utilizarse con la invención, si es diferente a como se describe en los Ejemplos. En general, la elección del vector depende del tamaño de la secuencia de polinucleótidos y la célula huésped para ser empleado en los métodos de esta invención.

El término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes necesarios para la expresión de secuencias codificadoras de los polipéptidos de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o nativa o extranjera entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada de la traducción y la transcripción. Las secuencias de control pueden ser provistas de enlaces con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligadura de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de un gen (dirección 3') aguas abajo de la secuencia de codificación. Para los fines de la definición de esta invención, la secuencia promotora está limitada en su extremo 3' por el sitio de iniciación de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo.

La expresión "unidos de forma operativa" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control "unida de forma operativa" a una secuencia codificadora está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consiga en condiciones compatibles con las secuencias de control.

En una realización preferida, la construcción genética de la invención además comprende un polinucleótido que codifica para un péptido señal mejorado por evolución dirigida que favorece la expresión funcional del polipéptido de la invención.

El término "péptido señal", tal y como se emplea en la descripción, se refiere a un péptido que se localiza en el extremo amino de un polipéptido o proteína, y cuya función es dirigir la localización de la proteína a distintos compartimentos de la célula (núcleo, mitocondria, cloroplasto, retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi (AG), etc.) o al espacio extracelular, en el caso de que la proteína sea secretada.

El péptido señal del factor α es un polipéptido de 83 aminoácidos. Los 19 primeros aminoácidos constituyen el prelíder que dirige el polipéptido en creación hacia el RE. Tras entrar en el RE, el prelíder es escindido por una peptidasa, dejando una pro-proteína. En este punto, las N-glicosilaciones de tres residuos de asparagina facilitan el tránsito de la pro-proteína del RE al AG. En el AG, el prolíder puede actuar como chaperona hasta que es procesado por las proteasas KEX1, KEX2 y STE13 (Romanos et al., 1992. *Yeast* 8, 423-488; Shuster, 1991. *Curr. Opin. Biotech.* 2, 685-690). Además, el prolíder parece estar implicado en un proceso de señalado vacuolar, que es perjudicial para la secreción heteróloga (Rakestraw et al. *Biotechnol. Bioeng.* 2009. 103, 1192-1201).

Preferiblemente, el péptido señal es el propio de la AaeUPO1 de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 25 que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 26. En una realización más preferida, el péptido señal comprende al menos una de las siguientes mutaciones o cualesquiera de sus combinaciones:

- a) la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) original por el aminoácido tirosina (Y) en la posición homóloga a la posición 12 de SEQ ID NO: 26 (F[12]Y),
- b) la sustitución del aminoácido alanina (A) original por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 14 de SEQ ID NO: 26 (A[14]V),
- c) la sustitución del aminoácido arginina (R) original por el aminoácido glicina (G) en la posición homóloga a la posición 15 de SEQ ID NO: 26 (R[15]G), y
- d) la sustitución del aminoácido alanina (A) original por el aminoácido ácido aspártico (D) en la posición homóloga a la posición 21 de SEQ ID NO: 26 (A[21]D).

En otra realización más preferida aún, el péptido señal de la invención se corresponde con la secuencia peptídica SEQ ID NO: 28, codificada por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 27. Dicho péptido señal favorece la expresión funcional del polipéptido de la invención.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a una célula hospedadora caracterizada por que comprende el polinucleótido de la invención y es capaz de producir el polipéptido de la invención según se describe a lo largo del presente documento.

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.

5 Una célula hospedadora de la presente invención incluye células procariotas y eucariotas. Las procariotas incluyen organismos gram negativos (por ejemplo, *Escherichia coli*) o gram positivos (por ejemplo, bacterias del género *Bacillus sp.*). 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.

10 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) poliaminoácida(s) de la presente invención son *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus oryzae*, *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.

25 La levadura de cerveza *S. cerevisiae* es un hongo unicelular que pertenece al Superreino *Eukaryota*, (grupo Metazoa/Fungi), Reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Saccharomycotina*, Clase *Saccharomycetes*, Orden *Saccharomycetales*, Familia *Saccharomycetaceae* y Género *Saccharomyces*.

30 La levadura metilotrófica *P. pastoris* pertenece al Superreino *Eukaryota*, (grupo Metazoa/Fungi), Reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Saccharomycotina*, Clase *Saccharomycetes*, Orden *Saccharomycetales*, Familia *Saccharomycetaceae* y Género *Komagataella*.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere al método de obtención del polipéptido de la invención que comprende las siguientes etapas:

- a) Introducir el vector de la invención según se ha descrito previamente en una célula hospedadora adecuada (célula hospedadora de la invención),
- b) Cultivar la célula hospedadora de la invención en un medio adecuado, y,
- c) Purificar el polipéptido de la invención con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, respecto a las mismas actividades de una enzima *AaeUPO wild-type*, o de una variante con actividad UPO como por ejemplo, la variante PaDa-I.

45 Los términos "purificar", "aislar", "aislamiento" o "purificación" de los polipéptidos o enzimas descritos en la presente invención, se refieren a la separación de los péptidos de la invención y alternativamente, a su concentración, a partir del medio de cultivo de la célula de la invención. Los métodos para la separación y purificación de polipéptidos son bien conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, técnicas de solubilidad diferencial, cromatografía, electroforesis o isoelectroenfoque. Para algunos propósitos, es preferible producir el polipéptido en un sistema recombinante en el que la proteína contiene una etiqueta de secuencia adicional que facilita la purificación, tal como, pero no limitado a, una secuencia de polihistidina. Las técnicas de cromatografía pueden estar basadas en el peso molecular, la carga o la afinidad de la proteína y puede realizarse en columna, en papel o en placa. La separación de la proteína puede realizarse, por ejemplo, por cromatografía líquida rápida (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*), en un sistema automatizado que reduce notablemente el tiempo de purificación e incrementa el rendimiento de la purificación.

55 Otro aspecto de la invención se refiere a un cultivo de células hospedadoras de la invención.

Un cultivo de células hospedadoras se refiere al proceso de mantener y crecer las células hospedadoras. Los cultivos celulares necesitan condiciones controladas de 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.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de la célula hospedadora de la invención, o del cultivo de células hospedadoras de la invención, para la obtención del polipéptido de la invención. Preferentemente, la célula

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 peroxigenasas, como es el caso de los polipéptidos de la invención, son conocidas por su gran número de aplicaciones como pueden ser, por ejemplo, su empleo en síntesis orgánica, preferentemente en procesos de oxifuncionalización, oxidación o hidroxilación selectiva de hidrocarburos en general, tanto aromáticos como alifáticos, lineales, ramificados y cíclicos, preferentemente el procedimiento de hidroxilación de compuestos aromáticos cíclicos, tanto de compuesto cíclicos simples o condensados, más preferiblemente procedimiento de hidroxilación para la síntesis de 1-naftol y/o de síntesis de 5'-hidroxipropranolol, derivados de limoneno para aplicaciones cosméticas y/o alimentarias, síntesis de metabolitos de fármacos o composiciones farmacéuticas, síntesis de 1-naftol para tintes, herbicidas o pesticidas, biorremediación (transformación de PAHs recalcitrantes) y diseño de biosensores (inmunoensayos de detección mediante quimioluminiscencia). 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.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del polinucleótido de la invención, o de los vectores, o construcciones genéticas de la invención, o de la célula hospedadora de la invención, o de los cultivos de la invención, para la obtención de enzimas con actividad peroxigenasa incrementada y actividad peroxidasa disminuida, que presentan una alta tasa de producción, una elevada regioselectividad, preferentemente frente a 1-naftol y/o frente a propranolol, y una elevada termoestabilidad respecto a la peroxigenasa *AaeUPO1 wild-type* o nativa expresada en la levadura, o respecto a variantes UPO, tal como por ejemplo, la variante PaDa-I.

Así, otro objeto de la invención se refiere al uso del polipéptido de la invención en la elaboración de kits de diagnóstico/pronóstico con fines biomédicos para la detección de metabolitos y medición de su concentración en, por ejemplo, muestras de 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 electrónicos que contienen enzimas inmovilizadas para, por ejemplo, el diagnóstico biomédico mediante la detección de metabolitos y 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 electrónicos que contienen enzimas inmovilizadas, específicamente los polipéptidos descritos en la presente invención, también forman parte de la invención.

Así otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un kit o a un dispositivo electrónico que comprende al menos un polipéptido según se describe en la presente invención.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a procedimientos de síntesis orgánica, preferentemente en procesos de oxifuncionalización, oxidación o hidroxilación selectiva de hidrocarburos en general, tanto aromáticos como alifáticos, lineales, ramificados y cíclicos, preferentemente el procedimiento de hidroxilación de compuestos aromáticos cíclicos, tanto de compuesto cíclicos simples o condensados, más preferiblemente procedimiento de hidroxilación para la síntesis de 1-naftol y/o de síntesis de 5'-hidroxipropranolol, mediante el uso de las variantes, de la célula hospedadora, del kit, o del dispositivo de la 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 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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Evolución dirigida de *AaeUPO1*. De los ciclos 1 al 5, la enzima se mejoró hacia expresión funcional y actividad (las mutaciones acumuladas se detallan como rectángulos de tono gris claro). Se parte del parental *AaeUPO* y se somete a 5 ciclos de evolución dirigida hasta obtener el mutante PaDa-I, sobre el que se efectuaron dos ciclos más de evolución dirigida, en este caso para mejorar la capacidad de producción de 1-naftol (las nuevas mutaciones aparecen como rectángulos en negro), y tres ciclos más agrupados en una única generación para mejorar la producción de 5'-hidroxipropranolol. Las actividades (en %) proceden de medidas con microcultivos de *S. cerevisiae* en microplacas de 96 pocillos del segundo *re-screening*. La termoestabilidad (T_{50}) se determinó usando sobrenadantes de cultivos producidos en matraz. n.m. no medible. n.d. no determinado.

Figura 2. Características bioquímicas de las variantes de la invención. A) Características espectroscópicas en estado de reposo de los mutantes PaDa-I (línea fina) y JaWa (línea gruesa). AU, unidades arbitrarias. **B)** Análisis de la termoestabilidad (T_{50}) de los mutantes PaDa-I (círculos negros) y JaWa (círculos blancos). Los experimentos

se hicieron con sobrenadantes de cultivos y cada punto representa el valor promedio y la desviación estándar de 3 experimentos individuales. **C)** Estabilidad de los mutantes PaDa-I (barras negras) y JaWa (barras grises) a altas concentraciones de acetonitrilo. Las estabildades se determinaron tras 5 h de incubación de la enzima en concentraciones crecientes del co-solvente (del 50 al 100%) a 20°C en buffer fosfato potásico pH 7,0 10 mM. Tras ese tiempo, se tomaron alícuotas que fueron analizadas con ABTS como sustrato (buffer fosfato sódico/citrato pH 4,0 100 mM, H₂O₂ 2 mM y ABTS 0,3 mM). Las barras de error indican desviaciones estándar.

Figura 3. Transformación del naftaleno mediante las variantes descritas en la invención. A) Productos formados tras 15 min de reacción parada con 20 µL de HCl 37% (PaDa-I, barras negras; JaWa, barras grises). Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente empleando 6,6 nM de enzima pura, buffer fosfato potásico pH 7,0 100 mM, naftaleno 1 mM, acetonitrilo 20% y H₂O₂ 1 mM (1 mL de volumen final). Como se observa en la figura los productos obtenidos fueron principalmente naftaleno, 1-naftol y 2-naftol. **B)** Cromatogramas de la reacción de transformación del naftaleno tras 270 min. (1: naftaleno; 2: 1-naftol; 3: 2-naftol y 4: 1,4-naftoquinona (1,4-NQ)). **C) y D)** Seguimiento de la reacción a lo largo de 270 min (sin añadir HCl) para los mutantes PaDa-I (C) y JaWa (D). Círculos negros: naftaleno; círculos blancos: 1,2-óxido de naftaleno; cuadrados blancos: 1-naftol y cuadrados negros: 2-naftol. Los números de recambio total (TTN, *total turnover numbers*, expresados como µmoles de producto/µmoles de enzima) se calcularon con el dato de la producción de 1-naftol tras 270 min.

Figura 4. Conversión de naftaleno a 1-naftol mediante las variantes PaDa-I y JaWa. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente y su composición fue: 40 nM de enzima pura, buffer fosfato potásico pH 7,0 100 mM, naftaleno 1 mM, acetonitrilo 20% y H₂O₂ 1 mM (1 mL de volumen final). 1-N: 1-naftol; 1,4-NQ: 1,4-naftoquinona. Cada reacción se hizo por triplicado y se pararon con HCl (pH<1) a distintos tiempos (entre 60 y 600 s). *Inset:* productos colorimétricos poliméricos derivados de la 1,4-naftoquinona, 1: PaDa-I y 2: JaWa.

Figura 5. Variantes W24F obtenidas mediante mutagénesis dirigida. A) Modelo realizado sobre la estructura del cristal de la enzima AaeUPO1 (número de acceso PDB: 2YOR), que comprende las mutaciones de la variante JaWa además de la modificación W24F respecto de la AaeUPO1 silvestre. El modelo se muestra sin superficie, con superficie transparente y con superficie opaca, mostrando la posición W24. **B)** Actividad de las variantes W24F con diferentes sustratos respecto la actividad de sus parentales respectivos, relativizado a la actividad de PaDa-I. Los experimentos se llevaron a cabo con sobrenadantes de cultivos crecidos en matraces de 100 mL. El buffer empleado fue fosfato potásico pH 7,0 100 mM, excepto para el ABTS, que se utilizó fosfato sódico/citrato pH 4,0 100 mM. Los componentes de la mezcla fueron: naftaleno 0,5 mM, NBD 1 mM, DMP 3 mM y ABTS 0,3 mM. En todos los casos, H₂O₂ 1 mM y acetonitrilo 15% se añadieron a las mezclas. Para la actividad con naftaleno se aplicó el método con Fast Red (tras 10 min de reacción se añadió Fast Red -concentración final 0,5 mM- y cuando el color rojo apareció y se estabilizó, se midió la absorbancia final). Los coeficientes de extinción molar son: naftaleno+Fast Red, $\epsilon_{510}=4.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; NBD, $\epsilon_{425}=9.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; DMP, $\epsilon_{469}=27.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y ABTS, $\epsilon_{418}=36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Figura 6. Mutaciones en las variantes UPO descritas en la invención. Modelo realizado sobre la estructura del cristal de AaeUPO1 (número de acceso PDB: 2YOR). **A)** PaDa-I; **B)** JaWa. La mutación V248 procede de la ruta de evolución previa. Los residuos de fenilalanina (Phe) son los responsables de la acomodación de los sustratos en el bolsillo catalítico, el residuo de Cys36 es el ligando axial del hemo; la R189, es un componente del par ácido-base que está implicado en la catálisis, y el Fe³⁺ del hemo está representado como una esfera.

Figura 7. Modelo proteico de A) PaDa-I y B) JaWa. El modelo proteico para PaDa-I (A) se realizó partiendo de la estructura del cristal de AaeUPO1 (número de acceso PDB: 2YOR) y el software PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC. Las nuevas mutaciones del mutante PaDa-I respecto a la UPO nativa se muestran subrayadas, mientras que los residuos subrayados con zigzag son los que han sido cambiados en JaWa (B). En la imagen se distinguen las 5 Phe que median en la acomodación del sustrato, Phe 69, Phe 76, Phe 121, Phe 191 y Phe 199; los dos residuos catalíticos son R189 y E196.

Figura 8. Factores B para las UPOs evolucionadas de la presente invención. Representación de los factores B (obtenidos con PyMOL Molecular Graphics System, Versión 1.3 Schrödinger, LLC.) de la variante PaDa-I (izquierda) y la variante JaWa (derecha). Dichos factores B hacen referencia a la rigidez/flexibilidad de una región proteica o de un aminoácido. **A)** Detalle de la mutación en la posición 257, localizada en la superficie: tonos más oscuros indican una mayor rigidez. **B)** Representación en modo "masilla" de la estructura completa de las variantes PaDa-I y JaWa. A mayor grosor de las líneas, mayor flexibilidad.

Figura 9. Ensayo de la 4-AAP (4 aminoantipirina) con diferentes variantes UPO puras (AaeUPO1, PaDa-I y JaWa). Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente y su composición fue: 0,2 µM de cada variante UPO pura, buffer fosfato potásico pH 7,0 50 mM, propranolol 5 mM, H₂O₂ 2 mM (0,05 mL de volumen final) y en caso de reacciones con ácido ascórbico, este se añadió a una concentración de 4 mM. Cada reacción se hizo por triplicado.

Figura 10. Acoplamiento molecular con JaWa y propranolol. Se destacan aminoácidos que interactúan con el propranolol, indicando las distancias respecto al mismo. En gris oscuro se señala la zona seleccionada para los experimentos de MORPHING por su cercanía a los puntos de contacto proteína-sustrato.

Figura 11. Mutaciones en las variantes SoLo respecto a la variante JaWa descritas en la invención. Modelo realizado sobre la estructura del cristal de PaDa-I. **A)** JaWa; **B)** SoLo.

Figura 12. Análisis de la termoestabilidad (T₅₀) de los mutantes JaWa (círculos negros) y SoLo (círculos blancos). Los experimentos se hicieron con sobrenadantes de cultivos y cada punto representa el valor promedio y la desviación estándar de 3 experimentos individuales.

Figura 13. Cromatograma con las reacciones enzimáticas. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente y su composición fue: 0,03 μM de cada variante UPO pura, buffer fosfato potásico pH 7,0 50 mM, propranolol 4 mM, H_2O_2 2 mM (0,5 mL de volumen final).

Figura 14. Turnover rates (tasas de recambio) de AaeUPO, JaWa y SoLo. La mezcla de reacción contenía 0,03 μM de cada variante UPO pura, 5'-hidroxipropranolol 0,4 mM, y H_2O_2 2 mM en buffer fosfato potásico pH 7,0 50 mM (0,3 mL de volumen final). Se puede observar la desaparición del producto 5'-hidroxipropranolol debido a la formación de su correspondiente quinona mediante la actividad peroxidasa de la enzima.

