



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 320 505**

② Número de solicitud: 200600663

⑤ Int. Cl.:
C12P 13/22 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12R 1/05 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **15.03.2006**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **22.05.2009**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.05.2009

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta, s/n
Edificio Convalecencia
30001 Murcia, ES

⑦ Inventor/es: **Sánchez Amat, Antonio;**
Solano Muñoz, Francisco y
Hernández Romero, Diana

⑦ Agente: **Temño Cenicerros, Ignacio**

⑤ Título: **Procedimiento de obtención de L-dopa a partir de L-tirosina utilizando la enzima tirosinasa NP_518458 de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de obtención de L-dopa a partir de L-tirosina utilizando la enzima tirosinasa NP_518458 de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (a partir de ahora L-dopa) a partir de L-tirosina, utilizando como catalizador una enzima tirosinasa obtenida a partir de un microorganismo, concretamente la tirosinasa NP_518458 obtenida de la bacteria *Ralstonia solanacearum*. El procedimiento propuesto por la presente invención, permite la acumulación de todo el L-dopa formado, evitando la desventaja de la oxidación no deseada del L-dopa que se va formando y, por tanto, la pérdida de producto que se produce con el uso de otras tirosinasas descritas en el Estado de la Técnica.

ES 2 320 505 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de L-dopa a partir de L-tirosina utilizando la enzima tirosinasa NP_518458 de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (a partir de ahora L-dopa) a partir de L-tirosina, utilizando como catalizador una enzima tirosinasa obtenida a partir de un microorganismo, concretamente la tirosinasa NP_518458 obtenida de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.

Estado de la técnica

La 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (a partir de ahora L-dopa) se utiliza para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Se sabe que el L-dopa está presente en la cáscara y en las semillas de la planta *Vicia faba*, haba de donde se puede obtener por extracción. El L-dopa se puede obtener por síntesis a partir de productos intermedios como la vainillina y la tirosina.

El L-dopa también se produce bioquímicamente utilizando L-tirosina y tirosinasa, o con otros sustratos y β -tirosinasa producida por un microorganismo como se describe después. La L-tirosina es uno de los aminoácidos esenciales y se produce a escala comercial por extracción de sustancias naturales y enzimáticamente.

Katsuji Haneda, Shiro Watanabe, y Isao Takeda son los autores de "Synthesis of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine from L-Tyrosine by Microorganisms" publicado en *Applied Microbiology*, 22, 721-722 (1971) en el que describen que L-dopa puede ser sintetizada eficientemente a partir de L-tirosina en condiciones ácidas (pH de 2 a 5) a partir de especies de hongos *Aspergillus*, concretamente la *A. chevalier* y la *A. oryzae* sin necesidad de cofactores, mientras que a un pH neutro o alcalino, la L-tirosina se descompone en otros metabolitos y el L-dopa no se acumula.

En la patente GB 1268721 (Ajinomoto Co., Inc.), publicada el 29 de marzo de 1972, se describe un proceso para producir L-dopa o sus derivados, que comprende la reacción de catecol y uno o más aminoácidos seleccionados entre cisteína, S-alquil_p-cisteína (donde alquil_p significa un grupo alquilo pequeño, con uno o dos átomos de carbono, normalmente metil o etil), cistina, serina y alanina, y/o una sal de dichos aminoácidos, en un medio acuoso en presencia de β -tirosinasa como catalizador; dicha beta-tirosinasa se produjo por cultivo de uno de los microorganismos seleccionado entre los género siguientes: *Escherichia*, *Aerobacter*, *Erwinia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas* y *Proteus*. Los mismos autores, en la patente US 3791924 (Ajinomoto Co., Inc.), publicada el 12 de febrero de 1974, describen un método para la obtención de L-dopa por medio de la acción de una β -tirosinasa producida por el cultivo de microorganismos seleccionados entre los género *Citrobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Paracolobactrum* o *Alcaligenes*, con un compuesto que puede ser: catecol, fenol y resorcina, con a) uno o más aminoácidos seleccionados entre cisteína, S-alquil_p-cisteína (grupo alquilo pequeño), cistina, serina y alanina, o con b) amonio y un segundo compuesto del grupo que consiste en ácido pirúvico, oxalacético, malico, fumarico, glioxílico y láctico, en un medio acuoso a un pH entre 4 y 11.

