



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 343 665**

② Número de solicitud: 200802500

⑤ Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 15/75 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **27.08.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **05.08.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
05.08.2010

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Pérez Mellado, Rafael**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

② Título: **Nueva quitinasa de origen bacteriano con amplio espectro fungicida.**

③ Resumen:

Nueva quitinasa de origen bacteriano con amplio espectro fungicida.

La presente memoria describe una nueva secuencia de ADN que tiene una actividad promotora fuerte en bacterias y un método para expresar un gen que determina la síntesis de una quitinasa bacteriana de amplio espectro fungicida usando dicha secuencia. También describe un método para producir dicha quitinasa en bacterias usando la secuencia descrita, en particular, un método para producir el producto del gen deseado en gran cantidad en la célula bacteriana y obtenerlo secretado al exterior celular.

ES 2 343 665 A1

DESCRIPCIÓN

Nueva quitinasa de origen bacteriano con amplio espectro fungicida.

5 Estado de la técnica

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, y de forma muy importante como polisacárido estructural en la pared celular de los hongos, llegando a alcanzar hasta un 16% del peso seco total en hongos filamentosos y basidiomicetos. Es un homopolímero insoluble en agua de carácter estructural formado por n repeticiones de N-acetil glucosamina unidas por enlaces $\beta(1-4)$. También se encuentra en el exoesqueleto de artrópodos, cubierta de crustáceos, etc. Es uno de los polímeros más abundantes en la Naturaleza después de la celulosa.

La quitina es por tanto el compuesto más importante en el mantenimiento de la estructura de la pared fúngica, por lo que podría ser utilizado como blanco para la obtención de compuestos proteicos solubles de acción antifúngica.

La enzima conocida como quitinasa está presente en un amplio rango de organismos, particularmente microorganismos y frecuentemente de origen bacteriano, y su acción determina la hidrólisis del polímero de quitina impidiendo la viabilidad del hongo.

Entre los organismos que expresan quitinasa se encuentran virus, bacterias, hongos y plantas. La función de esta enzima en cada organismo es diversa, jugando importantes papeles fisiológicos y ecológicos: en invertebrados se requiere para la degradación parcial de sus antiguos exoesqueletos, en plantas como un mecanismo de defensa contra hongos patógenos, y en bacterias, para las funciones de nutrición y parasitismo, pudiéndose aplicar para el control de fitopatógenos en la agricultura. Hoy en día, la agricultura se ha hecho más vulnerable a las plagas de hongos debido, entre otras causas, a la escasa variación genética que presentan las plantas de cultivo a gran escala. Los hongos proliferan rápidamente, estimulados por el suelo rico en nutrientes y húmedo, ejerciendo un efecto devastador en los cultivos. No sólo afectan a la agricultura, el ser humano también puede ser un hospedador de estos patógenos oportunistas, particularmente cuando se encuentra en estados de inmunodepresión.

La quitinasa de *Bacillus subtilis* (EC 3.2.1.14) es una enzima de la familia 18 de la glicosil-hidrolasas que cataliza la degradación de la quitina. *Bacillus subtilis* es uno de los microorganismos con capacidad para secretar una gran variedad de enzimas extracelulares degradantes de polisacáridos, lo que hace que sea un microorganismo idóneo para la secreción de proteínas de interés comercial.

Las técnicas de ingeniería genética y biología molecular facilitan la sobreproducción de enzimas en microorganismos, lo que puede ser utilizado en los procesos de fermentación industrial para producir grandes cantidades de una enzima particular. Desde un punto de vista industrial, producir la mayor cantidad de una enzima determinada se hace necesario recurrir a las técnicas anteriormente citadas para sobreproducir la mayoría de las enzimas empleadas en esta industria.

40 Descripción

La cepa de *Bacillus subtilis* 168 presenta dentro de su genoma la secuencia SEQ ID 7, que a pesar de estar secuenciada, no tenía hasta la fecha descrita, ni asociada por homología a secuencias similares en otros genomas, ninguna función concreta. En la presente invención se determina la función de este gen concreto como codificante para una nueva quitinasa, aspecto principal de la presente invención.