Figura 15. Cálculo del total turnover number (TTN) de AaeUPO y SoLo. El ensayo se llevó a cabo con 0,03 μM de cada enzima pura, propranolol 4 mM, y H_2O_2 2 mM en buffer fosfato potásico pH 7,0 50 mM y de la misma manera pero además con ácido ascórbico 4 mM. En ambos casos se añadía H_2O_2 2 mM cada 10 min, monitorizando la reacción en cada punto de adición tomando distintas alícuotas.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención. Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1. Obtención y caracterización de las variantes de la presente invención

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y enzimas

ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), DMP (2,6-dimetoxifenol), alcohol bencílico, 1-naftol, 2-naftol, 1,4-naftoquinona, Fast Red (*Fast Red TR Salt hemi(zinc chloride) salt*), Taq DNA polimerasa y el kit de transformación de *Saccharomyces cerevisiae*, se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EEUU). NBD (5-nitro-1,3-benzodioxol) se adquirió a TCI América (Portland, OR, EEUU), mientras que el naftaleno procede de Acros Organics (Geel, Belgium).

El cDNA de *upo1* (clon C1A-2) de *A. aegerita* fue proporcionado por el Dr. Martin Hofrichter (Pecyna, M.J., et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 84: 885-897).

Las células competentes de *Escherichia coli* XL2-Blue y el kit Genemorph II Random Mutagenesis (Mutazima II) se obtuvieron de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU) y la DNA polimerasa de alta fidelidad iProof fue adquirida a Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU). Las enzimas de restricción BamHI y XhoI se obtuvieron de New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU) y la cepa deficiente en proteasas de *S. cerevisiae* BJ5465, de LGCPromochem (Barcelona, Spain). Los kits Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep y Zymoclean Gel DNA Recovery son comercializados por Zymo Research (Orange, CA, EEUU). El kit NucleoSpin Plasmid kit procede de Macherey-Nagel (Düren, Alemania) y los oligonucleótidos empleados fueron sintetizados por Isogen Life Science (Barcelona, Spain). Todos los compuestos químicos son de la mayor pureza disponible en el mercado.

Evolución dirigida

El mutante PaDa-I (SEQ ID NO: 18) que comprende el péptido señal mutado de SEQ ID NO: 28, se obtuvo como se describe en P. Molina-Espeja, E. et al. *Appl. Environ. Microb.* 2014. 80: 3496-3507. Tras cada ciclo de evolución, los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa semipreparativo y se purificaron mediante el kit Zymoclean Gel DNA Recovery. Los fragmentos de DNA recuperados se clonaron en el plásmido pJRoC30 bajo el control del promotor GAL1 linealizado con BamHI y XhoI (con lo que también se elimina el gen parental o predecesor). El plásmido linealizado se cargó en un gel de agarosa preparativo de bajo punto de fusión y se purificó usando el kit Zymoclean Gel DNA Recovery.

Primera generación (1G)

Para la obtención de las variantes descritas en la presente invención se llevó a cabo una reacción de PCR con tendencia a error en un volumen final de 50 μL . Esta reacción contenía 3% dimetil sulfóxido (DMSO), 0,37 μM RMLN (SEQ ID NO: 33 5'-cctctactttaacgtcaagg-3'), 0,37 μM RMLC (SEQ ID NO: 34 5'-gggagggcgatgtaagc-3'), 0,8 mM desoxinucleótido trifosfatos (dNTPs, 0,2 mM de cada uno), 0,05 U/ μL Mutazima II (Genemorph II kit, Stratagene) y 2.822 ng del molde (plásmido pJRoC30 (procede de Tecnología de California (CALTECH, USA), que comprende la secuencia nucleotídica del mutante PaDa-I de SEQ ID NO:17, 300 ng del DNA diana). Esta reacción de PCR mutagénica se realizó en un termociclador de gradiente (Mycycler, Bio-Rad, EEUU) determinando los siguientes parámetros: 95°C 2 min (1 ciclo); 94°C 45 s, 53°C 45 s, y 74°C 3 min (28 ciclos); y 74°C 10 min (1 ciclo). Se mezclaron 200 ng del producto de PCR con 100 ng del plásmido linealizado y se transformaron células competentes de *S. cerevisiae* de manera que se produjera *in vivo shuffling* del DNA y clonaje (empleando para ello el kit de transformación de levadura). Se plaqueó el volumen resultante de la transformación en placas de medio mínimo sólido (para placas SC *drop-out*, dicho medio mínimo sólido consta de 100 mL de *yeast nitrogen base* (Sigma) al 6,7%, 100 mL de complemento de aminoácidos sin uracilo a 19,2 g/L, 100 mL de glucosa al 20%, 20 g

bacto agar, 700 mL de agua destilada y 1 mL de cloranfenicol a 25 g/L) y se incubaron durante 3 días a 30°C. Las colonias individuales que se formaron fueron seleccionadas y sometidas al ensayo de *High-Throughput Screening* colorimétrico dual (HTS), para explorar librerías de mutantes eficientemente sin alterar la estabilidad enzimática de los mismos, además de a varios *re-screenings*, como se describe más abajo.

Segunda generación (2G)

Con los mejores mutantes obtenidos en la primera generación se realizó StEP mutagénico (*Staggered Extension Process*) (H. Zhao, et al. *Nat Biotech.* 1998. 16, 258-261; Garcia-Ruiz et al. *Biochem. J.* 2012. 441, 487-498) combinado con *in vivo shuffling*. Las condiciones de la PCR del StEP fueron: 3% DMSO, 90 nM RMLN (SEQ ID NO: 33 5'-cctctatactttaacgtcaagg-3'), 90 nM RMLC (SEQ ID NO: 34 5'-gggagggcgtgaatgtaagc-3'), 0,3 mM dNTPs (0,075 mM de cada uno), 0,05 U/μL Taq DNA polimerasa y 16 ng de los moldes (pJR0C30 con los cuatro mejores mutantes de la primera generación). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador de gradiente usando los siguientes parámetros: 95°C 5 min (1 ciclo); 94°C 30 s, 55°C 20 s (90 ciclos). Se mezclaron 200 ng de los productos de PCR con 100 ng del plásmido linealizado y se transformó en células competentes de *S. cerevisiae*. El resto del procedimiento se siguió como se ha explicado previamente para la obtención de la primera generación. En este ciclo de evolución se obtuvo una nueva variante, JaWa, en la cual dos nuevas mutaciones tuvieron lugar: G241D y R257K, respecto a cualquiera de las enzimas AaeUPO1 o PaDa-I.

Variantes W24F

Se realizaron dos reacciones de PCR de alta fidelidad individuales para cada variante PaDa-I (PaDa-I de SEQ ID NO: 18, codificado por la SEQ ID NO: 17) y JaWa (SEQ ID NO: 24, codificado por la SEQ ID NO: 23), empleando como molde las secuencias nucleotídicas que codifican para ambas y así introducir el cambio requerido en su secuencia. Comenzando la numeración del gen *upo1* de SEQ ID NO: 1 desde el inicio de la proteína madura de SEQ ID NO: 2, los dos cambios nucleotídicos llevados a cabo fueron G71T y G72T (cambio de codón: TGG -W- a TTT -F). Para estas PCRs se diseñaron dos cebadores en los que se incluyeron los cambios mencionados. Dichos cebadores fueron el cebador F24FOR de secuencia SEQ ID NO: 35 (F24FOR: 5'-ctcaccatttaagccgcttcgacctggcgatattcgtggac-3') y el cebador F24REV de secuencia SEQ ID NO: 36 (5'-gtccacgaatatcgccaggtcgaagcggcttaaatgggtgag-3'). Los cambios introducidos en dichos cebadores para llevar a cabo la mutagénesis aparecen subrayados en la secuencia nucleotídica de los mismos.

Las condiciones de estas PCRs mutagénicas fueron: (i) en un volumen final de 50 μL, 3% DMSO, 0,5 μM RMLN (SEQ ID NO: 33), 0,5 μM F24REV de SEQ ID NO: 36, 1 mM dNTPs (0,25 mM de cada uno), 0,02 U/μL de DNA polimerasa de alta fidelidad iProof y 10 ng de los moldes; o (ii) en un volumen final de 50 μL, 3% DMSO, 0,5 μM F24FOR de SEQ ID NO: 35, 0,5 μM RMLC de SEQ ID NO: 34, 1 mM dNTPs (0,25 de cada uno), 0,02 U/μL de DNA polimerasa de alta fidelidad iProof y 10 ng de los moldes. Los parámetros empleados fueron: (i) 98°C 30 s (1 ciclo), 98°C 10 s, 47°C 25 s, 72°C 15 s (28 ciclos), y 72°C 10 min (1 ciclo); o (ii) 98°C 30 s (1 ciclo), 98°C 10 s, 58°C 25 s, 72°C 45 s (35 ciclos), y 72°C 10 min (1 ciclo). Se mezclaron 200 ng de los dos productos de PCR correspondientes a su respectivo molde con 100 ng del plásmido linealizado y se transformaron en *S. cerevisiae* para que se llevara a cabo el ensamblamiento *in vivo* de los genes y el clonaje mediante la técnica *In Vivo Overlap Extension* (IVOE) (M. Alcalde. *Methods Mol. Biol.* 2010. 634, 3-14).

Preparación de las librerías de mutantes

Se seleccionaron colonias individuales correspondientes a clones y se inocularon en placas de 96 pocillos estériles (Greiner Bio-One GmbH, Alemania), de ahora en adelante placas madre, con 200 μL/pocillo de medio mínimo de expresión (100 mL de *yeast nitrogen base* al 6,7%, 100 mL de complemento de aminoácidos sin uracilo a 19,2 g/L, 67 mL de buffer fosfato potásico pH 6,0 1 M, 111 mL de galactosa al 20%, 22 mL de MgSO₄ a 0,1 M, 31,6 mL de etanol absoluto, 1 mL de cloranfenicol a 25 g/L y ddH₂O hasta 1.000 mL). La columna 6 de cada columna se inoculó con el correspondiente parental y el pocillo H1, con *S. cerevisiae* sin transformar. Las placas se sellaron para evitar la evaporación y se incubaron a 30°C, 220 RPM y 80% de humedad relativa (en un Minitron, INFORS, Suiza) durante 5 días.

High-Throughput Screening (HTS) colorimétrico dual

Las placas madre se centrifugaron (Eppendorf 5810R centrifuge, Alemania) durante 10 min a 3.500 RPM y 4°C. Se transfirieron 20 μL de sobrenadante de estas placas madre a dos placas réplica hijas con la ayuda de un robot manipulador de líquidos Freedom EVO (Tecan, Suiza). Se añadieron 180 μL de mezcla de reacción con 2,6 dimetoxifenol (DMP) o naftaleno a las placas hijas utilizando un robot pipeteador (Multidrop Combi Reagent Dispenser, Thermo Scientific, EEUU).

La mezcla de reacción con DMP estaba compuesta por buffer fosfato potásico pH 7,0 100 mM, DMP 3 mM y H₂O₂ 1 mM. De manera simultánea se llevó a cabo este mismo ensayo de *screening* pero añadiendo 10% de acetonitrilo a la mezcla de reacción para poder determinar cambios en la actividad causados por la aparición de resistencia a este co-solvente orgánico (presente en la mezcla de reacción del *screening* con naftaleno, necesario para que permanezca disuelto). La mezcla de reacción con naftaleno contenía buffer fosfato potásico pH 7,0 100 mM, naftaleno 0,5 mM, acetonitrilo 10% y H₂O₂ 1 mM. Las placas se agitaron brevemente y se midió la absorbancia

inicial a 469 nm y 510 nm, respectivamente, empleando para ello un lector de placas (SPECTRAMax Plus 384, Molecular Devices, EEUU). Tras un tiempo de reacción de 10 min se añadieron 20 μL de Fast Red (Fast Red TR *Salt hemi(zinc chloride) salt*) a cada pocillo del *screening* con naftaleno (de manera que su concentración final en cada pocillo fuera 0,5 mM). Las placas permanecieron a temperatura ambiente hasta que se desarrolló color naranja (DMP) o rojo (naftol-Fast Red), momento en el cual se midió nuevamente la absorbancia. Los valores se normalizaron frente al parental de cada placa. Para descartar falsos positivos, se llevaron a cabo dos *re-screenings*, además de un tercer *re-screening* en el cual se determinó la estabilidad cinética (T_{50}) (P. Molina-Espeja, et al. *Appl. Environ. Microb.* 2014. 80: 3496-3507). El compuesto Fast Red se acopla de manera específica al 1-naftol para formar un colorante tipo azo de color rojo que puede ser medido a 510 nm ($\epsilon_{510} = 4.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), longitud de onda a la cual la interferencia en la medida que produce el medio de cultivo es mínima.

Primer *re-screening*

Se seleccionaron los mejores clones del *screening* (~50 clones), de los cuales se tomaron alícuotas de 5 μL y se transfirieron a placas estériles con 200 μL de medio mínimo de expresión por pocillo. Las columnas 1 y 12 más las filas A y H no se inocularon, con el objetivo de evitar evaporación y así la aparición de falsos positivos. Se incubaron durante 5 días a 30°C y 220 RPM. El parental fue tratado de la misma manera (fila D, pocillos 7-11). Las placas fueron tratadas siguiendo el protocolo que en el *screening* descrito anteriormente.

Segundo *re-screening*

Una alícuota con los ~10 mejores clones del primer *re-screening* fue inoculada en 3 mL de medio de cultivo YPD (10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 100 mL de glucosa al 20%, 1 mL de cloranfenicol a 25 g/L y $d\text{dH}_2\text{O}$ hasta 1.000 mL) a 30°C y 220 RPM durante 24 h. Los plásmidos de esos cultivos se extrajeron con el kit Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep. Debido a la impureza y a la baja concentración del DNA extraído, los plásmidos fueron transformados en células supercompetentes de *E. coli* XL2-Blue y plaqueadas en placas LB-amp (el medio Luria-Bertani se compone de 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 10 g de NaCl, 100 mg de ampicilina y $d\text{dH}_2\text{O}$ hasta 1.000 mL). Se seleccionó una colonia individual de cada clon, se inoculó en 5 mL de LB y se creció durante 16 h a 37°C y a 250 RPM. Los plásmidos fueron extraídos mediante el kit NucleoSpin Plasmid y transformados en células competentes de *S. cerevisiae* (así como con el parental). Cinco colonias individuales de cada clon se seleccionaron e inocularon para someterlas al mismo protocolo de *screening* descrito anteriormente.

Tercer *re-screening*. Ensayo de termoestabilidad

Se seleccionó una colonia individual de *S. cerevisiae* con el clon correspondiente (crecido en placa de medio mínimo SC *drop-out*: 100 mL de *yeast nitrogen base* al 6,7%, 100 mL de complemento de aminoácidos sin uracilo a 19,2 g/L, 100 mL de glucosa al 20%, 1 mL de cloranfenicol a 25 g/L y $d\text{dH}_2\text{O}$ hasta 1.000 mL), se inoculó en 3 mL de medio mínimo selectivo (igual que el medio SC para placa, pero con 20 g de bacto agar y rafinosa en lugar de galactosa) y se incubó durante 48 h a 30°C y 220 RPM. Se tomó una alícuota tal de este cultivo de manera que al inocularla en 5 mL de nuevo medio mínimo, la densidad óptica a 600 nm tuviera un valor de 0,25 (*optical density*, $\text{OD}_{600}=0,25$). Este refresco se incubó hasta que se completaron dos ciclos de crecimiento completos (entre 6 y 8 h), momento en el cual se tomó 1 mL de células para inocular 9 mL de medio de expresión en un matraz de 100 mL ($\text{OD}_{600}=0,1$). Este cultivo de cada clon se incubó durante 72 h a 25°C y 220 RPM (cuando la actividad UPO era máxima; $\text{OD}_{600}=25-30$), se separaron las células por centrifugación (10 min a 4.500 RPM y 4°C) y el sobrenadante se filtró (con filtro de vidrio y de nitrocelulosa de 0,45 de tamaño de poro). Diluciones apropiadas de los sobrenadantes se prepararon de tal manera que alícuotas de 20 μL dieran lugar a una respuesta lineal en modo cinético. 50 μL de sobrenadante se utilizaron para cada punto en un gradiente de temperatura creado mediante termociclador, de 30 a 80°C. Tras una incubación de 10 min, las alícuotas se enfriaron en hielo durante 10 min y atemperaron a temperatura ambiente durante 5 min. Por último, estos sobrenadantes se sometieron al ensayo colorimétrico con ABTS (buffer fosfato sódico/citrato pH 4,0 100 mM, ABTS 0,3 mM y H_2O_2 2 mM). Los valores de termoestabilidad se calcularon según el ratio entre las actividades residuales incubadas a distintas temperaturas y el valor de actividad inicial a temperatura ambiente. El valor de T_{50} se determina como el valor de temperatura al cual la proteína pierde el 50% de su actividad inicial tras una incubación de 10 minutos.

Producción de variantes recombinantes de UPO en *S. cerevisiae*

Una colonia independiente de *S. cerevisiae* que comprendía la correspondiente variante de la invención fue seleccionada de una placa de medio mínimo SC *drop-out* y se inoculó en 20 mL de medio mínimo SC líquido, cultivos que se incubaron durante 48 h a 30°C y 220 RPM. Se tomó una alícuota tal de este cultivo de manera que al inocularla en 100 mL de nuevo medio mínimo, la OD_{600} tuviera un valor de 0,25. Este refresco se incubó hasta que se completaron dos ciclos de crecimiento completos (entre 6 y 8 h), momento en el cual se tomaron 100 mL de células para inocular 900 mL de medio de expresión en un matraz de 2.000 mL ($\text{OD}_{600}=0,1$). Este cultivo de cada clon se incubó a lo largo de 72 h a 25°C y a 220 RPM (cuando la actividad UPO era máxima; $\text{OD}_{600}=25-30$), se separaron las células por centrifugación (10 min a 4.500 RPM y 4°C) y el sobrenadante se filtró (con filtro de vidrio y de nitrocelulosa de 0,45 de tamaño de poro).