En las patentes EP 0618299 A1 y EP 0636695 A1 (ambas solicitadas por Ajinomoto Co., Inc) publicadas respectivamente el 01.04.1993 y 21.07.1994, se describen métodos para la producción de L-dopa a partir de catecol, ácido pirúvico y iones amonio, o catecol y L-serina, en presencia de 13-tirosinasa producida por *Erwinia herbicola*. El método de la EP 0618299 A1 se caracteriza porque utiliza el cultivo obtenido después de una incubación adicional durante 6 a 24 horas después de que el cultivo de las células alcance la fase estacionaria, mientras que el pH se mantiene entre 7 y 8,3. Y el método de la EP 0636695 A1 se caracteriza porque la última parte del periodo de la reacción se lleva a cabo a una temperatura menor de 25°C con la condición de que existan cristales anhidros de L-dopa en la mezcla de reacción, mientras que el L-dopa se forma y precipita en forma de cristales anhidros, los cuales se obtienen de la mezcla.

En el documento US 5,837,504 (Xun *et al.*), publicada el 17 de noviembre de 1998, se reivindica un método para producir L-dopa a partir de L-tirosina que comprende a) la oxidación de la L-tirosina añadiendo dicha tirosina y un sustrato a una suspensión de células para generar NADH, formándose una mezcla de reacción; y b) incubando dicha mezcla de reacción durante un tiempo con el consumo de oxígeno molecular y NADH para producir el L-dopa. La suspensión de células se prepara a partir de una de las bacterias del grupo formado por *E. coli* W, *E. coli* S17 λ y *E. coli* DH1 que expresan la actividad 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa. El sustrato consiste en moléculas pequeñas de ácidos o alcoholes orgánicos y sus combinaciones.

En el documento de patente WO 2004/015094 A1 (DSM IP ASSETS B.V. y DMS BIOTECH GMBH), publicado el 19 de febrero de 2004, mencionan que en el proceso de US 5,837,504 al tener lugar las fermentaciones en medio acuoso, el L-dopa se oxida formando productos de polimerización marrones o negros, y que su objetivo es proporcionar un proceso de producción fermentativa en el que el L-dopa obtenido sea estable. El L-dopa se produce por fermentación aeróbica de un microorganismo recombinante que posee actividad de L-tirosina-3-hidroxi-mono-oxigenasa y la ruta metabólica: glicólisis, ruta del fosfato pentosa, ruta del aminoácido aromático, o de sus derivados, que comprende: a) fase de crecimiento y fase de producción, en la que se produce L-dopa en el medio de fermentación, y b) fase de finalización, en la que L-dopa se produce a partir de una fuente de carbono y el pH es de 1 a 7 al menos en esta última fase.

Los autores de la presente solicitud, durante el estudio de genes que putativamente codifican polifenol oxidasas (PPOs) en bacterias interaccionando con plantas en general y con microbios patógenos en particular pensaron que existe una conexión entre la capacidad de los microorganismos de expresar las actividades de las PPOs y la infección. Para examinar esta posibilidad eligieron la *Ralstonia solanacearum* como modelo apropiado para ver si esas actividades realmente se expresan en los microorganismos, ya que este organismo cuyo genoma se ha secuenciado, es una bacteria patógena que causa que plantas como la patata y el tomate se marchiten y mueran. Dichos autores encontraron que al menos tres genes se expresan y las proteínas muestran actividad PPO (*Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6808-6815; 2005). Continuando con los estudios de las actividades de las PPO producidas por la *R. solanacearum* (FEBS Journal, 273, 257-270; 2006), los autores de la presente solicitud han encontrado de forma sorprendente que de las dos PPOs que actúan como tirosinasas, con números de acceso NP_519622 y NP_518458, su actividad es distinta. La NP_519622 es una enzima con una clara preferencia de oxidación de *o*-difenoles no carboxilados y solo posee una actividad monofenolasa residual, comportándose como una catecol oxidasa. Al contrario que todas las tirosinasas hasta ahora estudiadas, y de forma inesperada se ha encontrado que la NP_518458 posee una mayor actividad como monofenolasa que *o*-difenolasa, es decir, que posee una actividad de tirosina hidroxilasa (TH) mayor que de dopa oxidasa (DO), y además su actividad inicial no depende apenas de la presencia de un cofactor L-dopa.

La presente invención, por tanto, se refiere a un procedimiento de obtención de L-dopa a partir de L-tirosina utilizando la enzima tirosinasa NP_518458 (denominada a partir de ahora por su número de acceso) procedente de la *Ralstonia solanacearum*, procedimiento mejorado en relación a los existentes ya que la tirosinasa NP_518458 de *R. solanacearum* tiene una actividad hidroxilante muy efectiva y permite la acumulación de todo el L-dopa formado, lo cual no ocurre en las tirosinasas descritas en el estado de la técnica. La principal desventaja del uso de otras tirosinasas es precisamente la oxidación no deseada del dopa que se va acumulando, con la consiguiente pérdida del producto deseado y por tanto económica.

25 Descripción de la invención

Para una eficiente expresión de la enzima, y teniendo en cuenta además que se trata de un patógeno bacteriano, el gen que codifica esta enzima será amplificado utilizando como molde DNA genómico de *Ralstonia solanacearum* GM11000 y utilizando cebadores adecuados con sitios de restricción que permitan su donación en un vector plasmídico de expresión estable en *E. coli*.

Son varios los vectores disponibles, en cualquiera de ellos interesa que la expresión de la proteína donada sea inducible, por ejemplo por IPTG, para poder diferenciar la fase de crecimiento de la fase de expresión de la enzima tirosinasa. De este modo, la cepa de *E. coli* recombinante será cultivada en condiciones aeróbicas y en un medio complejo hasta alcanzar una alta densidad óptica y ser entonces inducida mediante el compuesto de elección.

La bioconversión de L-tirosina en L-dopa será realizada por la enzima en condiciones óptimas y para ello son posibles varias condiciones:

40 A- Adición de L-tirosina directamente al cultivo bacteriano.

B- Preparación de extractos celulares conteniendo la enzima, y

45 C- Aislamiento y purificación de la tirosinasa. En este caso para rentabilizar el coste asociado al proceso de aislamiento y purificación la enzima será inmovilizada en un soporte adecuado, siendo posible borosilicato o nylon.

Los expertos en la materia conocen distintos soportes para la producción de L-Dopa utilizando tirosinasa inmovilizada de forma que la reacción se lleva a cabo sobre un soporte adecuado que favorece el proceso de aislamiento y purificación del producto. Por ejemplo, se ha llevado a cabo la producción de L-DOPA con tirosinasa inmovilizada sobre membranas de nylon (Pialis, P; Hamann, M. C. J y Saville, B.A., L-DOPA production from tyrosinase immobilized on nylon 6,6. *Biotechnology and bioengineering* 51, 141-147 (1996). También en la patente CA 2 277 371 A1 (National Silicates LTD), publicada el 08.01.2001, se describe un método de inmovilización de enzimas sobre soportes de sílice, utilizando glutaraldehído como agente polifuncional. Se menciona que la enzima resulta mucho mejor estabilizada sobre este soporte que otros conocidos y se necesita menor cantidad de enzima para la producción de productos químicos y farmacéuticos, tal como el L-dopa. Y también se ha descrito que la tirosinasa de champiñón se ha inmovilizado sobre poliamino-estireno (PSNH) y cloruro de polimetil-estireno (PSCL), dando este último soporte mejores resultados (Ho, P. Y; Chiou, M.S. y Chao, A.C., Producción de L-DOPA a partir de tirosinasa inmovilizada sobre poliestireno modificado. *Applied Biochemistry and Biotechnology-Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 111, 139-152 (2003).

60 De los procesos mencionados, el C presenta ventajas en cuanto a la pureza del L-dopa obtenido sin pérdidas de enzima, facilitando en consecuencia los procesos posteriores de recogida del producto.