Purificación de variantes recombinantes de *AaeUPO1*

La purificación de las variantes AaeUPOs recombinantes descritas en la presente invención se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio catiónico seguida de cromatografía de intercambio aniónico (ÅKTA purifier, GE Healthcare). El extracto crudo fue en primer lugar tratado por precipitación fraccionada con sulfato de amonio (55%, primer corte) y tras eliminar el pellet, el sobrenadante fue de nuevo sometido a precipitación con sulfato de amonio (85%, segundo corte). El pellet final fue resuspendido en buffer fosfato sódico/citrato pH 4,3 10 mM (buffer A), y la muestra fue filtrada y cargada en una columna de intercambio catiónico fuerte (HiTrap SP FF, GE Healthcare), pre-equilibrada con buffer A. Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente lineal de 0 a 25% de buffer A con NaCl 1M en 55 mL y de 25 a 100% de buffer A con 1 M NaCl en 5 mL, a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones con actividad UPO fueron recuperadas, concentradas y dializadas en buffer Bis Tris pH 6,5 10 mM (buffer B) y cargadas en una columna de alta resolución de intercambio aniónico (Biosuite Q, Waters), pre-equilibrada con buffer B. Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente lineal de 0 a 15% de buffer B con NaCl 1M en 40 mL y de 15 a 100% de buffer B con 1 M NaCl en 5 mL, a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones con actividad UPO fueron recuperadas, concentradas y dializadas en buffer fosfato potásico pH 7,0 50mM y almacenadas a 4°C. Se obtuvieron valores Reinheitszahl [Rz] [A_{418}/A_{280}] de ~2. Las fracciones de los distintos pasos de purificación fueron analizadas en un gel de acrilamida al 12% SDS/PAGE, teñido con azul Coomassie. Las concentraciones de los extractos crudos de estos pasos fueron determinadas mediante el empleo del reactivo de Bradford y BSA como estándar.

Valores de constantes cinéticas

Las constantes cinéticas de las variantes de la invención para ABTS se estimaron en buffer fosfato sódico/citrato pH 4,0 100 mM y H₂O₂ 2 mM; y para el resto de los sustratos, en buffer fosfato potásico pH 7,0 100 mM, H₂O₂ 2 mM (DMP) o H₂O₂ 1 mM (NBD y naftaleno, en 20% of acetonitrilo - concentración final). Para H₂O₂ se utiliza alcohol bencílico como sustrato a las correspondientes condiciones de saturación. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y las oxidaciones de los sustratos se siguieron por cambios espectrofotométricos (ABTS: $\epsilon_{418}=36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; DMP: $\epsilon_{469}=27.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; NBD: $\epsilon_{425}=9.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, naftaleno: $\epsilon_{303}=2.010 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y alcohol bencílico: $\epsilon_{280}=1.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las cinéticas para naftaleno se realizaron según el protocolo descrito en M. G. Kluge, et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. 75: 1473-1478. Para calcular los valores de K_m y k_{cat} , se representaron los valores de V_{max} frente a las concentraciones de sustrato y se realizó un ajuste a la función de hipérbola (con SigmaPlot 10.0, donde el parámetro a es equivalente a k_{cat} y el parámetro b, a K_m).

Análisis por HPLC

Se realizó el análisis de las reacciones mediante cromatografía en fase reversa (HPLC). El equipo está formado por una bomba terciaria (Varian-Agilent Technologies, EEUU) acoplada a un *autosampler* (Merck Millipore, MA, EEUU); para la separación se utilizó una columna ACE C18 PFP (pentafluorofenil, 15 cm x 4,6 cm) a 45°C y la detección se llevó a cabo mediante el uso de un detector de fotodiodo (PDA) (Varian,-Agilent Technologies, EEUU). La fase móvil seleccionada fue 70% metanol y 30% *dd*H₂O (en ambos casos con un 0,1% de ácido acético) a un flujo de 0,8 mL/min. La reacción se cuantificó a 268 nm (basado en HPLC estándares). Para la reacción de 15 min, la mezcla contuvo 6,6 nM de enzima pura, naftaleno 1 mM, acetonitrilo 20% y H₂O₂ 1 mM en buffer fosfato potásico pH 7,0 100 mM (1 mL de volumen final). La reacción se inició con la adición de H₂O₂ y se paró con 20 μL of HCl 37%. Para las reacciones a largo tiempo, las condiciones empleadas fueron las descritas anteriormente pero sin parar la reacción con HCl. A distintos tiempos de reacción (de 1 a 270 min), una muestra de 10 μL fue inyectada y analizada.

Para los valores cinéticos del 1-naftol, la reacción se llevó a cabo con 40 nM de enzima pura, 1-naftol 1 mM, acetonitrilo 20% y H₂O₂ 1 mM en buffer fosfato potásico pH 7,0 100 mM (0,2 mL de volumen final).

Las desviaciones estándar resultaron menos del 5% en todos los casos.

Análisis por MALDI-TOF-MS y determinación del punto isoelectrico

Los análisis se llevaron a cabo mediante el uso de un equipo Autoflex III MALDITOF-TOF con un láser *smartbeam* (Bruker Daltonics). Las muestras se evaluaron en modo positivo. La calibración del método se realizó usando BSA con estándar, cubriendo así un rango de 15.000 a 70.000 Da. Para la determinación del punto isoelectrico de las variantes UPO, 8 μg de enzima pura se sometieron a electroforesis bidimensional. Estos experimentos se realizaron en el Servicio de Proteómica y Genómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, España).

Análisis por Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas (LC/MS)

Para la realización de estos análisis se empleó un espectrómetro de masas con analizador híbrido Q-TOF (QSTAR, ABSciex, MA, EEUU). Como fuente de ionización se utilizó electrospray (ESI), y como fase ionizante, metanol. El sistema de entrada en este caso fue inyección directa en un HPLC 1100 (Agilent Technologies, EEUU). La resolución del ensayo corresponde a 9.000 FWHM (*full width at half maximum*), la exactitud, 5-10 ppm y se realizó en modo negativo.

RESULTADOS

Tomando como parental la enzima mutante PaDa-I de SEQ ID NO: 18 codificada por la SEQ ID NO: 17 para llevar a cabo los experimentos de evolución dirigida, se construyeron librerías de mutantes de la UPO mediante mutagénesis aleatoria y recombinación por StEP e *in vivo* DNA *shuffling* con el objetivo de obtener una enzima mutante o variante que muestre una menor actividad peroxidasa sobre el 1-naftol a la vez que se potencia la actividad peroxigenasa sobre el naftaleno, teniendo en cuenta además que dicha variante debe expresarse de forma robusta en organismos heterólogos y secretarse en forma activa, soluble y muy estable. Para ello, cada variante obtenida en las librerías de mutantes fue sometida a un doble *screening* diseñado *ad-hoc* cuya finalidad es la obtención de las variantes que poseen las capacidades arriba indicadas, una mayor actividad peroxigenasa frente a naftaleno y una menor actividad peroxidasa frente a 1-naftol.

Tras someter al mutante PaDa-I (SEQ ID NO: 17) a dos ciclos de evolución dirigida (~ 4.000 clones analizados), se identificó un doble mutante al que se denominó JaWa y que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 23, que codifica para la variante de SEQ ID NO: 24. Dicho mutante JaWa (SEQ ID NO: 24) comprende las mutaciones G241D y R257K respecto al mutante PaDa-I de SEQ ID NO: 18, con una actividad peroxigenasa en microplaca que dobló la de su parental y una actividad peroxidasa que mermó a la mitad (**Figura 1**).

Ambas variantes, PaDa-I y JaWa, fueron producidas, purificadas a homogeneidad (valor Reinheitszahl [Rz] $[A_{418}/A_{280}] \sim 2$) y bioquímicamente caracterizadas. No se detectaron cambios en cuanto a características espectrales generales, procesamiento del extremo N-terminal, masa molecular o grado de glicosilación (**Tabla 1**).

Tabla 1. Características bioquímicas de la *AaeUPO wild-type* (SEQ ID NO: 4) y de las variantes PaDa-I (SEQ ID NO: 18) y JaWa (SEQ ID NO: 24).

Características espectroscópicas y bioquímicas	UPO <i>wild-type</i>	PaDa-I	JaWa
Pm (Da) ¹	46.000	52.000	52.000
Pm (Da) ²	n.d.	51.100	51.100
Pm (Da) ³	35.942	35.914	35.944
Grado de glicosilación (%)	22	30	30
Estabilidad térmica, T_{50} (°C) ⁴	n.d.	57,6	59,7
pI	4,9-5,7	5,5	5,3
pH óptimo para ABTS	4,0	4,0	4,0
pH óptimo para DMP	7,0	6,0	6,0
pH óptimo para naftaleno	6,5	6,0	6,0
Rz, (A_{418}/A_{280})	2,4	1,8	2,3
Región Soret (nm)	420	418	418
CT1 (nm)	572	570	570
CT2 (nm)	540	537	537

¹ Estimado por SDS-PAGE; ² estimado mediante MALDI-TOF; ³ estimado según composición aminoacídica.

⁴ Estimado en sobrenadantes de los cultivos. n.d. no determinado.

Tal y como se observa en la **Tabla 1** y en la **Figura 2**, la enzima mutante JaWa de SEQ ID NO: 24 mostró mayor termoestabilidad cinética que la variante PaDa-I de SEQ ID NO: 18 (2°C mayor T_{50} -temperatura a la cual la enzima retiene el 50% de su actividad tras 10 min de incubación-), además de una alta estabilidad en presencia de acetonitrilo, necesario para la biodisponibilidad del naftaleno (la solubilidad del naftaleno en agua es de 31,7 mg/L) (**Figura 2**).

La reacción de transformación del naftaleno llevada a cabo por los mutantes JaWa (SEQ ID NO: 24) y PaDa-I (SEQ ID NO: 18) y que fue analizada mediante HPLC-PDA ha puesto de manifiesto que la oxigenación del naftaleno que la *AaeUPO* realiza sucede a través de un compuesto intermediario inestable, el 1,2-óxido (epóxido) de naftaleno. Éste experimenta una rápida hidrólisis a naftol (1- y 2-naftol) cuando el pH es ácido (M. Kluge, et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. 81: 1071-1076). Por ello, se midió primero la distribución de los productos

resultantes tras 15 min de reacción (parada con HCl). Tanto la variante PaDa-I (SEQ ID NO: 18) como la variante JaWa (SEQ ID NO: 24), demostraron poseer una regioselectividad similar (92% 1-naftol, 8% 2-naftol), pero la variante JaWa presentó un aumento significativo en la producción de 1-naftol (156% más que PaDa-I) sin trazas detectables de 1,4-naftoquinona, su producto de oxidación (**Figura 3A**).

Cuando se realizó el seguimiento de la reacción a tiempos largos (270 min a pH 7,0 sin parar la reacción), se observó un comportamiento similar, lo cual indica que la transformación del 1,2-óxido de naftaleno a naftoles también sucede a pH neutro, si bien es cierto que a menor velocidad; también se detectaron trazas de 1,4-naftoquinona (**Figura 3B, C, D**).

Mientras que con ambas variantes, PaDa-I y JaWa, la formación del intermediario epóxido llegó a su máximo a los ~40 min (debido al daño oxidativo causado por el H₂O₂ en todas las peroxidases), la regioselectividad aumentó hasta el 97% de 1-naftol. Este resultado se corresponde con la pérdida de selectividad observada en condiciones acídicas que viene dada por una mayor reactividad del epóxido.

La composición de los productos resultantes no varió para ninguna de las variantes PaDa-I (SEQ ID NO: 18) y JaWa (SEQ ID NO: 24), según se observó en el análisis de espectrometría de masas llevado a cabo, pero las diferencias entre ambos mutantes en cuanto a rendimiento de producción fueron muy marcadas llegando a valores de 0,14 y 0,32 mM de 1-naftol para PaDa-I y JaWa, respectivamente. La variante JaWa obtuvo valores totales de recambio (*total turnover numbers* -TTN-) de casi 50.000 frente a los 20.000 de PaDa-I.

Adicionalmente, se determinaron los valores cinéticos de ambas variantes con sustratos tanto de actividad peroxigenasa como peroxidasa (**Tabla 2**), según se describe en el apartado de materiales y métodos. Brevemente, las constantes cinéticas para el ABTS se midieron en buffer fosfato sódico/citrato pH 4,0 100 mM y H₂O₂ 2 mM, mientras que para el resto de los sustratos se usó buffer fosfato potásico pH 7,0 100 mM y H₂O₂ 2mM (DMP) o 1 mM (naftaleno o NBD, en 20% de acetonitrilo -concentración final). Para el H₂O₂ se utilizó alcohol bencílico como sustrato a las correspondientes condiciones de saturación.

Tabla 2. Parámetros cinéticos para las variantes PaDa-I (SEQ ID NO: 18) y JaWa (SEQ ID NO: 24).

Sustrato	Constantes cinéticas	PaDa-I	JaWa
ABTS	K_m (μM)	48,0 \pm 4,5	181 \pm 22
	k_{cat} (s^{-1})	395 \pm 13	125 \pm 5
	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	8,2x10 ⁶ \pm 6x10 ⁵	6,9x10 ⁵ \pm 6,3x10 ⁴
DMP	K_m (μM)	126 \pm 14	866 \pm 108
	k_{cat} (s^{-1})	68 \pm 2	142 \pm 8
	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	5,4x10 ⁵ \pm 4,8x10 ⁴	1,6x10 ⁵ \pm 1,2x10 ⁴
Naftaleno	K_m (μM)	578 \pm 106	127 \pm 27
	k_{cat} (s^{-1})	229 \pm 17	78 \pm 3
	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	4x10 ⁵ \pm 4x10 ⁴	6,2x10 ⁵ \pm 1,1x10 ⁵
NBD	K_m (μM)	483 \pm 95	769 \pm 80
	k_{cat} (s^{-1})	338 \pm 22	154 \pm 8
	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	7x10 ⁵ \pm 9.9x10 ⁴	2.0x 0 ⁵ \pm 1.2x10 ⁴
H ₂ O ₂	K_m (μM)	486 \pm 55	1.250 \pm 300
	k_{cat} (s^{-1})	238 \pm 8	447 \pm 40
	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	5,0x10 ⁵ \pm 4,2x10 ⁴	3,6x10 ⁵ \pm 5,9x10 ⁴

Tal y como se observa en la **Tabla 2**, el valor de k_{cat}/K_m (eficiencia catalítica) para el naftaleno resultó ser 1,5 veces mayor para la variante JaWa (SEQ ID NO: 24) respecto de la variante PaDa-I (SEQ ID NO: 18). Asimismo, la actividad peroxidasa de la variante JaWa (SEQ ID NO: 24) se vio mermada (con una llamativa disminución en las eficiencias catalíticas de 3 a 11 veces para los sustratos de actividad peroxidasa DMP y ABTS, respectivamente). También el valor de k_{cat}/K_m para H₂O₂ con alcohol bencílico como sustrato resultó afectado. En los resultados obtenidos con NBD, otro sustrato de transferencia de oxígeno como el naftaleno, la tendencia es similar, es decir, la k_{cat} disminuye en la variante JaWa mientras que la afinidad por el sustrato K_m mejora, a pesar de que esto conlleva mayor k_{cat}/K_m para la variante PaDa-I. El hecho de que la eficiencia catalítica de la variante JaWa para NBD no se haya mejorado no es significativo, ya que no es un sustrato empleado en los *screenings* de esta parte

de la evolución. Sin embargo, que la tendencia de la constante catalítica y la afinidad por el sustrato sea similar en dos sustratos de monooxigenación indica que hay un mecanismo de acción de la enzima actuando de alguna manera para favorecer la formación de 1-naftol a la vez que reduce la actividad peroxidasa.

5 Para confirmar el descenso de la actividad peroxidasa respecto de la hidroxilación del naftaleno, se midieron por HPLC los valores de la constante catalítica ($\mu\text{mol producto } \mu\text{mol enzima}^{-1} \text{ min}^{-1}$) para la conversión del 1-naftol en 1,4-naftoquinona. Aunque la constante catalítica de la variante PaDa-I (SEQ ID NO: 18) para 1-naftol ya resultó ser baja (200 min^{-1}), con la variante JaWa (SEQ ID NO: 24) este valor disminuyó hasta 92 min^{-1} , además de producirse una disminución de $\sim 1,5$ veces en el ratio 1,4-naftoquinona:1-naftol (**Figura 4**). Este efecto también es
10 apreciable a simple vista, ya que los productos poliméricos que se producen en la reacción con la variante PaDa-I (SEQ ID NO: 18) (debido a procesos no enzimáticos de reagrupamiento de las quinonas) tienen color (**Figura 4**). Existen hipótesis en la bibliografía sobre la posibilidad de que la UPO se asemeje a la CPO en la existencia de distintos sitios con actividad peroxidasa en su estructura. Para suprimir estas rutas alternativas de peroxidación, se examinó detenidamente la estructura del cristal de la AaeUPO1 y se construyó una variante mediante mutagénesis dirigida en el Trp24 (**Figura 5A**), un residuo altamente oxidable, localizado en la superficie de la proteína, empleando las variantes PaDa-I (SEQ ID NO: 18) y JaWa (SEQ ID NO: 24) como moldes, tal y como se
15 ha descrito en el apartado de materiales y métodos.

A continuación, se determinaron las actividades de las variantes PaDa-I-W24F (SEQ ID NO: 30) y JaWa-W24F (SEQ ID NO: 32). La mutación W24F redujo el 60% de la actividad peroxidasa en ambas variantes y con todos los sustratos probados, pero produjo un descenso en la actividad peroxigenasa, con una disminución del 50% en la actividad sobre naftaleno y NBD (**Figura 5B**). Esto indica que el residuo Trp24 probablemente ejerza también algún efecto sobre la actividad peroxigenasa de la UPO.