El experto en la materia conoce las distintas condiciones de la transformación que estarán condicionadas por el protocolo seguido según la enzima utilizada. En este caso que se ha utilizado la enzima NP_518458 de *R. solanacearum* el protocolo ha de cumplir los siguientes requisitos:

- pH inferior a 7 para evitar auto-oxidación del L-dopa formado, considerando pH 5 como próximo al óptimo. El tampón de elección es tampón fosfato o acetato.

ES 2 320 505 A1

- Concentración de tirosina de aproximadamente 1 mg/ml (5.5 mM) que sea lo más alta posible, teniendo en cuenta su limitada solubilidad y que un exceso de ésta puede provocar una inhibición de la reacción.

- Temperatura no superior a 37°C, preferentemente en el rango 25-30°C.

5

- Adición del detergente SDS a concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica (0.1%), preferentemente en la concentración 0.05%. Este compuesto es un agente estimulador de la actividad tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*.

10 - Adición de trazas de EDTA a concentraciones inferiores a 0.1 mM. El objetivo es eliminar cationes metálicos libres por su posible capacidad de mediar la oxidación del L-dopa formado e inestabilizar la acumulación de éste.

15 - Las características de la enzima NP_518458 de *R. solanacearum* hace que no sea necesaria la adición de L-dopa como cofactor, compuesto que sí debe utilizarse en el caso de otras tirosinasas para evitar una fase lag en la detección de la actividad enzimática.

20 - Adición de agentes reductores. Son varios los compuestos utilizables. El ácido ascórbico, es uno de los preferentemente utilizables. La concentración de éste, en el rango de 10 a 1 mM, será ajustada a la más alta posible sin que llegue a producir inhibición de la tirosinasa.

25 - La bioconversión será realizada en un bioreactor operando en condiciones aeróbicas. El bioreactor puede operar en discontinuo (Batch) pero también puede hacerlo en condiciones discontinuas alimentadas (Feed-batch), de esta manera se puede suministrar tirosina y el reductor apropiado en pequeñas cantidades evitando el problema de inhibición e incrementando el rendimiento en la producción de L-dopa.

Después de que el L-dopa se ha formado es necesario recogerlo y purificarlo. Sobre este aspecto se han descrito diferentes protocolos, conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo cristalización del compuesto en condiciones de poca aireación y pH ligeramente ácido.

30 Descripción de las figuras

Figura 1. La figura 1 muestra la reacción de dismutación que experimenta la dopaquinona para generar dopa y dopacromo (DC), catalizada por la enzima NP_518458 de *Ralstonia solanacearum*.

35 Figura 2. Formación de DC y dopa por la enzima NP_518458 de *Ralstonia solanacearum*. La gráfica de absorbancia muestra que todo el dopa formado por la dismutación de dopaquinona se acumula al emplear la enzima NP_518458 de *Ralstonia solanacearum*.

40 Figura 3. Formación de DC y dopa por la tirosinasa de champiñón comercial. La gráfica de absorbancia muestra como al emplear la tirosinasa de champiñón comercial no se produce una acumulación estequiométrica del dopa con el DC, debido al uso del dopa por parte del enzima.

Modo de realización de la invención: Ejemplo

45 Cultivo celular

Se hizo crecer *R. solanacearum* en un medio salino basal (BSM) que contenía: (NH₄)₂SO₄ 15 mM, MgCl₂ 0,8 mM, FeSO₄ 2 μM, CaCl₂ 0,2 mM, Na₂MoO₄ 8 μM, MnCl₂ 5 μM, glicerol al 0,5% y extracto de levadura al 0,01% en tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7. Se hizo crecer *E. coli* de la manera habitual en medio Luria-Bertani (LB).
50 Cuando se necesitó, se complementaron los medios con kanamicina, ampicilina o rifampicina 50 μg/ml, según fue necesario dependiendo del plásmido utilizado y de la selección necesaria.

Para obtener extractos bacterianos habituales, se hicieron crecer células en BSM (medio salino basal) durante 48 h hasta que se obtuvo una densidad óptica de aproximadamente 1,2 y se centrifugó a 5000 x g durante 10 min.
55 Se lavó el sedimento con disolución de NaCl al 0,9%, se resuspendió en 1 ml de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0 que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM más una dilución 1/500 de "Protease inhibitor cocktail"[®] ("cocktail de inhibidor de proteasa") y se rompió mediante sonicación discontinua utilizando un sonicador Braun Labsonic durante aproximadamente 4 min. Se centrifugó el homogeneizado a 12000 x g durante 4 min, y se utilizó el sobrenadante para purificación y/o determinaciones de la actividad enzimática. Se obtuvieron los reactivos para los medios de cultivo
60 celular y las determinaciones enzimáticas de Sigma Co. (St. Louis, Missouri, EE.UU.).

Determinación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas con el ensayo del ácido bicinónico. Alternativamente, se utilizó la
65 absorbancia a 280 nm para seguir el perfil de elución de las proteínas en columnas de purificación de cromatografía.

ES 2 320 505 A1

Determinaciones enzimáticas

Se determinaron las actividades TH y DO monitorizando respectivamente la oxidación de L-tirosina o de L-dopa 2 mM a L-dopacromo a 475 nm (figura 1C, $\epsilon = 3700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en tampón fosfato de sodio 0,1 M. El pH fue de 5,0 ó 7,0 según la actividad y la enzima PPO (polifenoloxidasas) sometida a ensayo, debido a las diferentes condiciones óptimas mostradas por las actividades de este microorganismo. Además, se añadió SDS al 0,05% para el ensayo de TH patrón, mientras que se añadió SDS al 0,02% para determinar la actividad DO. Para la titulación de dopa, se añadieron 50 ml de periodato de sodio 10 mM y se determinó inmediatamente el aumento de la absorbancia a 475 nm. Se añadió ocasionalmente una pequeña concentración de L-dopa como cofactor para determinar la actividad TH cuando resultó apropiado. Se monitorizaron la tiramina hidroxilasa y la dopamina oxidasa de la misma forma, pero se determinó el dopaminocromo ($\epsilon = 3100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). En todos los casos, se definió una unidad como la cantidad de enzima que cataliza la aparición de 1 μmol de dopacromo/dopaminocromo por minuto a 37°C.

Purificación de enzimas

Se concentraron los extractos utilizando tubos de centrifuga ultra Millipore de Amicon de 15 ml (punto de corte a 10 kDa). Se cargaron las preparaciones en una columna CM-Sephadex (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, RU) (3 cm de diámetro x 18 cm de longitud). Se eluyó la columna con tampón fosfato de sodio 0,05 M, pH 7, hasta un volumen aproximadamente igual al volumen total de la columna. Una vez que las proteínas no unidas se eluyen de la columna, se eluyeron otras proteínas con un gradiente lineal de cloruro de sodio hasta 1,5 M en el mismo tampón. Se sometieron las fracciones a ensayo para determinar las actividades PPO.

SDS-PAGE

La pureza de las enzimas se confirmó mediante SDS-PAGE [24]. Se llevó a cabo la disociación analítica con SDS-PAGE utilizando acrilamida al 9% para el gel de separación y al 3% para el gel de apilamiento. El tampón de resolución fue Tris-HCl (pH 8,8) y el tampón de depósito fue Tris-glicina (pH 8,3), conteniendo ambos SDS al 0,1%. Las muestras se mezclaron en una razón 2:1 (vol/vol) con tampón de muestra (Tris-HCl 0,18 M, pH 6,8, glicerol al 15%, azul de bromofenol al 0,075%, 2-mercaptoetanol al 7,5% y SDS al 9%) y se calentaron a 95°C durante 5 min antes de la aplicación. Se corrió la electroforesis a 20°C y una corriente constante de 15 mA durante 20 min y 30 mA durante aproximadamente 90 min. Las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie. Se obtuvieron reactivos para SDS-PAGE de Biorad Laboratories (Richmond, CA, EE.UU.).

Finalmente procede la bioconversión de L-tirosina en L-dopa de acuerdo con los procedimientos detallados con anterioridad.