25 **Ejemplo 2. Análisis mutacional de las variantes de la invención**

Se mapearon las mutaciones de la variante JaWa (SEQ ID NO: 24) sobre la estructura de la AaeUPO1 silvestre (SEQ ID NO: 4), que presenta un bolsillo catalítico muy característico en el que se produce la unión al sustrato, dominado por una tríada de Phe (Phe69-Phe121-Phe199) implicada en la correcta orientación de los compuestos aromáticos (**Figura 6 y Figura 7**). La mutación G241D se encuentra en la entrada al canal del hemo. El drástico cambio de una Gly, apolar y de pequeño tamaño, por un Asp, cargado y de más voluminoso, parece estrechar la cavidad, lo cual puede ejercer algún efecto en la acomodación del naftaleno en el bolsillo catalítico. Esta teoría concuerda con el hecho de que la afinidad por el naftaleno se ha visto mejorada en la variante JaWa, con un descenso en su K_m de 3 veces (**Tabla 2**). Por el contrario, la introducción de una carga negativa en el dominio hemo-tiolado (en el que hay un par ácido-base Glu196-Arg189 implicado en la formación del Compuesto I -porfirina con un radical catiónico y oxo-Fe IV=O-) puede tener consecuencias negativas en el valor de k_{cat} , dependiendo de la naturaleza química del sustrato unido. La mutación R257K se localiza en la superficie de la proteína, lejos de regiones con relevancia en la catálisis, pero se encuentra en el inicio de una "senda" hacia el residuo R189 catalítico. Es de sobra conocido que algunas peroxidases presentan varias entradas en su superficie para la oxidación de sustratos mediada por un electrón a través de una ruta de transferencia electrónica de largo recorrido hacia el dominio del hemo, como también se ha descrito en el presente trabajo para las variantes W24F. En este sentido, la sustitución R257K puede estar afectando a alguno de esos circuitos con un posible efecto lateral beneficioso sobre la termoestabilidad a través de remodelaciones localizadas en la estructura secundaria (las dos mutaciones, G241D y R257K, varían la estimación del factor B (**Figura 8**)). El factor B hace referencia a la rigidez/flexibilidad de una región proteica o de un aminoácido presente en una proteína o péptido.

Estos resultados ponen de manifiesto que las variantes UPO descritas en la presente invención presentan la mayor selectividad y el más alto TTN para la producción de 1-naftol que se conoce para esta superfamilia de enzimas hasta la fecha. Además, como se ha demostrado, dichas variantes, son secretadas heterológicamente en forma activa, soluble y muy estable, siendo capaces de llevar a cabo oxigenaciones aromáticas selectivas en ausencia de cofactores NAD(P)H y dominios reductasa. Su actividad mono(per)oxigenasa autosuficiente, junto con su reducida actividad peroxidasa hacen de esta variante de UPO un valioso biocatalizador para su aplicación en el campo de la síntesis orgánica.

55 **Ejemplo 3. Obtención y caracterización de variantes de la invención para la síntesis de metabolitos de fármacos (Human Drug Metabolites, HDMs).**

Entre los HDMs más importantes, destacan por ejemplo, derivados del propranolol, un fármaco beta-bloqueante utilizado comúnmente para el tratamiento de la hipertensión, profilaxis de migrañas infantiles y la atenuación de manifestaciones físicas de la ansiedad. En el presente ejemplo se muestra como las variantes UPO de la invención son capaces de formar 5'-hidroxipropranolol a partir de la oxigenación de propranolol, sin contaminantes inorgánicos, a temperatura ambiente, presión atmosférica y en ausencia de disolventes orgánicos, en un único paso, con concentraciones catalíticas de H_2O_2 y sin ser necesario además la adición de antioxidantes como el ácido ascórbico a la reacción.

Además de las variantes descritas en el Ejemplo 1, se construyó una nueva variante partiendo del mutante JaWa, que mostraba incluso una mejora respecto a dicho mutante JaWa en la producción de 5'-hidroxipropranolol. Se describe a continuación la obtención de la nueva variante denominada SoLo que comprende la SEQ ID NO: 42, y que está codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 41.

5

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y enzimas

ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), ácido L-ascórbico, 4-aminoantipirina, alcohol bencílico, Taq DNA polimerasa y el kit de transformación de *Saccharomyces cerevisiae*, se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EEUU). NBD (5-nitro-1,3-benzodioxol) se adquirió a TCI América (Portland, OR, EEUU), mientras que el naftaleno, el propranolol y el persulfato de potasio proceden de Acros Organics (Geel, Belgium). 5-hidroxipropranolol fue adquirido a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Las células competentes de *Escherichia coli* XL2-Blue y la DNA polimerasa Pfu ultra se obtuvieron de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU) y la DNA polimerasa de alta fidelidad *iProof* fue adquirida a Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU). Las enzimas de restricción BamHI y XhoI se obtuvieron de New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU) y la cepa deficiente en proteasas de *S. cerevisiae* BJ5465, de LGCPromochem (Barcelona, Spain). Los kits Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep y Zymoclean Gel DNA Recovery son comercializados por Zymo Research (Orange, CA, EEUU). El kit NucleoSpin Plasmid kit procede de Macherey-Nagel (Düren, Alemania) y los oligonucleótidos empleados fueron sintetizados por Metabion (Bayern, Alemania). Todos los compuestos químicos son de la mayor pureza disponible en el mercado.

Evolución dirigida

Partiendo del mutante JaWa que comprende la SEQ ID NO: 24, que está codificada por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 23, tras cada ciclo de evolución, los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa semipreparativo y se purificaron mediante el kit Zymoclean Gel DNA Recovery. Los fragmentos de DNA recuperados se clonaron en el plásmido pJRoc30 bajo el control del promotor GAL1 linealizado con BamHI y XhoI (eliminando también el gen parental o predecesor). El plásmido linealizado se cargó en un gel de agarosa preparativo de bajo punto de fusión y se purificó usando el kit Zymoclean Gel DNA Recovery.

30

Primera generación (1G)

Para la obtención del mutante SoLo (SEQ ID NO: 42, codificado por la SEQ ID NO: 41), se realizaron estudios de acoplamiento o *docking* sobre el mutante JaWa (SEQ ID NO: 24, codificado por la SEQ ID NO: 23) mediante el programa *Molecular Operating Environment* (MOE, *Chemical Computing Group Inc.* <http://www.chemcomp.com>) utilizando como sustrato el propranolol. A partir de ellos, se seleccionó una zona de la proteína para ser sometida a mutagénesis aleatoria mediante el uso de la técnica MORPHING (*Mutagenic Organized Recombination Process by Homologous in vivo Grouping*) (D. González-Perez et al., *PLoS ONE* 2014. 9:e90919). Para la obtención de las diferentes variantes adicionales a las ya descritas previamente, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR con tendencia a error en una zona concreta de la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 23) que codifica para el mutante JaWa (SEQ ID NO: 24), específicamente en la zona codificante que va de la región D187-V248 del mutante JaWa de SEQ ID NO: 24 en un volumen final de 50 μ L. Estas reacciones contenían 3% de dimetil sulfóxido (DMSO), 90 nM MJaWa Fw (SEQ ID NO: 43; 5'-gcgcatccaagactcattg-3'), 90 nM MJaWa Rev (SEQ ID NO: 44; 5'-gatcttgcgacattttcc-3'), 0,3 mM desoxinucleótido trifosfatos (dNTPs, 0,075 mM de cada uno), 0,1 mM o 0,2 mM MnCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 0,05 U/ μ L Taq DNA polimerasa, y 1 ng/ μ L del molde (plásmido pJRoc30 procedente del Instituto de Tecnología de California (CALTECH, EEUU), que comprende la secuencia nucleotídica del mutante JaWa de SEQ ID NO: 23). Esta reacción de PCR mutagénica se realizó en un termociclador de gradiente (Mycycler, Bio-Rad, EEUU) determinando los siguientes parámetros: 94°C 2 min (1 ciclo); 94°C 45 s, 48°C 30 s, y 72°C 90 s (28 ciclos); y 72°C 10 min (1 ciclo). Por otro lado, se realizaron PCRs de alta fidelidad en los fragmentos que debían mantenerse no mutagénicos en un volumen final de 50 μ L. Estas reacciones contenían 3% de dimetil sulfóxido (DMSO), 0,5 μ M HFJaWa Fw (SEQ ID NO: 45; 5'-caggctatcctatgcagccc-3') y 0,5 μ M RMLC (SEQ ID NO: 34; 5'-gggagggcgatgaatgaagc-3') o 0,5 μ M HFJaWa Rev (SEQ ID NO: 46; 5'-caaaggagaaattggggttggtcg-3') y 0,5 μ M RMLN (SEQ ID NO: 33; 5'-cctctatacttaacgtcaagg-3') para el otro fragmento de alta fidelidad, 1 mM dNTPs (0,25 mM de cada uno), 0,05 U/ μ L PfuUltra DNA polimerasa, y 2 ng/ μ L de molde. Estas reacciones se llevaron a cabo en el mismo termociclador de gradiente determinando los siguientes parámetros: 95°C 2 min (1 ciclo); 95°C 45 s, 48°C 30 s, y 72°C 90 s (28 ciclos); y 72°C 10 min (1 ciclo). Se mezclaron 200 ng de los productos de PCR con 100 ng del plásmido linealizado y se transformaron células competentes de *S. cerevisiae* de manera que se produjera *in vivo shuffling* del DNA y clonaje (empleando para ello el kit de transformación de levadura). Se plaquéó el volumen resultante de la transformación en placas de medio mínimo sólido (para placas SC *drop-out*, dicho medio mínimo sólido consta de 100 mL de *yeast nitrogen base* (Sigma) al 6,7%, 100 mL de complemento de aminoácidos sin uracilo a 19,2 g/L, 100 mL de glucosa al 20%, 20 g bacto agar, 700 mL de agua destilada y 1 mL de cloranfenicol a 25 g/L) y se incubaron durante 3 días a 30°C. Las colonias individuales que se formaron fueron seleccionadas y sometidas al ensayo de *High-Throughput Screening* colorimétrico dual (HTS), para explorar librerías de mutantes eficientemente sin alterar la estabilidad enzimática de los mismos, además de a varios re-screenings, como se describe más abajo. En este ciclo de evolución se obtuvo una nueva variante, denominada SoLo que comprende

60

la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 41, que codifica para la variante de SEQ ID NO: 42, en la cual se produjo una nueva mutación: F191S, respecto a la variante JaWa (SEQ ID NO: 24).

Segunda Generación (2G)

5 Debido a que la mutación que apareció en la variante SoLo (SEQ ID NO: 42) se encuentra en una de las dos fenilalaninas que delimitan la entrada al canal del hemo, se procedió a realizar mutagénesis saturada combinatorial (*Combinatorial saturation mutagenesis* (CSM)), mediante el método del 22c-trick, según se describe en S. Kille *et al. ACS Synth Biol* 2013. 2:83-92; en las posiciones S191 y F76.

10 Para ello se llevaron a cabo tres reacciones de PCR en un volumen final de 50 μ L. Todas ellas contenían 3% de DMSO, 0,3 mM dNTPs (0,075 mM de cada uno), 0,05 U/ μ L PfuUltra DNA polimerasa, y 2 ng/ μ L de molde pero cada una de ellas con diferentes primers. PCR 1 con 0,25 μ M de RMLN (SEQ ID NO: 33), 0,25 μ M de F76 VHGR (SEQ ID NO: 47; 5'-gcaagtccgtaatgagattgccgtccacaaggtgggcccgcgatattggccdbgattgcggc-3'), 0,25 μ M de F76 NDT R (SEQ ID NO: 48; 5'-gcaagtccgtaatgagattgccgtccacaaggtgggcccgcgatattggcahngattgcggc-3') y 0,25 μ M de F76 TGG R (SEQ ID NO: 49; 5'-gcaagtccgtaatgagattgccgtccacaaggtgggcccgcgatattggccagattgcggc-3'). PCR 2 con 0,25 μ M de HF F (SEQ ID NO: 50; 5'-gcgcccaccttggacggcaatctcattaccggacttc-3'), 0,25 μ M de S191 VHGR (SEQ ID NO: 51; 5'-cccatccacaaaaagattcgcggggaaggtggtctcgccgtaagcagtcdbgaacctaaag-3'), 0,25 μ M de S191 NDT R (SEQ ID NO: 52; 5'-cccatccacaaaaagattcgcggggaaggtggtctcgccgtaagcagtcdbgaacctaaag-3') y 0,25 μ M de S191 TGG R (SEQ ID NO: 53; 5'-cccatccacaaaaagattcgcggggaaggtggtctcgccgtaagcagtcdbgaacctaaag-3'). PCR 3 con 0,25 μ M de HF F-RMLC (SEQ ID NO: 54; 5'-cgcgagaccaccctcccggaatcttttggatggg-3') y 0,25 μ M de RMLC (SEQ ID NO: 34). Las regiones subrayadas son aquellas por las que se produce el ensamblaje *in vivo* del DNA y en cursiva el codón cambiado (donde N = A/T/C/G; D = no C; V = no T, H = no G; y B = no A). Estas reacciones se llevaron a cabo en el termociclador de gradiente determinando los siguientes parámetros: 95°C 2 min (1 ciclo); 95°C 45 s, 48°C 45 s, y 72°C 60 s (28 ciclos); y 72°C 10 min (1 ciclo). Se mezclaron 200 ng de cada uno de los productos de PCR con 100 ng del plásmido linealizado y se transformó en células competentes de *S. cerevisiae*.

25 El resto del procedimiento se siguió como se ha explicado previamente para la obtención de la primera generación. No se obtuvo ninguna variante mejorada respecto al mutante SoLo.

Tercera generación (3G)

30 En el bolsillo catalítico de la AaeUPO, PaDa-I y JaWa, se encuentra una tríada de fenilalaninas (F69-F121-F199). Debido al complejo bolsillo catalítico y a que estas fenilalaninas son las encargadas de la correcta orientación de los sustratos aromáticos, se decidió llevar a cabo mutagénesis sobre estos residuos con codones degenerados NNK (N = A/T/C/G; D; K = T/G, M = A/C) de manera independiente, es decir, creando tres librerías diferentes.

35 Librería F69: se llevaron a cabo dos reacciones de PCR en un volumen final de 50 μ L. La primera contenía 3% de DMSO, 0,2 mM dNTPs (0,05 mM de cada uno), 0,5 μ M RMLN (SEQ ID NO: 33), 0,5 μ M F69 R (SEQ ID NO: 55; 5'-gaagattgctgctgattgtcmnnattgaatc-3'), 0,02 U/ μ L *iProof* DNA polimerasa, y 2 ng/ μ L de molde (SoLo que comprende la SEQ ID NO: 41). Y la segunda 3% de DMSO, 0,2 mM dNTPs (0,05 mM de cada uno), 0,5 μ M RMLC (SEQ ID NO: 34), 0,5 μ M F69 F (SEQ ID NO: 56; 5'-cgcggttcaggaagattcaatnnkgacaatc-3'), 0,02 U/ μ L *iProof* DNA polimerasa, y 2 ng/ μ L de molde (SoLo que comprende la SEQ ID NO: 41).

40 Librería F121: se llevaron a cabo dos reacciones de PCR en un volumen final de 50 μ L. La primera contenía 3% de DMSO, 0,2 mM dNTPs (0,05 mM de cada uno), 0,5 μ M RMLN (SEQ ID NO: 33), 0,5 μ M F121 R (SEQ ID NO: 57; 5'-cactatggcgtgccttcmnnnggtgccatgc-3'), 0,02 U/ μ L *iProof* DNA polimerasa, y 2 ng/ μ L de molde (SoLo que comprende la SEQ ID NO: 41). Y la segunda 3% de DMSO, 0,2 mM dNTPs (0,05 mM de cada uno), 0,5 μ M RMLC (SEQ ID NO: 34), 0,5 μ M F121 F (SEQ ID NO: 58; 5'-ggactcaatgagcatggcaccnnkgaaggcg-3'), 0,02 U/ μ L *iProof* DNA polimerasa, y 2 ng/ μ L de molde (SoLo que comprende la SEQ ID NO: 41).

45 Librería F199: se llevaron a cabo dos reacciones de PCR en un volumen final de 50 μ L. La primera contenía 3% de DMSO, 0,2 mM dNTPs (0,05 mM de cada uno), 0,5 μ M RMLN (SEQ ID NO: 33), 0,5 μ M F199 R (SEQ ID NO: 59; 5'-ccacaaaaagattcgcgggmnnnggtggtctcg-3'), 0,02 U/ μ L *iProof* DNA polimerasa, y 2 ng/ μ L de molde (SoLo que comprende la SEQ ID NO: 41). Y la segunda 3% de DMSO, 0,2 mM dNTPs (0,05 mM de cada uno), 0,5 μ M RMLC (SEQ ID NO: 34), 0,5 μ M F199 F (SEQ ID NO: 60; 5'-ctactgcttaccggcgagaccaccnnkcccgcg-3'), 0,02 U/ μ L *iProof* DNA polimerasa, y 2 ng/ μ L de molde (SoLo que comprende la SEQ ID NO: 41).

50 Estas reacciones se llevaron a cabo en el termociclador de gradiente determinando los siguientes parámetros: 98°C 30 s (1 ciclo); 98°C 10 s, 48°C 30 s, y 72°C 30 s (28 ciclos); y 72°C 10 min (1 ciclo). Se mezclaron 200 ng de cada uno de los productos de PCR con 100 ng del plásmido linealizado (cada librería por separado) y se transformó en células competentes de *S. cerevisiae*. El resto del procedimiento se siguió como se ha explicado previamente para la obtención de la primera y segunda generación. Tampoco se encontró ninguna variante mejor que SoLo (SEQ ID NO: 42), por lo que se seleccionó este mutante, junto con el mutante JaWa (SEQ ID NO: 24) y el parental AaeUPO1 para analizar la síntesis de HDMS, tomando a modo de ejemplo el 5'-hidroxipranolol con cada una de ellas.

55

60 Preparación de las librerías de mutantes

Se seleccionaron colonias individuales correspondientes a clones y se inocularon en placas de 96 pocillos estériles (Greiner Bio-One GmbH, Alemania), de ahora en adelante placas madre, con 200 μ L/pocillo de medio mínimo de expresión (100 mL de *yeast nitrogen base* al 6,7%, 100 mL de complemento de aminoácidos sin uracilo a 19,2 g/L, 67 mL de buffer fosfato potásico pH 6,0 1 M, 111 mL de galactosa al 20%, 22 mL de MgSO₄ a 0,1 M, 31,6 mL de

etanol absoluto, 1 mL de cloranfenicol a 25 g/L y ddH₂O hasta 1.000 mL). La columna 6 de cada columna se inoculó con el correspondiente parental y el pocillo H1, con *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pJRoc30-MTL (lacasa sin expresión funcional). Las placas se sellaron para evitar la evaporación y se incubaron a 30°C, 220 RPM y 80% de humedad relativa (en un Minitron, INFORS, Suiza) durante 5 días.

5

High-Throughput Screening (HTS) colorimétrico dual

Las placas madre se centrifugaron (Eppendorf 5810R centrifuge, Alemania) durante 10 min a 3.500 RPM y 4°C. Se transfirieron 20 µL de sobrenadante de estas placas madre a dos placas réplica hijas con la ayuda de un robot manipulador de líquidos Freedom EVO (Tecan, Suiza). Se añadieron 50 µL de mezcla de reacción con propranolol a las placas hijas utilizando un robot pipeteador (Multidrop Combi Reagent Dispenser, Thermo Scientific, EEUU). La mezcla de reacción con propranolol estaba compuesta por buffer fosfato potásico pH 7,0 50 mM, propranolol 5 mM y H₂O₂ 2 mM para detectar la actividad peroxigenasa de la enzima sobre el sustrato y su posterior actividad peroxidasa sobre el producto. De manera simultánea se llevó a cabo este mismo ensayo de *screening* pero añadiendo ácido ascórbico (4 mM) a la mezcla de reacción para poder detectar solamente la actividad peroxigenasa de la enzima sobre el propranolol y evitar que se produzca la posterior actividad peroxidasa. Sin ascórbico, las placas fueron incubadas 30 min y con ascórbico 60 min. Posteriormente mediante el ensayo de la 4 aminoantipirina (4-AAP, CR Otey y JM Joern, *Methods Mol Biol* 2003. 230:141-8) se reveló la cantidad de producto formado por pocillo. Las placas se agitaron brevemente y se midió la absorbancia a 530 nm, empleando para ello un lector de placas (SPECTRAMax Plus 384, Molecular Devices, EEUU). Los valores se normalizaron frente al parental de cada placa. Para descartar falsos positivos, se llevaron a cabo *re-screenings*, además de un tercer *re-screening* en el cual se determinó la estabilidad cinética (T₅₀) (P. Molina-Espeja, et al. *Appl. Environ. Microb.* 2014. 80: 3496-3507).

10

15

20

Segundo *re-screening*

Una alícuota con los ~10 mejores clones del *screening* fue inoculada en 3 mL de medio de cultivo YPD (10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 100 mL de glucosa al 20%, 1 mL de cloranfenicol a 25 g/L y ddH₂O hasta 1.000 mL) a 30°C y 220 RPM durante 24 h. Los plásmidos de esos cultivos se extrajeron con el kit Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep. Debido a la impureza y a la baja concentración del DNA extraído, los plásmidos fueron transformados en células supercompetentes de *E. coli* XL2-Blue y plaqueadas en placas LB-amp (el medio Luria-Bertani se compone de 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 10 g de NaCl, 100 mg de ampicilina y ddH₂O hasta 1.000 mL). Se seleccionó una colonia individual de cada clon, se inoculó en 5 mL de LB y se creció durante 16 h a 37°C y a 250 RPM. Los plásmidos fueron extraídos mediante el kit NucleoSpin Plasmid y transformados en células competentes de *S. cerevisiae* (así como con el parental, que en la primera generación es JaWa y en la segunda y tercera es SoLo). Cinco colonias individuales de cada clon se seleccionaron e inocularon para someterlas al mismo protocolo de *screening* descrito anteriormente.

25

30

35

Tercer *re-screening*. Ensayo de termoestabilidad

Se seleccionó una colonia individual de *S. cerevisiae* con el clon correspondiente (crecido en placa de medio mínimo SC drop-out: 100 mL de *yeast nitrogen base* al 6,7%, 100 mL de complemento de aminoácidos sin uracilo a 19,2 g/L, 100 mL de glucosa al 20%, 1 mL de cloranfenicol a 25 g/L y ddH₂O hasta 1.000 mL), se inoculó en 3 mL de medio mínimo selectivo (igual que el medio SC para placa, pero con 20 g de bacto agar y rafinosa en lugar de galactosa) y se incubó durante 48 h a 30°C y 220 RPM. Se tomó una alícuota tal de este cultivo de manera que al inocularla en 5 mL de nuevo medio mínimo, la densidad óptica a 600 nm tuviera un valor de 0,25 (*optical density*, OD₆₀₀=0,25). Este refresco se incubó hasta que se completaron dos ciclos de crecimiento completos (entre 6 y 8 h), momento en el cual se tomó 1 mL de células para inocular 9 mL de medio de expresión en un matraz de 100 mL (OD₆₀₀=0,1). Este cultivo de cada clon se incubó durante 72 h a 25°C y 220 RPM (cuando la actividad UPO era máxima; OD₆₀₀=25-30), se separaron las células por centrifugación (10 min a 4.500 RPM y 4°C) y el sobrenadante se filtró (con filtro de vidrio y de nitrocelulosa de 0,45 de tamaño de poro). Diluciones apropiadas de los sobrenadantes se prepararon de tal manera que alícuotas de 20 µL dieran lugar a una respuesta lineal en modo cinético. 50 µL de sobrenadante se utilizaron para cada punto en un gradiente de temperatura creado mediante termociclador, de 30 a 80°C. Tras una incubación de 10 min, las alícuotas se enfriaron en hielo durante 10 min y atemperaron a temperatura ambiente durante 5 min. Por último, estos sobrenadantes se sometieron al ensayo colorimétrico con ABTS (buffer fosfato sódico/citrato pH 4,0 100 mM, ABTS 0,3 mM y H₂O₂ 2 mM). Los valores de termoestabilidad se calcularon según el ratio entre las actividades residuales incubadas a distintas temperaturas y el valor de actividad inicial a temperatura ambiente. El valor de T₅₀ se determina como el valor de temperatura al cual la proteína pierde el 50% de su actividad inicial tras una incubación de 30 minutos.

40

45

50

55

Producción de variantes recombinantes de UPO en *S. cerevisiae*

Una colonia independiente de *S. cerevisiae* que comprendía la correspondiente variante de la invención, por un lado JaWa y por otro lado SoLo, fue seleccionada de una placa de medio mínimo SC *drop-out* y se inoculó en 20 mL de medio mínimo SC líquido, cultivos que se incubaron durante 48 h a 30°C y 220 RPM. Se tomó una alícuota tal de este cultivo de manera que al inocularla en 100 mL de nuevo medio mínimo, la OD₆₀₀ tuviera un valor de 0,25. Este refresco se incubó hasta que se completaron dos ciclos de crecimiento completos (entre 6 y 8 h), momento en el cual se tomaron 100 mL de células para inocular 900 mL de medio de expresión en un matraz de

60

2.000 mL ($OD_{600}=0,1$). Este cultivo de cada clon se incubó a lo largo de 72 h a 25°C y a 220 RPM (cuando la actividad UPO era máxima; $OD_{600}=25-30$), se separaron las células por centrifugación (10 min a 4.500 RPM y 4°C) y el sobrenadante se filtró (con filtro de vidrio y de nitrocelulosa de 0,45 de tamaño de poro).

5 Purificación de variantes recombinantes de AaeUPO1

La purificación de las variantes descrita en la presente invención, JaWa y SoLo, se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio catiónico seguida de cromatografía de intercambio aniónico (AKTA purifier, GE Healthcare). El extracto crudo fue concentrado y dializado en buffer fosfato sódico/citrato pH 3,3 20 mM (buffer A) mediante ultrafiltración tangencial (Pellicon; Millipore, Temecula, CA, EEUU) a través de una membrana de un diámetro de poro de 10 kDa (Millipore) mediante una bomba peristáltica (Masterflex Easy Load; Cole-Parmer, Vernon Hills, IL). La muestra fue filtrada y cargada en una columna de intercambio catiónico fuerte (HiTrap SP FF, GE Healthcare), pre-equilibrada con buffer A. Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente lineal de 0 a 40% de buffer A con NaCl 1M en 60 mL y de 40 a 100% de buffer A con 1 M NaCl en 5 mL, a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones con actividad UPO fueron recuperadas, concentradas y dializadas en buffer Tris-HCl pH 7,8 20 mM (buffer B) y cargadas en una columna de alta resolución de intercambio aniónico (Biosuite Q, Waters), pre-equilibrada con buffer B. Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente lineal de 0 a 20% de buffer B con NaCl 1M en 40 mL y de 20 a 100% de buffer B con 1 M NaCl en 5 mL, a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones con actividad UPO fueron recuperadas, concentradas y dializadas en buffer fosfato potásico pH 7,0 10mM y almacenadas a 4°C. Se obtuvieron valores Reinheitszahl [Rz] [A_{418}/A_{280}] de ~2. Las fracciones de los distintos pasos de purificación fueron analizadas en un gel de acrilamida al 12% SDS/PAGE, teñido con azul Coomassie. Las concentraciones de los extractos crudos de estos pasos fueron determinadas mediante el empleo del reactivo de Bradford y BSA como estándar.

Valores de constantes cinéticas

Las constantes cinéticas de las variantes de la invención, AaeUPO, PaDa-I, JaWa y SoLo, para ABTS se estimaron en buffer fosfato sódico/citrato pH 4,0 100 mM y H_2O_2 2 mM; y para el resto de los sustratos, en buffer fosfato potásico pH 7,0 100 mM y H_2O_2 2 mM (propranolol). Para H_2O_2 se utiliza alcohol bencílico como sustrato a las correspondientes condiciones de saturación. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y las oxidaciones de los sustratos se siguieron por cambios espectrofotométricos (ABTS: $\epsilon_{418}=36.000 M^{-1} cm^{-1}$; Propranolol: $\epsilon_{325}: 1.996 M^{-1} cm^{-1}$ y alcohol bencílico: $\epsilon_{280}=1.400 M^{-1} cm^{-1}$). Las cinéticas para propranolol se realizaron calculando el ϵ_{325} experimentalmente a pH 7,0. Para calcular los valores de K_m y k_{cat} , se representaron los valores de V_{max} frente a las concentraciones de sustrato y se realizó un ajuste a la función de hipérbola (con SigmaPlot 10.0, donde el parámetro a es equivale a k_{cat} y el parámetro b, a K_m).

35 Análisis por HPLC

Se realizó el análisis de las reacciones mediante cromatografía en fase reversa (HPLC). El equipo está formado por una bomba terciaria (Varian-Agilent Technologies, EEUU) acoplada a un autosampler (Merck Millipore, MA, EEUU); para la separación se utilizó una columna Zorbax Eclipse plus C18 (15 cm x 4,6 cm) a 40°C y la detección se llevó a cabo mediante el uso de un detector de fotodiodeo (PDA) (Varian, Agilent Technologies, EEUU). La fase móvil seleccionada fue un gradiente desde 10% metanol y 90% ddH_2O (en ambos casos con un 0,1% de ácido acético) hasta 90% metanol y 10% ddH_2O a un flujo de 0,8 mL/min. La reacción se cuantificó a 280 nm (basado en estándares de HPLC). Para la reacción de 15 min, la mezcla contuvo 0,03 μM de enzima pura, propranolol 4 mM, y H_2O_2 2 mM en buffer fosfato potásico pH 7,0 50 mM (0,5 mL de volumen final). La reacción se inició con la adición de H_2O_2 y se paró con 20 μL of HCl 37%. Para la determinación de los *turnover rates* o tasa de recambio de las variantes con 5'-hidroxipropranolol (producto de interés) la mezcla contuvo 0,03 μM de enzima pura, 5-hidroxipropranolol 0,4 mM, y H_2O_2 2 mM en buffer fosfato potásico pH 7,0 50 mM (0,3 mL de volumen final). Para el cálculo del *total turnover number* (TTN) o número de recambio total de las variantes ensayadas, el ensayo se llevó a cabo con 0,03 μM de enzima pura, propranolol 5 mM, y H_2O_2 2 mM en buffer fosfato potásico pH 7,0 50 mM y de la misma manera pero además con ácido ascórbico 4 mM. En ambos casos se añadía H_2O_2 2 mM cada 10 min, monitorizando la reacción en cada punto de adición tomando distintas alícuotas. Las desviaciones estándar resultaron menos del 5% en todos los casos.

Análisis por Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas (LC/MS)

Para la realización de estos análisis se empleó un espectrómetro de masas con analizador híbrido Q-TOF (QSTAR, ABSciex, MA, EEUU). Como fuente de ionización se utilizó electrospray (ESI), y como fase ionizante, metanol. El sistema de entrada en este caso fue inyección directa en un HPLC 1100 (Agilent Technologies, EEUU). La resolución del ensayo corresponde a 9.000 FWHM (*Full Width at Half Maximum*), la exactitud a 5-10 ppm y se realizó en modo positivo.

60 RESULTADOS

Mediante el ensayo de la 4-AAP se evaluó la actividad de las diferentes variantes de UPOs para determinar cuál podía ser el punto de partida más adecuado para determinar la capacidad de dichas variantes para la síntesis de HDMs (Figura 9). Como se observa en la figura, la variante que presentaba mayor actividad frente al propranolol

y mejor ratio entre su actividad sin y con ascórbico, era JaWa (SEQ ID NO: 24, codificada por la SEQ ID NO: 23), por lo que fue el mutante seleccionado para los ensayos de acoplamiento (**Figura 10**). A partir de estos resultados, donde se observó que el sustrato interaccionaba con una serie de residuos del bolsillo catalítico y del canal de acceso al hemo, se seleccionó una zona del mutante JaWa que tenía contacto directo con el sustrato (residuos D187-V248 de la SEQ ID NO: 24). El objetivo es el de obtener una enzima mutante o variante que muestre una menor actividad peroxidasa sobre el 5'-hidroxipropranolol (que es el producto de la reacción con propranolol) a la vez que se potencia la actividad peroxigenasa sobre el propranolol, teniendo en cuenta además que dicha variante debe expresarse de forma robusta en organismos heterólogos y secretarse en forma activa, soluble y muy estable. Para ello, cada variante obtenida en las librerías de mutantes fue sometida a un doble *screening* diseñado *ad-hoc* cuya finalidad es la obtención de las variantes que poseen las capacidades arriba indicadas, una mayor actividad peroxigenasa frente a propranolol (medidas en presencia de ácido ascórbico) y una menor actividad peroxidasa frente a 5'-hidroxipropranolol (en ausencia de ácido ascórbico).

Se analizaron dos librerías con diferentes tasas mutagénicas (concentración de $MnCl_2$), identificando un único mutante en ambas librerías y de manera repetitiva al que se denominó SoLo y que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 41 que codifica para la variante de SEQ ID NO: 42. Dicho mutante SoLo (SEQ ID NO: 42) posee la mutación F191S (**Figura 11**) respecto al mutante JaWa de SEQ ID NO: 24, con una actividad peroxigenasa en microplaca un 30% superior a su parental (JaWa) y una disminución de la actividad peroxidasa de más de dos veces.

Se realizaron dos ciclos más de evolución (2G y 3G) utilizando a la variante SoLo (SEQ ID NO: 41) como parental en los cuales no se detectó ninguna variante mejorada.

Ambas variantes, JaWa (SEQ ID NO: 24) y SoLo (SEQ ID NO: 42), fueron producidas, purificadas a homogeneidad (valor Reinheitszahl [Rz] $[A_{418}/A_{280}] \sim 2$) y bioquímicamente caracterizadas.

Tal y como se observa en la **Figura 12**, la variante SoLo de SEQ ID NO: 42 mostró una termoestabilidad cinética muy similar a la del mutante JaWa (SEQ ID NO: 24).

La reacción de transformación del propranolol llevada a cabo por la enzima silvestre AaeUPO (SEQ ID NO: 2), y los mutantes PaDa-I (SEQ ID NO: 18), JaWa (SEQ ID NO: 24) y SoLo (SEQ ID NO: 42) en ausencia de ácido ascórbico y que fue analizada mediante HPLC-PDA se recoge en la **Figura 13**. Se puede observar que tanto JaWa como SoLo son aquellos que mayor cantidad de 5'-hidroxipropranolol producen, además de poseer una regioselectividad del 99% ya que no se detectaron trazas ni de 4'-hidroxipropranolol ni de N-desisopropil propranolol (DYP).

Se determinaron los valores cinéticos de AaeUPO, JaWa y SoLo para propranolol además de para ABTS y H_2O_2 (**Tabla 3**).

Tabla 3. Parámetros cinéticos para las variantes de la invención y para la AaeUPO silvestre.

Sustrato	Constantes cinéticas	AaeUPO1	PaDa-I	JaWa	SoLo
ABTS	K _m (μM)	25,0±2.5	48,8±4.5	181±22	568±91
	K _{cat} (S ⁻¹)	221±6	395±13	125±5	365±23
	K _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)	8,8x10 ⁶ ±6,9x10 ⁵	8,2x10 ⁶ ±6,0x10 ⁵	6,9x10 ⁵ ±6,3x10 ⁴	6,4x10 ⁵ ±6,7x10 ⁴
Propranolol	K _m (μM)	2.239±333	2.268±220	244±92	391±97
	K _{cat} (S ⁻¹)	150±12	212±11	765±76	497±35
	K _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)	6,7x10 ⁴ ±4,8x10 ³	9,3x10 ⁴ ±4,3x10 ³	3,1x10 ⁶ ±0,9x10 ⁵	1,3x10 ⁶ ±0,2x10 ⁵
Naftaleno	K _m (μM)	156±20	578±106	127±27	789±96
	K _{cat} (S ⁻¹)	92±3	229±17	78±3	337±20
	K _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)	5,9x10 ⁵ ±5,9x10 ⁴	4,0x10 ⁵ ±4,0x10 ⁴	6,2x10 ⁵ ±1,1x10 ⁴	4,3x10 ⁵ ±2,8x10 ⁴
H ₂ O ₂	K _m (μM)	1.370±162	486±55	1.250±153	1.430±153
	K _{cat} (S ⁻¹)	290±15	238±8	446±23	446±23
	K _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)	2,1x10 ⁵ ±1,5x10 ⁴	5,0x10 ⁵ ±4,2x10 ⁴	3,1x10 ⁵ ±1,8x10 ⁴	3,1x10 ⁵ ±1,8x10 ⁴

Tal y como se observa en la **Tabla 3**, tanto las variantes JaWa (SEQ ID NO: 24) como SoLo (SEQ ID NO: 42) aumentaron en dos órdenes de magnitud los valores de k_{cat}/K_m (eficiencia catalítica) para el propranolol. Se puede observar además como las variantes JaWa (SEQ ID NO: 24) y SoLo (SEQ ID NO: 42) presentan una disminución de la actividad peroxidasa, medida con ABTS, de un orden de magnitud en la eficiencia catalítica, siendo la afinidad por el sustrato, en el caso de la variante SoLo, tres veces peor respecto a su parental. Los valores para H_2O_2 con alcohol bencílico no resultaron afectados. Al igual que sucede en el caso del propranolol entre JaWa y SoLo, JaWa posee unas constantes cinéticas similares a AaeUPO con el naftaleno como sustrato, diferenciándose en los valores de recambio total que son superiores para JaWa.