Ensayo comparativo del L-dopa obtenido utilizando la enzima NP_518458 de R. solanacearum y la tirosinasa del champiñón A. bisporus

En los ensayos de actividad TH se puede registrar tanto el dopacromo (DC) formado como el dopa acumulado en tiempo de reacción. El primero se puede seguir por registro continuo en espectrofotómetro de su absorbancia a 475 nm ($\text{Abs}_{475 \text{ nm}}$), mientras que el segundo se puede determinar parando la reacción a distintos tiempos y adicionando periodato en exceso para que se oxide instantánea y estequiométricamente a DC, incrementándose la absorbancia a 475 nm de forma proporcional (Graham y Jeff, 1977).

Metodología

El ensayo consistió en llevar a cabo una medida de la actividad TH de *R. solanacearum* en las condiciones normales:

Tirosina 2 mM (0.36 mg/ml) (en tampón fosfato de pH 5).

0.05% SDS.

100 μl extracto enzimático de células expresando la enzima NP_518458 (normalmente contienen entre 0.6 y 1.5 mg proteínas/ml).

100 μl de tirosinasa de champiñón 0.1 mg/ml (alternativamente a la anterior).

37°C.

La reacción se deja transcurrir, registrando la aparición de dopacromo (DC) como $\text{Abs}_{475 \text{ nm}}$. A los dos minutos de reacción se adicionan 25 μl de periodato sódico (IO_4Na) 10 mM y se deja seguir la reacción hasta que la recta del registro de la medida de absorbancia sea paralela a la anterior (previa a la adición de periodato). La cantidad de dopa, formado en esos dos minutos de reacción iniciales, corresponderá al aumento casi instantáneo de $\text{Abs}_{475 \text{ nm}}$ debido a la oxidación química por el periodato del dopa formado hasta DC.

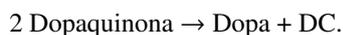
ES 2 320 505 A1

El procedimiento debe repetirse adicionando el periodato a diferentes tiempos de reacción (4',6',8',10'...) con el objetivo de obtener los incrementos de $A_{475\text{ nm}}$ a lo largo de toda la curva de reacción y componer finalmente la recta de acumulación de dopa que se compara con la de formación de DC obtenida con una medida de actividad TH rutinaria.

5 *Resultados*

En el caso de la tirosinasa NP_518458 de *R. solanacearum*, el dopa se acumula de forma aproximadamente igual al DC, lo que no ocurre si se utiliza la de champiñón. El producto de la enzima en ambos casos es la dopaquinona, que sufre una reacción de dismutación (ver figura 1) para generar dopa y dopacromo (DC):

10



15 El dopa liberado puede ser utilizado como sustrato por la tirosinasa, compitiendo con la tirosina. Esta competencia depende de la cantidad de dopa acumulado y de la afinidad de la enzima por el *o*-difenoil dopa en comparación con el monofenol tirosina.

20 Como se puede observar en la figura 2, los datos obtenidos indican que la actividad DO de la tirosinasa de *R. solanacearum* no compite con la actividad TH en las condiciones de medida utilizadas, y por lo tanto todo el dopa formado por la dismutación de dopaquinona se acumula. Cuando se compara con el comportamiento de la tirosinasa de champiñón (ver figura 3), las diferencias son claras, observándose cómo esa enzima sí utiliza el dopa no permitiendo una acumulación estequiométrica con el DC.