Debido a que las cinéticas con propranolol de las variantes JaWa y SoLo son muy similares, se calcularon los *turnover rates* (tasas de recambio) con 5'-hidroxipropranolol como sustrato en ausencia de ácido ascórbico, para

5 evaluar así la actividad peroxidasa de cada variante sobre su producto de reacción del propranolol. En la **Figura 14**, se observa como JaWa y AaeUPO oxidan prácticamente la totalidad del producto, pero SoLo es capaz de mantener aproximadamente un 50% del mismo sin oxidar. De ello se deduce que la variante SoLo (SEQ ID NO: 42), ha disminuido su actividad peroxidasa sobre su propio producto de una manera llamativa, permitiendo unos mejores rendimientos en la producción de este metabolito del propranolol.

10 Cuando se realizó el seguimiento de la reacción a tiempos largos con la adición de 2 mM de H₂O₂, se determinaron los valores totales de recambio (*total turnover numbers* -TTNs-), obteniendo un valor de 45.000 para SoLo, 15.000 para JaWa y 3.000 para AaeUPO en ausencia de ácido ascórbico; y en presencia de ácido ascórbico, 62.000 para SoLo, 48.000 para JaWa y 14.000 para AaeUPO (**Tabla 4**). Esto implica que incluso añadiendo ácido ascórbico a la reacción, es posible la independencia del uso de este antioxidante en el medio de reacción, simplificando el proceso. (**Figura 15**).

15 **Tabla 4.** Determinación de los valores totales de recambio (TTNs) para las variantes de la invención y para la AaeUPO silvestre.

	TTNs	
	Con ácido ascórbico	Sin ácido ascórbico
AaeUPO	14.000	3.000
JaWa	48.000	15.000
SoLo	62.000	45.000

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad peroxigenasa caracterizado por que la secuencia aminoacídica del polipéptido que codifica presenta una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO: 2 (*AaeUPO1*), y por que comprende al menos dos alteraciones aminoacídicas en las posiciones homólogas a las posiciones 241 y 257 de dicha secuencia, que sustituyen los aminoácidos: glicina (G) original por ácido aspártico (D) en la posición 241 (mutación G241D) y arginina (R) original por lisina (K) en la posición 257 (mutación R257K).
- 10 2. Polinucleótido según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende además una alteración aminoacídica en la posición homóloga a la posición 191 de dicha secuencia SEQ ID NO: 2, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por serina (S) (F191S).
- 15 3. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que su secuencia aminoacídica posee además al menos una de las siguientes mutaciones adicionales o cualesquiera de sus combinaciones:
 - 20 a) La sustitución del aminoácido leucina (L) original por el aminoácido fenilalanina (F) en la posición homóloga a la posición 67 de la SEQ ID NO: 2 (mutación L67F),
 - b) La sustitución del aminoácido isoleucina (I) original por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 248 de la SEQ ID NO: 2 (mutación I248V),
 - c) La sustitución del aminoácido fenilalanina (F) original por el aminoácido leucina (L) en la posición homóloga a la posición 311 de la SEQ ID NO: 2 (mutación F311L),
 - 25 d) La sustitución del aminoácido valina (V) original por el aminoácido isoleucina (I) en la posición homóloga a la posición 75 de la SEQ ID NO: 2 (mutación V75I) y
 - e) La sustitución del aminoácido valina (V) original por el aminoácido alanina (A) en la posición homóloga a la posición 57 de la SEQ ID NO: 2 (mutación V57A).
- 30 4. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que posee además la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal de SEQ ID NO: 26.
- 35 5. Polinucleótido según la reivindicación 4 caracterizado por que la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal de SEQ ID NO: 26 comprende al menos una de las siguientes mutaciones o cualesquiera de sus combinaciones:
 - 40 a) La sustitución del aminoácido fenilalanina (F) original por el aminoácido tirosina (Y) en la posición homóloga a la posición 12 de SEQ ID NO: 26 (F[12]Y),
 - b) La sustitución del aminoácido alanina (A) original por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 14 de SEQ ID NO: 26 (A[14]V),
 - c) La sustitución del aminoácido arginina (R) original por el aminoácido glicina (G) en la posición homóloga a la posición 15 de SEQ ID NO: 26 (R[15]G) y
 - d) La sustitución del aminoácido alanina (A) original por el aminoácido ácido aspártico (D) en la posición homóloga a la posición 21 de SEQ ID NO: 26 (A[21]D).
- 45 6. Polinucleótido según las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado por que su secuencia se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 37.
- 50 7. Polipéptido caracterizado por que es codificado por cualquiera de las secuencias nucleotídicas según las reivindicaciones 1 a 6.
- 55 8. Polipéptido según la reivindicación 7 caracterizado por que su secuencia se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 42.
- 60 9. Método de obtención del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
 - i. Introducir un vector con el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en una célula hospedadora adecuada,
 - ii. Cultivar la célula hospedadora en un medio adecuado, y,
 - iii. Purificar el polipéptido sintetizado.
10. Célula hospedadora caracterizada por que comprende el polinucleótido según las reivindicaciones 1 a 6 y es capaz de producir el polipéptido según las reivindicaciones 7 a 8, preferiblemente la célula hospedadora es una levadura o un hongo.

- 5
11. Célula hospedadora según la reivindicación 10 caracterizada por que la levadura pertenece al género *Saccharomyces* sp o *Pichia* sp, particularmente las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* o la célula hospedadora es un hongo que pertenece al género *Aspergillus* sp, particularmente las especies *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus sojae*.
12. Kit que comprende al menos un polipéptido según las reivindicaciones 7 a 8.
- 10
13. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, de la célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11 o del kit o del dispositivo electrónico según la reivindicación 12, en procesos de síntesis orgánica, en procesos de biorremediación, en la elaboración de composiciones farmacéuticas, alimenticias y/o cosméticas o en la elaboración de dispositivos electrónicos que contienen enzimas inmovilizadas.
- 15
14. Uso según la reivindicación 13 donde el proceso de síntesis orgánica es un procedimiento de oxifuncionalización de hidrocarburos, donde los hidrocarburos se seleccionan de entre cualquiera de la siguiente lista que consiste en: hidrocarburos aromáticos, alifáticos, lineales, ramificados y cíclicos.
- 20
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 donde el proceso de síntesis orgánica se selecciona de la lista que consiste en: proceso de hidroxilación para la síntesis de 1-naftol y/o 5'-hidroxipropranolol.

FIG. 1

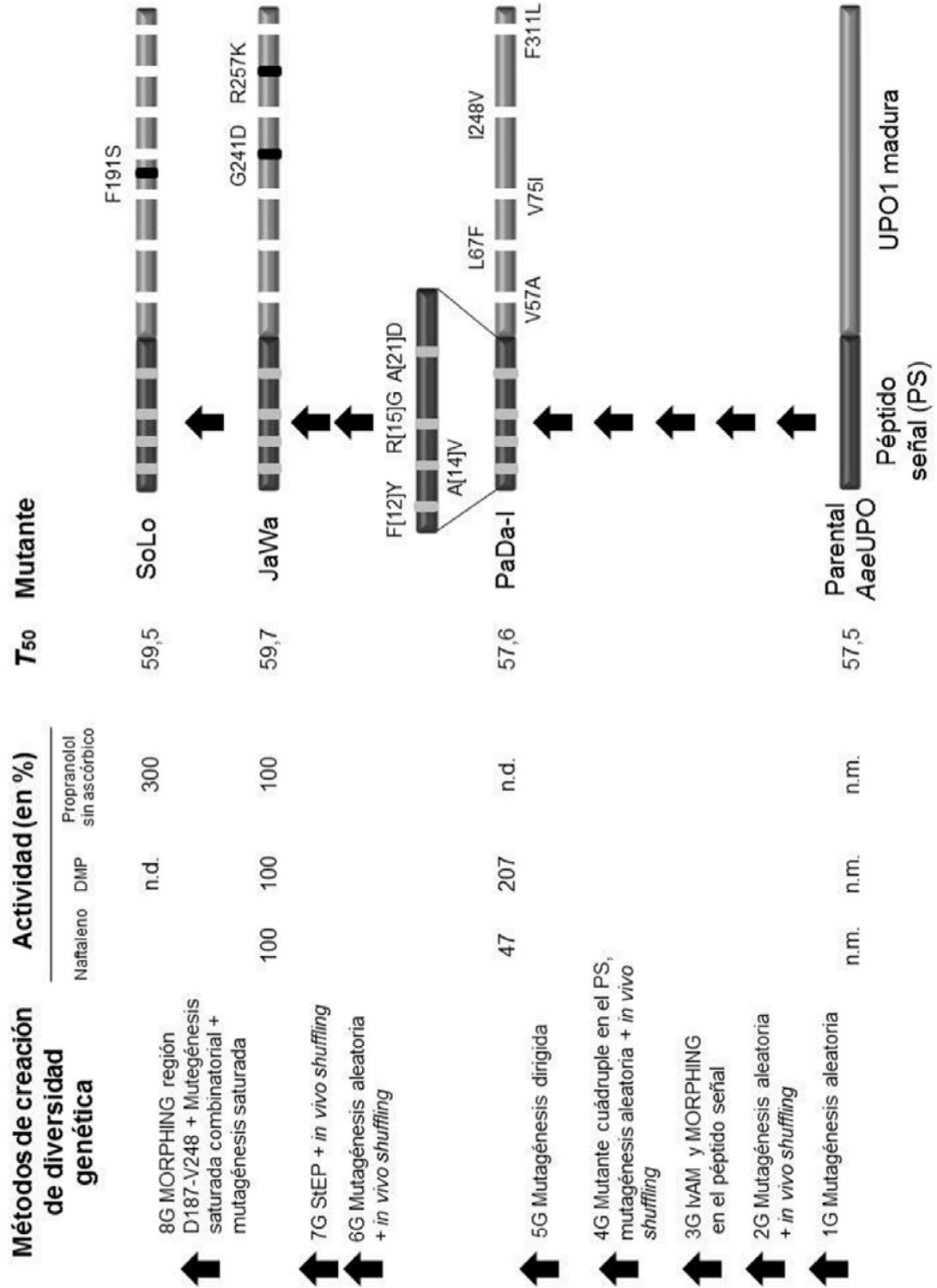


FIG. 2

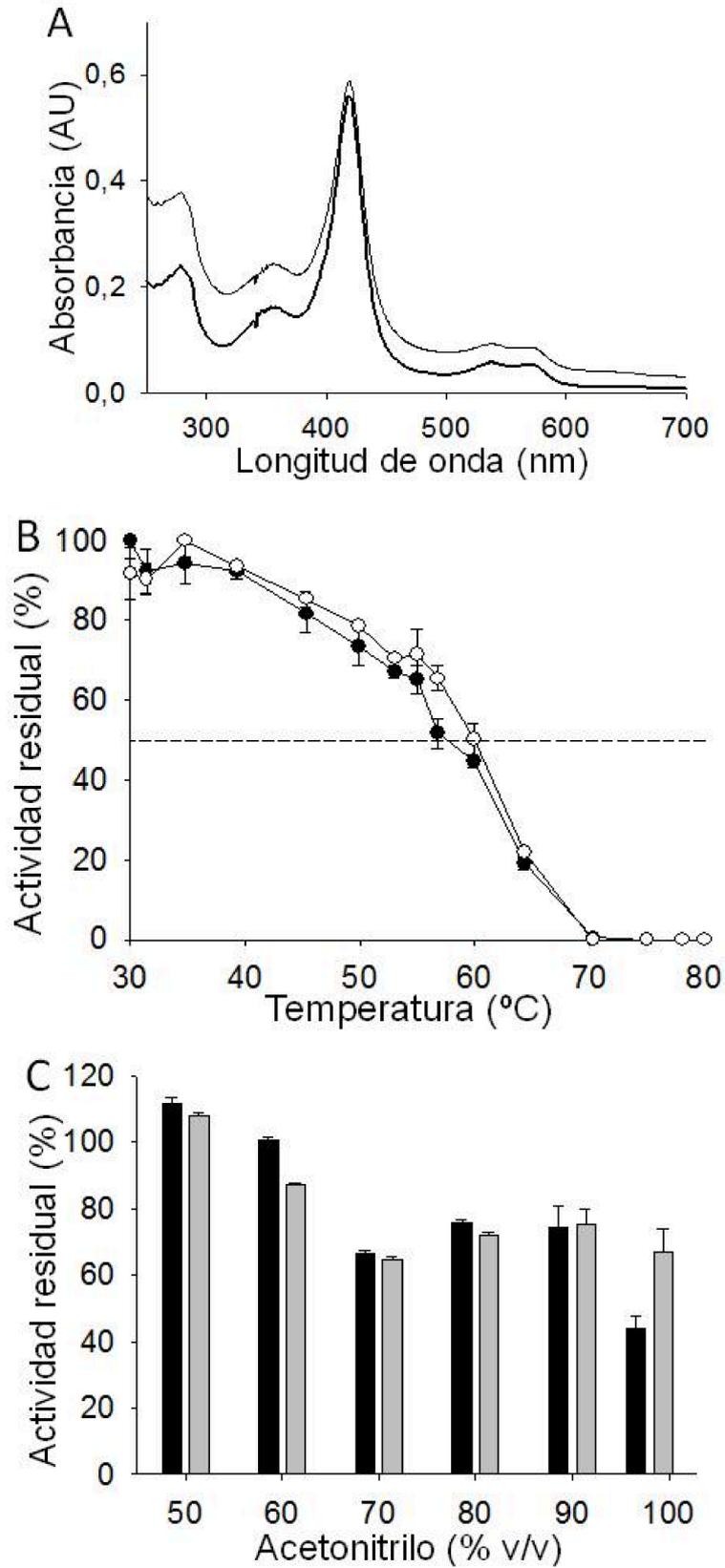


FIG. 3

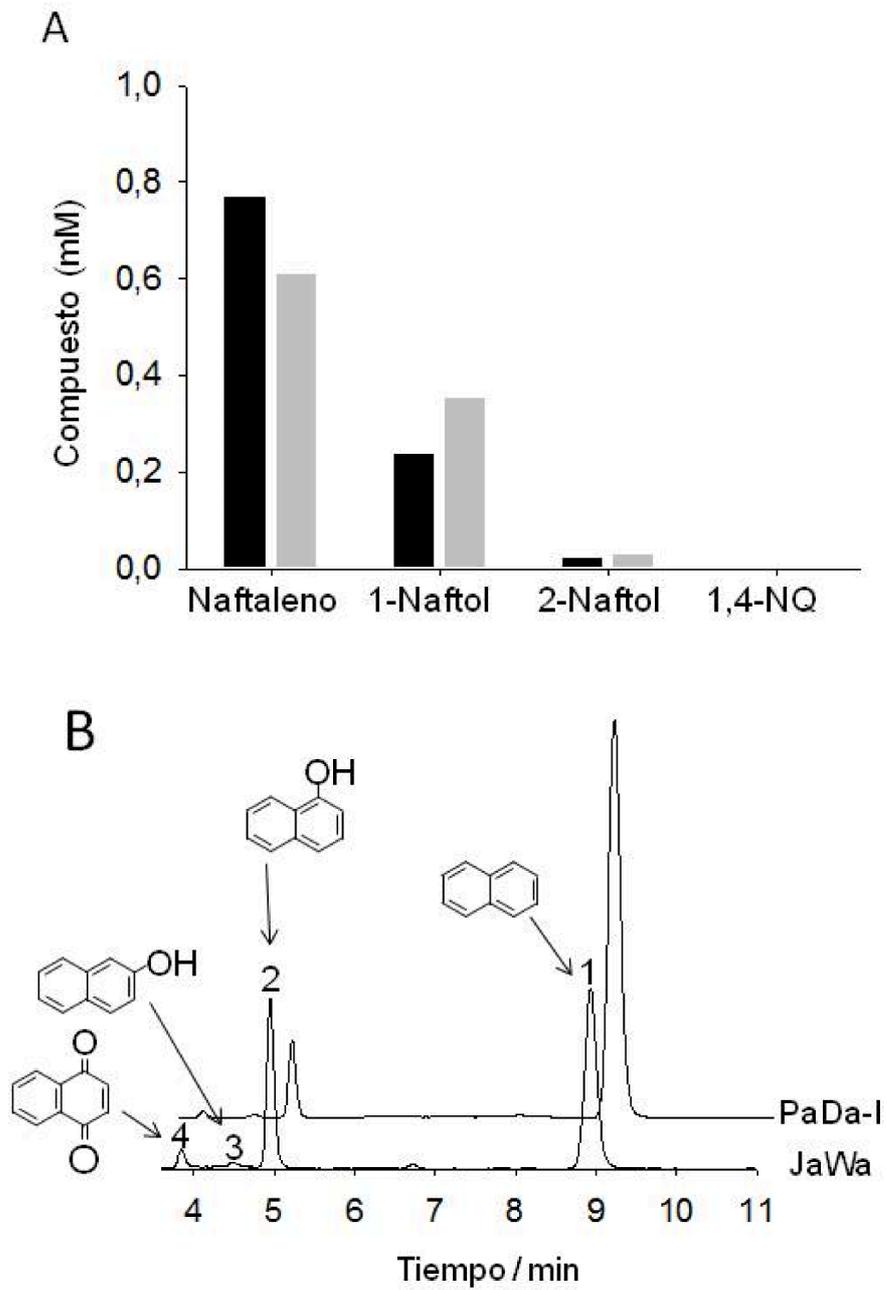
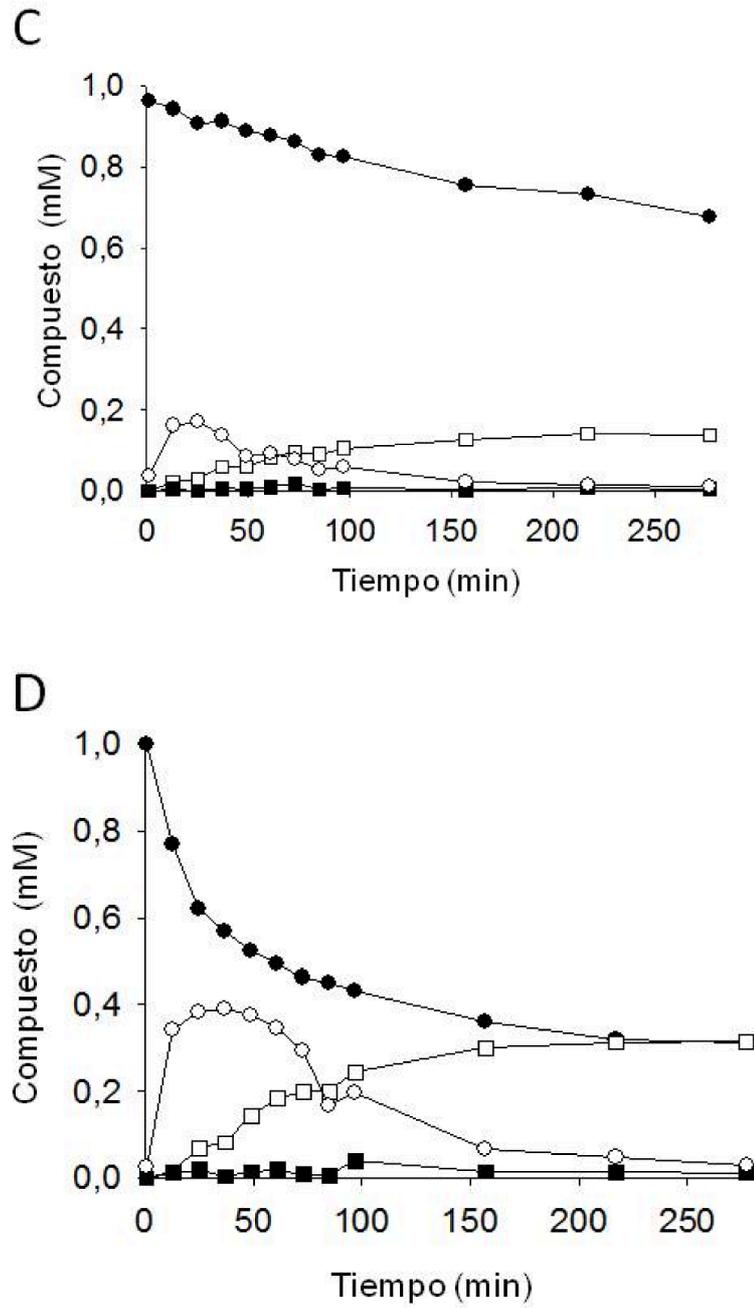