25 La acumulación de todo el dopa formado es algo inusual en las tirosinasas descritas, y hace de la enzima NP_518458 de *R. solanacearum* una PPO distinta de las restantes y con propiedades excelentes para su utilización en procesos donde se necesite una actividad hidroxilante muy efectiva. La principal desventaja del uso de otras tirosinasas es precisamente la oxidación no deseada del dopa que se va acumulando, con la consiguiente pérdida económica, problema que queda muy atenuado en la tirosinasa de *R. solanacearum*, puesto que la figura demuestra que el dopa en esas condiciones y concentración no entra en el ciclo catalítico.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 320 505 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de producción de 3,4-dihidroxifenil-L-alanina a partir de L-tirosina, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:
- 10 a) utilización de la enzima NP_518458, obtenida del microorganismo *Ralstonia solanacearum* como tirosinasa;
 - 10 b) clonación y expresión de la enzima NP_518458 en una cepa de *E. coli*; y
 - 15 c) bioconversión de la L-tirosina en 3,4-dihidroxifenil-L-alanina por:
 - 15 (i) adición de L-tirosina directamente al cultivo bacteriano; o
 - 15 (ii) preparación de extractos celulares conteniendo la enzima NP_518458; o
 - 20 (iii) aislamiento, purificación y fijación a un soporte inerte de la enzima NP_518458 que actuará de catalizador en la oxidación de la L-tirosina para formar la 3,4-dihidroxifenil-L-alanina.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa c) tiene lugar aun pH entre 2 y 7.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la etapa c) tiene lugar a un pH entre 4 y 6.
- 25 4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa c) tiene lugar a un pH 5.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa c) tiene lugar a temperatura no superior a 37°C.
- 30 6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa c) tiene lugar de 25°C a 30°C.
7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6 en el que se añade EDTA como agente quelante en concentraciones inferiores a 0.1 mM.
- 35 8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7 en el que hay presente algún agente reductor.
9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7 en el que el agente reductor es el ácido ascórbico.
- 40 10. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9 en el que se añade SDS como agente estimulador de la tirosinasa a una concentración entre 0.01% y 0.1%.
11. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10 en el que se añade SDS como agente estimulador de la tirosinasa a una concentración del 0.05%.
- 45 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se excluye la adición de L-Dopa como cofactor.
- 50
- 55
- 60
- 65

Figura 1

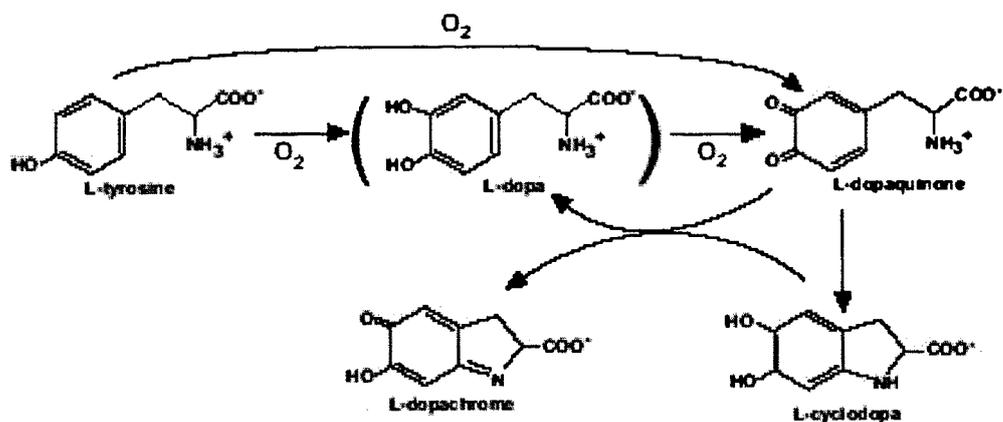


Figura 2

Formación de DC y Dopa por la enzima NP_518458 de *R. solanacearum*

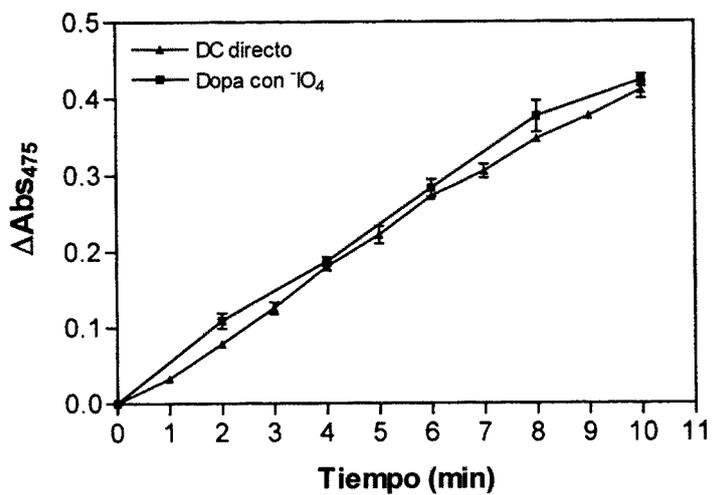
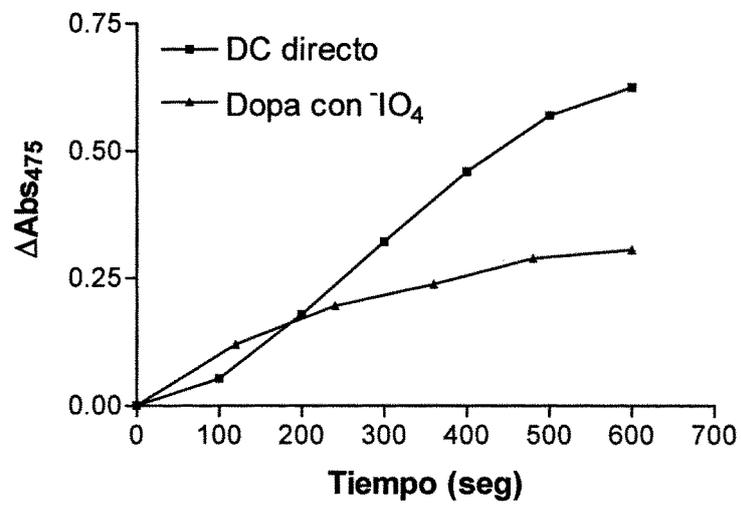


Figura 3

**Formación de DC y Dopa por la
Tirosinasa de champiñón comercial**





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 320 505

② Nº de solicitud: 200600663

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.03.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HERNÁNDEZ-ROMERO D. et al. "A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio". The FEBS Journal. Enero 2006. Vol. 273, N ^o . 2, páginas 257-270. ISSN 1742-464X.	1-12
A	WO 2004015094 A1 (DSM IP ASSETS BV) 19.02.2004, todo el documento.	1-12
A	EP 0636695 A1 (AJINOMOTO KK) 01.02.1995, todo el documento.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n^o:

Fecha de realización del informe

08.05.2009

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P 13/22 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12R 1/05 (2006.01)

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

C12P, C12N, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, NPL, MEDLINE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.05.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-12	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Hernández-Romero D. et al. "A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio". The FEBS journal. Enero 2006. Vol. 273, Nº. 2, páginas 257 - 270. ISSN 1742-464X.	Enero 2006
D02	WO 2004015094 A1	19-02-2004
D03	EP 0636695 A1	01-02-1995

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

La presente solicitud divulga un procedimiento de producción enzimática de 3,4 dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) a partir de tirosina.

En concreto la reivindicación 1 caracteriza este procedimiento porque la enzima utilizada es la tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* identificada como NP_518458. Las reivindicaciones 2 a 4 caracterizan el pH al cual se produce la bioconversión, las reivindicaciones 5 y 6 hacen referencia a la temperatura del procedimiento y las reivindicaciones 7- 12 caracterizan algunos de los reactivos utilizados en el procedimiento de obtención del L-DOPA.

Ninguno de los documentos citados como estado de la técnica divulga un procedimiento con idénticas o similares características al divulgado por la presente solicitud. Por tanto, las reivindicaciones 1-12 serían nuevas.

El documento D01, considerado el documento más cercano del estado de la técnica al objeto de la presente solicitud, divulga la producción, aislamiento y caracterización del enzima NP_515458 de *Ralstonia solanacearum*, y describe la actividad claramente tirosinasa del enzima. Entre otras cosas, el documento describe el inusual comportamiento de tal enzima que hace que la relación de su actividad TH/DO sea mayor que 1, lo que significa que posee una actividad de tirosina hidroxilasa (TH) mayor que de dopa oxidasa (DO), y además su actividad inicial no depende apenas de la presencia de un cofactor L-dopa (pag. 265, columna derecha). Esta característica hacen del enzima especial, puesto que esa característica no ha sido encontrada en otras tirosinasas descritas, como por ejemplo las de *Streptomyces*. Además el pH óptimo de funcionamiento del enzima es pH 5 (tabla 4, página 266). Concluye el documento que esas características junto a su gran resistencia a la temperatura y al SDS le hacen ser un enzima candidata para ser utilizada como biocatalizador.

Así pues, para el experto en la materia conociendo el efecto técnico anterior, sería obvia el diseño de un procedimiento como el reivindicado en la presente solicitud. Por tanto, las reivindicaciones 1-12 carecerían de actividad inventiva.