FIG. 3 (cont.)



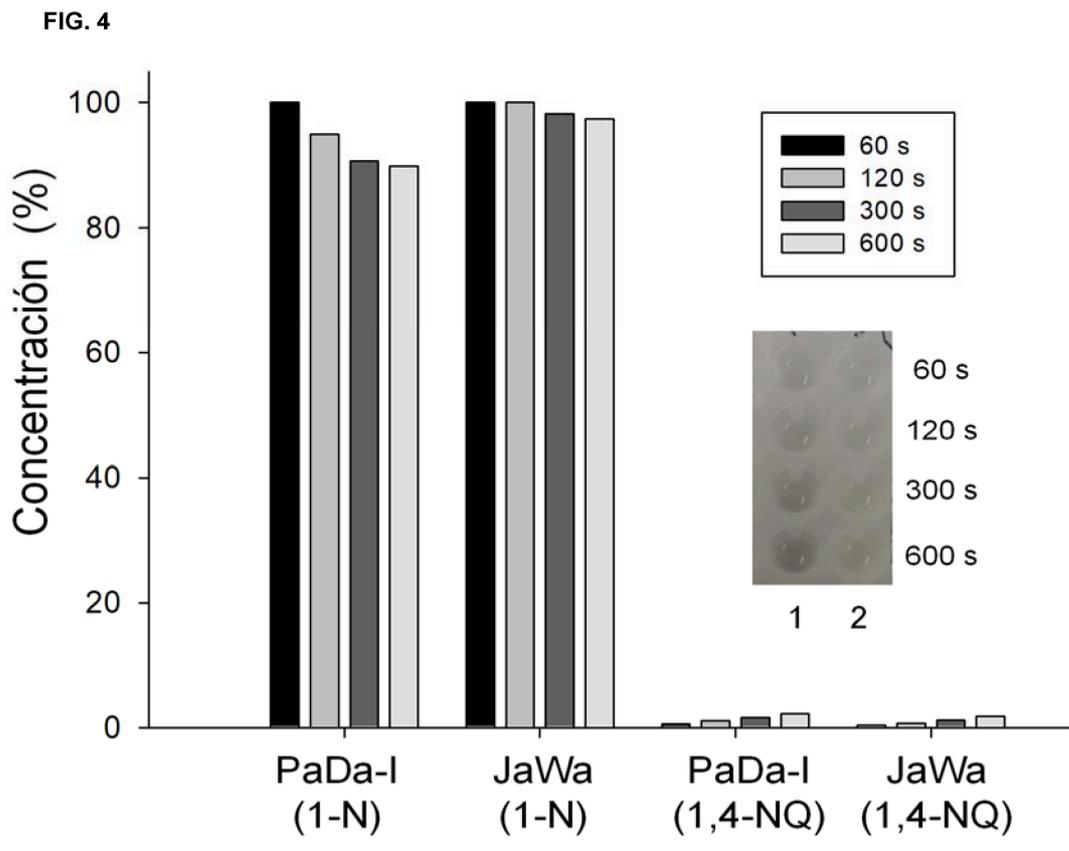


FIG. 5

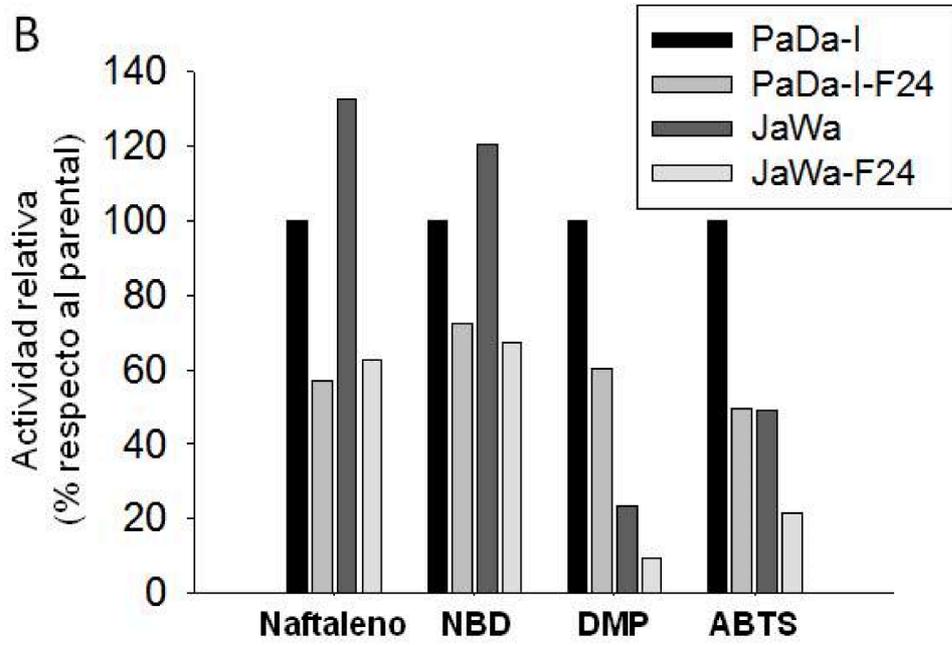
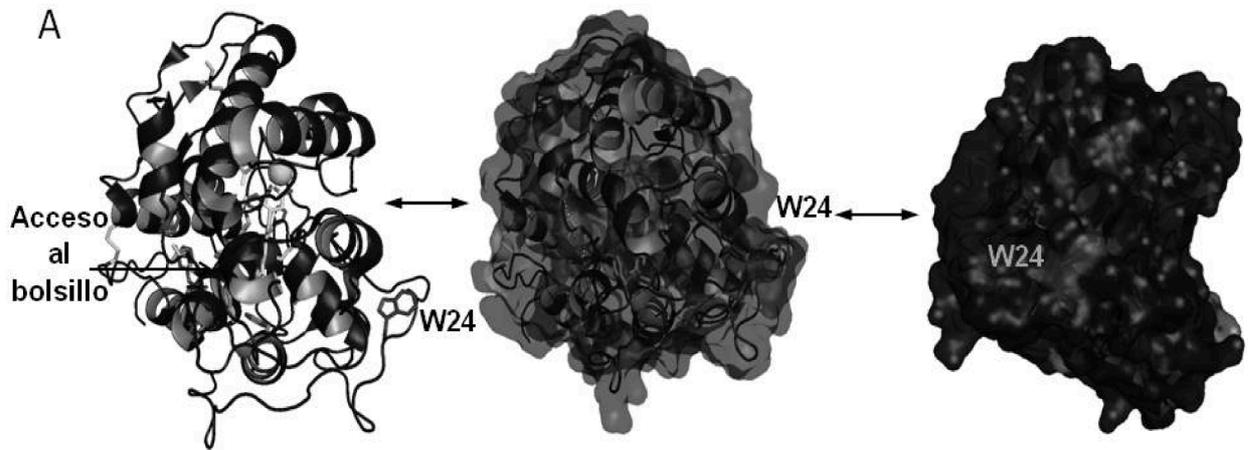


FIG. 6

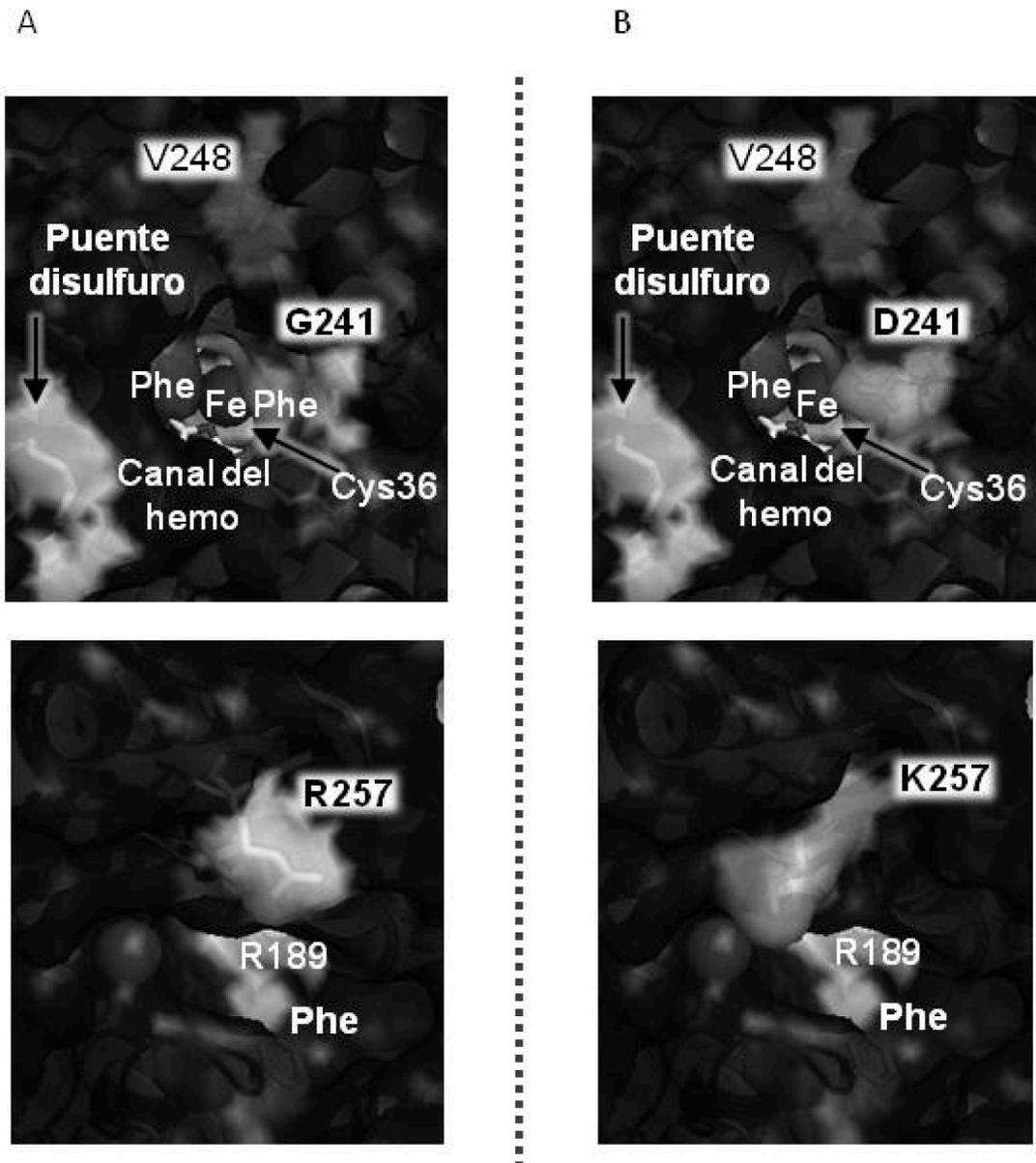
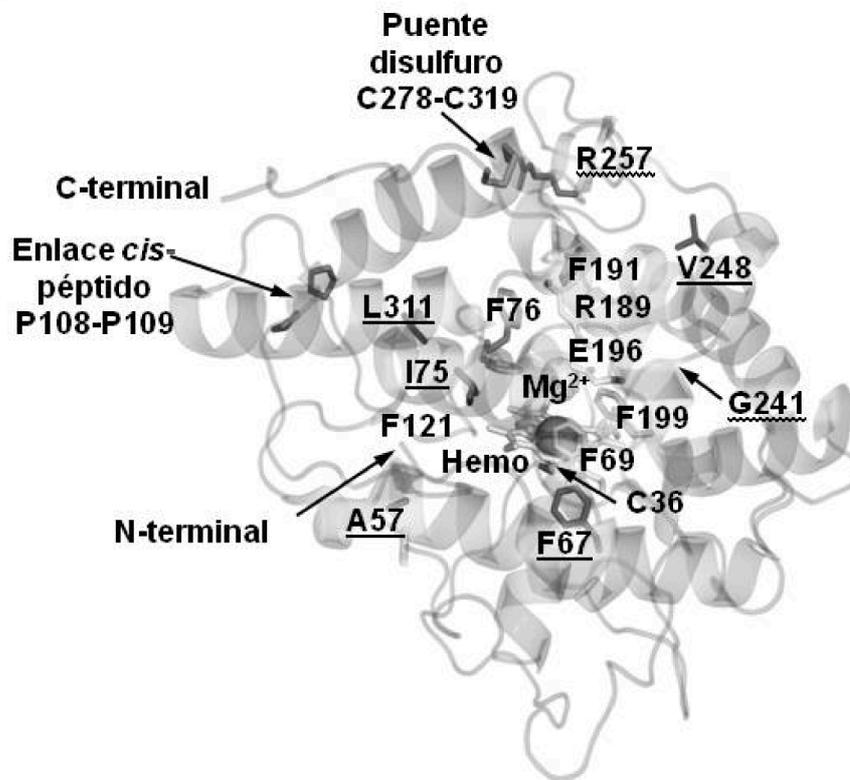


FIG. 7

A



B

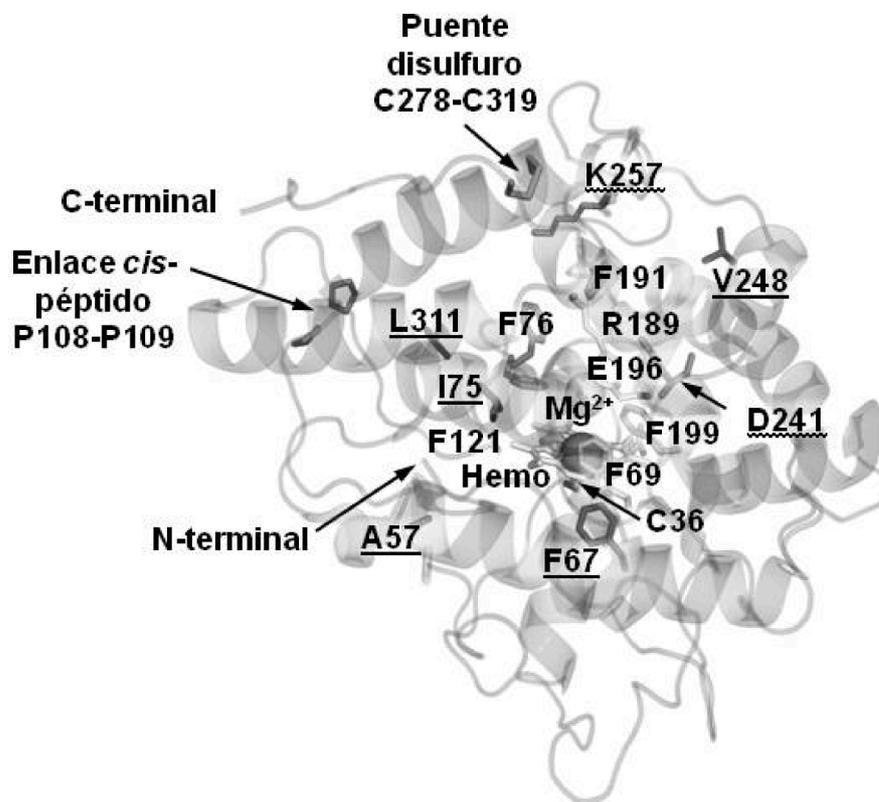


FIG. 8

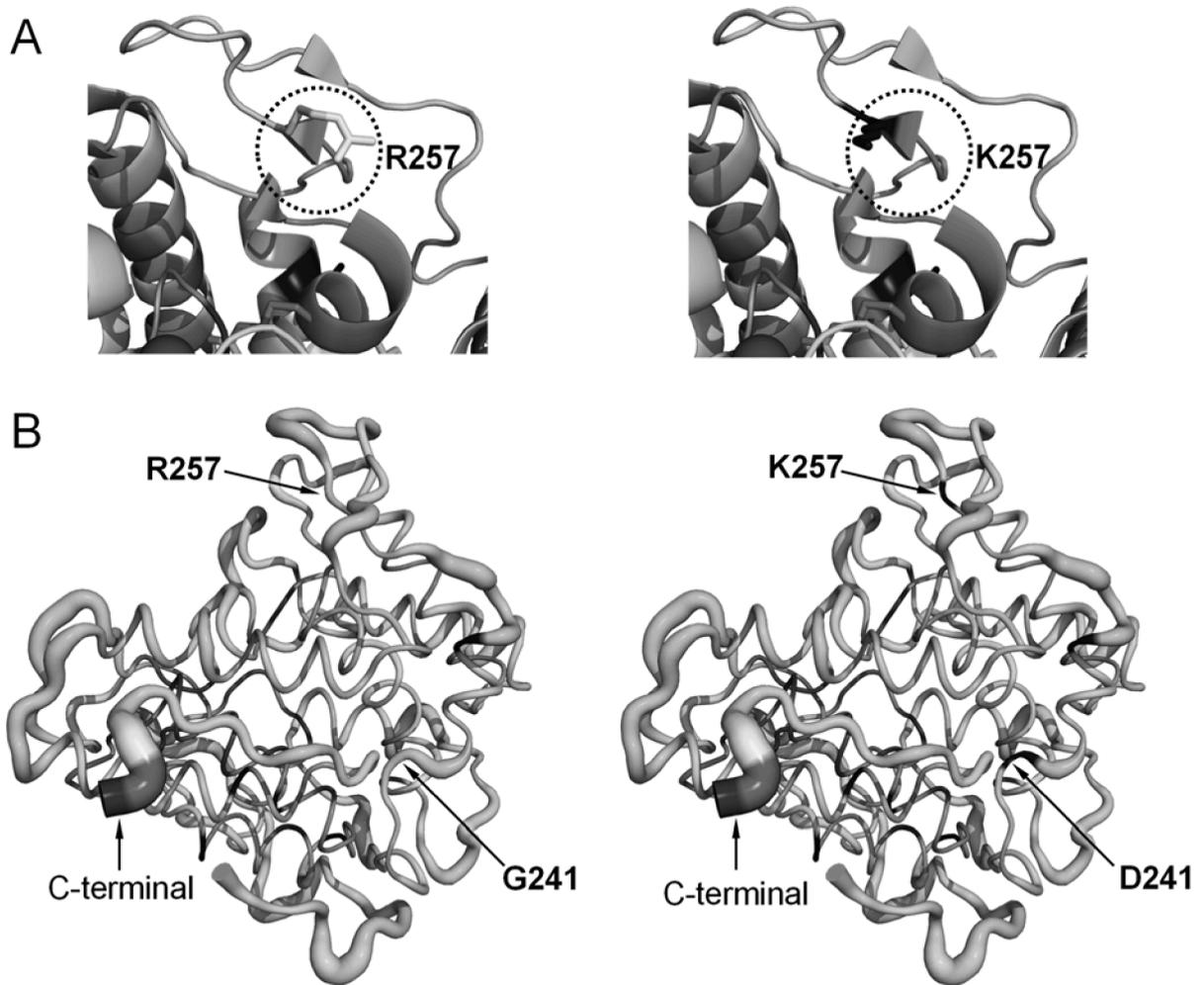


FIG. 9

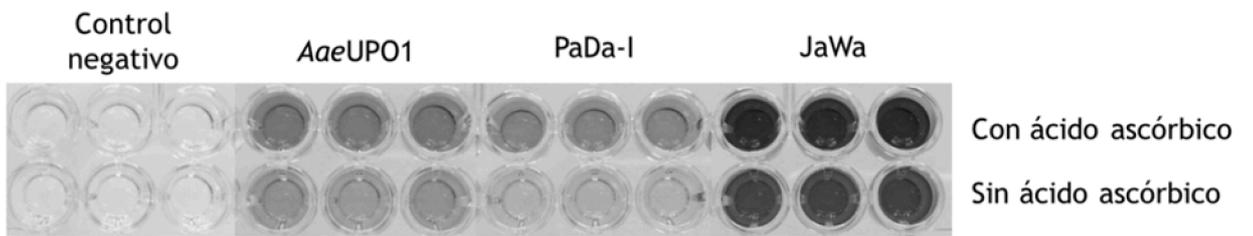


FIG. 10

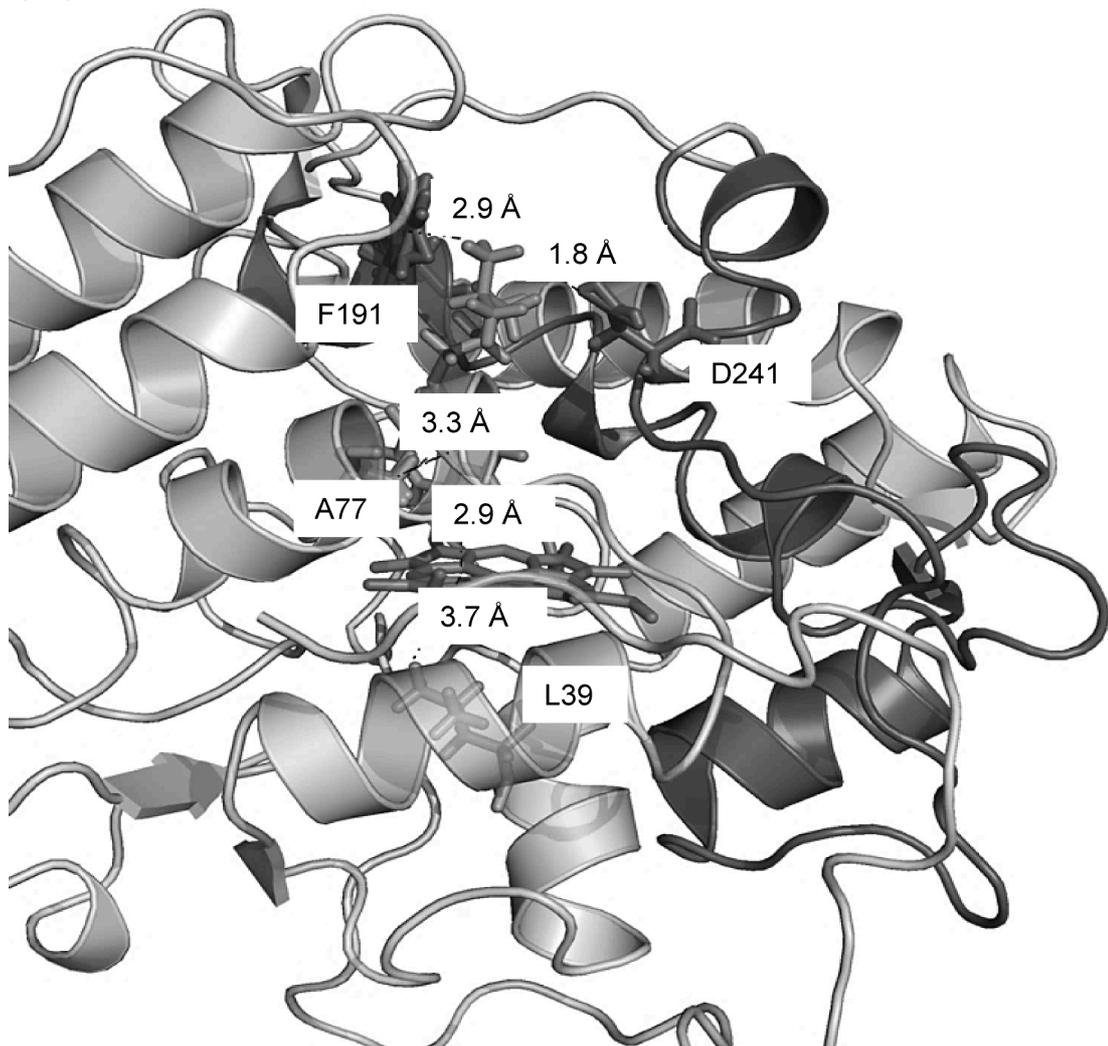


FIG. 11

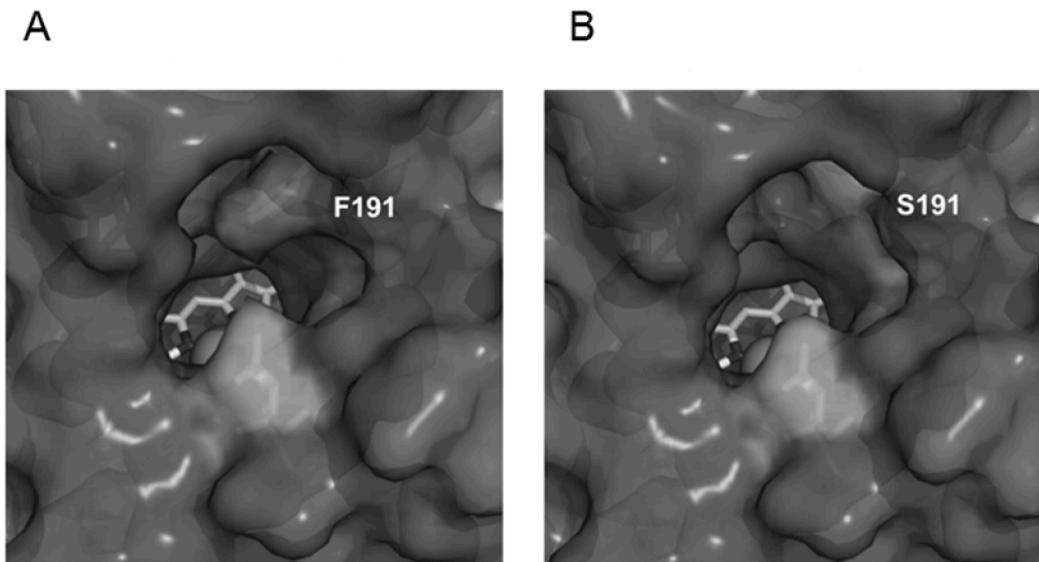


FIG. 12

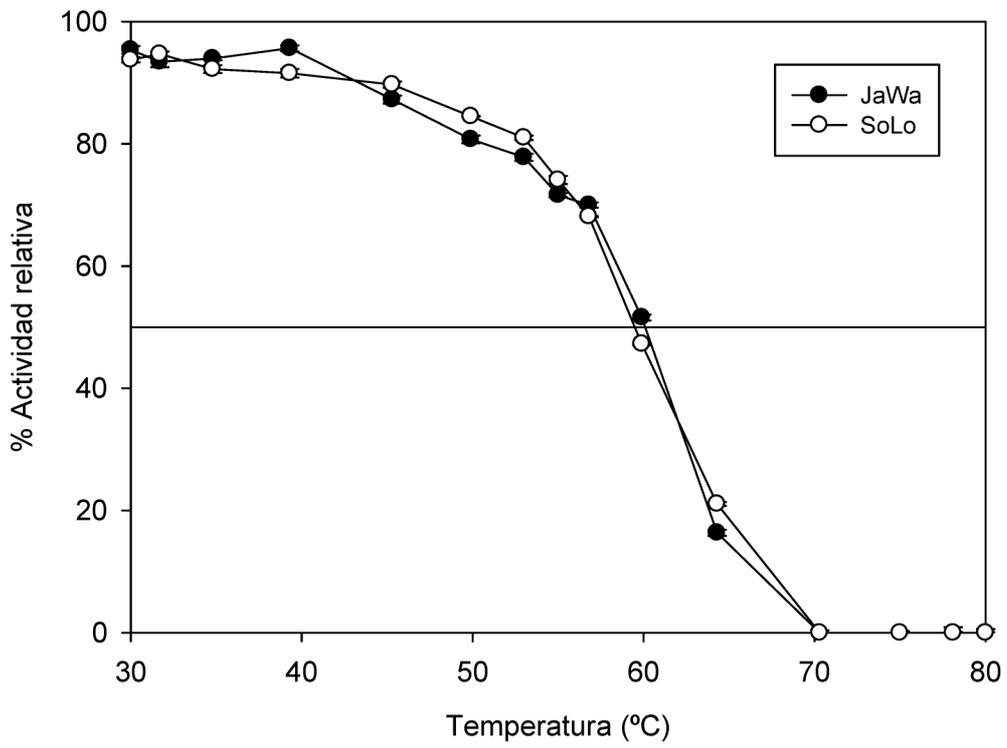


FIG. 13

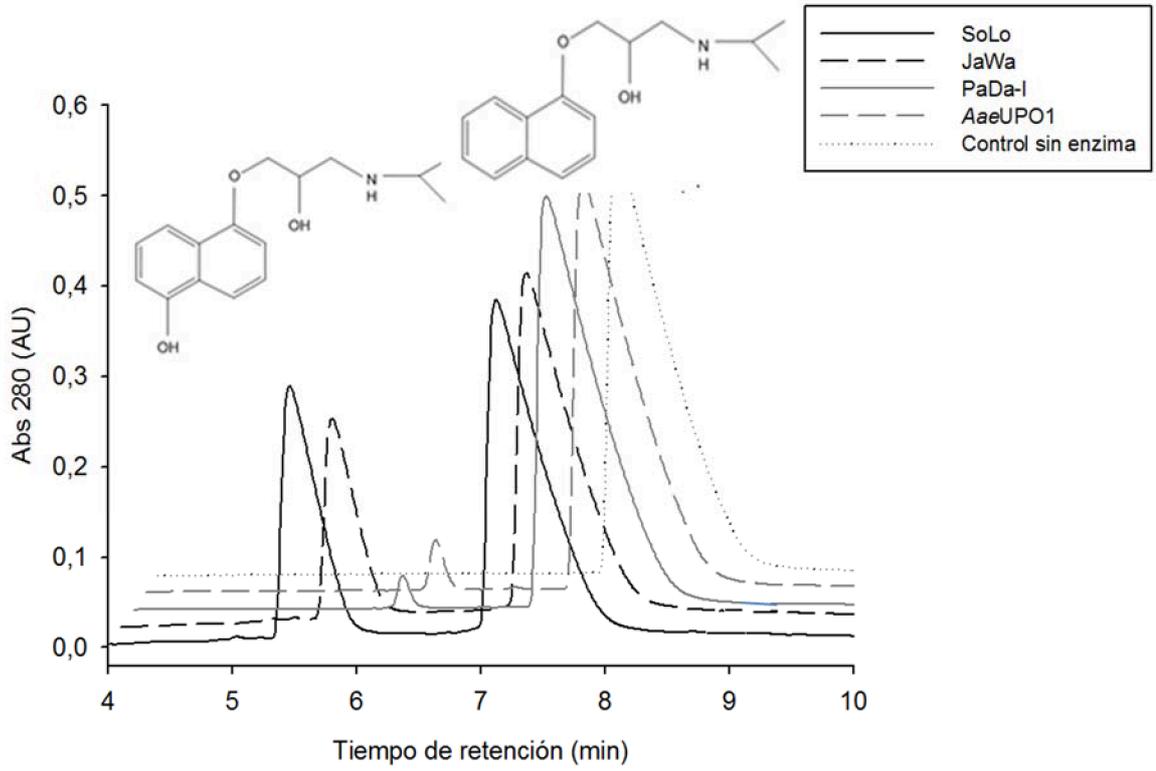


FIG. 14

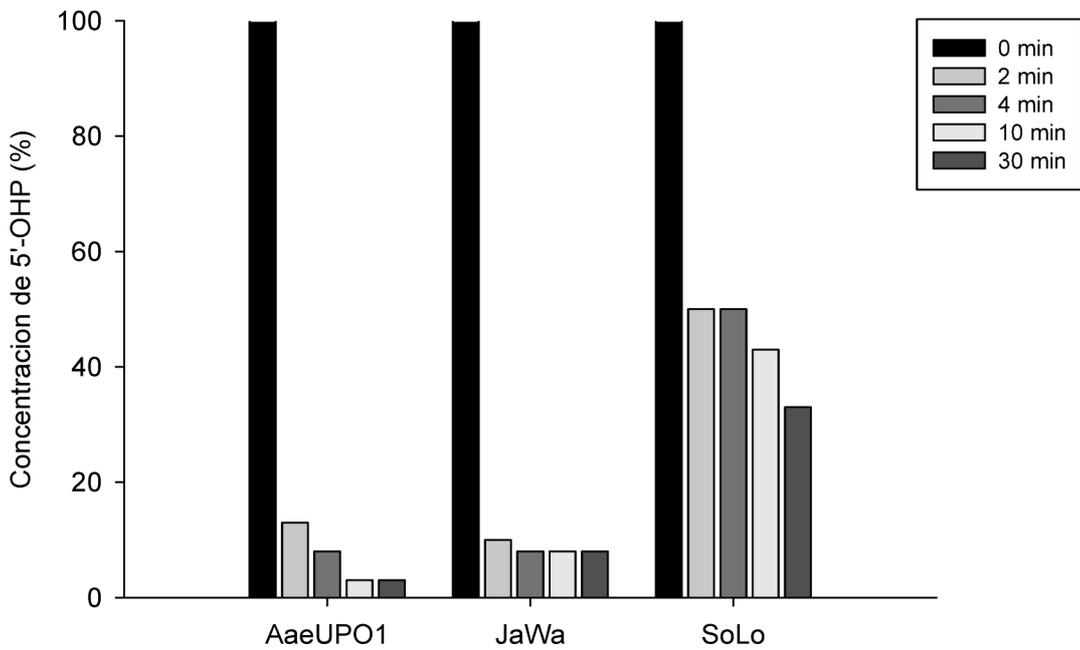


FIG. 15