La presente invención se refiere a una nueva enzima quitinasa codificada por *Bacillus subtilis* 168, a un método para producir dicha quitinasa y su uso como fungicida.

Por otro lado, se describe más adelante mediante ejemplos el efecto fungicida, tanto *in vivo* como *in vitro*, de la quitinasa de la presente invención sobre diferentes especies de hongos, demostrando la efectividad de la misma.

Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un polipéptido codificado por un polinucleótido que presenta al menos un 70% de homología con SEQ ID 1, que presenta al menos un 80% de homología con SEQ ID 1, que presenta al menos un 90% de homología con SEQ ID 1 o que consiste esencialmente en SEQ ID 1. A partir de ahora nos referiremos a ella como polipéptido de la invención.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a la construcción génica que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica al polipéptido como se define en la reivindicación anterior y:

- a. una secuencia polinucleotídica que comprende SEQ ID NO 2,
- b. moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la 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.

ES 2 343 665 A1

Un tercer aspecto de la invención plásmido recombinante que comprende:

- la construcción génica según la reivindicación anterior,
- 5 - el gen *cat*,
- el origen de replicación del plásmido pRM_{icat} de *Escherichia coli* y del plásmido pPCT2 para *Bacillus subtilis*,
- un gen repórtier de promotores, y
- 10 - un gen de resistencia a kanamicina.

Otro aspecto de la invención se refiere al método de obtención del polipéptido de la invención que comprende introducir la construcción génica según la reivindicación 2 o el plásmido recombinante según la reivindicación 3, en una célula hospedante e incubar la célula hospedante según a) en un medio de cultivo adecuado.

Una realización preferida de dicho método además comprende purificar el polipéptido obtenido. En otra realización preferida la célula hospedadora se selecciona del grupo que comprende *E. coli* y *B. subtilis*.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del polipéptido de la invención para la preparación de un fármaco con actividad quitinasa.

Finalmente otro aspecto de la invención es el uso del polipéptido de la invención en la preparación de un fármaco con actividad fungicida.

Adicionalmente, se describe en la presente invención un método que permite la sobreproducción de proteínas de interés biológico, preferiblemente de forma extracelular, en este caso, la sobreproducción de la enzima de interés, polipéptido de la invención. Para ello, se utiliza un promotor específico. Este método de promoción de la expresión también puede ser utilizado para la expresión de otros genes de interés, mediante su inclusión en el plásmido recombinante descrito en la presente invención.

Específicamente, se describe un vector de expresión para sobreproducir proteínas regulado por un promotor de *B. subtilis* o para inducir la secreción de las proteínas al medio exterior, las células transformadas con este vector y el uso de las mismas para la sobreproducción de la enzima hidrolítica extracelular quitinasa.

El uso del promotor utilizado para la sobreexpresión no está limitado al gen para la quitinasa de *B. subtilis*, sino que permite expresar otras proteínas homologas o heterólogas ya que la utilización de la secuencia del promotor *csn* (SEQ ID NO 2) para la regulación de la expresión de genes de interés produce incrementos de los mismos en comparación con el uso de los propios promotores de estos genes.

En la presente invención se describe en detalle el método de elaboración del plásmido recombinante pCSN73 mediante la amplificación de la SEQ ID NO 3, utilizando cebadores específicos, preferentemente los cebadores que comprenden la SEQ ID NO 4 y la SEQ ID NO 5 y el ligado del fragmento de DNA amplificado con el plásmido lanzadera pNR2.

Así mismo se describe un método de elaboración de un plásmido que comprende la amplificación mediante cebadores específicos de la secuencia nucleotídica de *B. subtilis* que a su vez comprende la secuencia codificante para la proteína madura del gen *yvbX* y el terminador de la transcripción independiente del factor de terminación *rho*; la posterior digestión mediante endonucleasas del fragmento amplificado y del plásmido pCSN73; la purificación de los fragmentos obtenidos en la digestión; la desfoforilación de los extremos 5' P del plásmido; y el ligado de los fragmentos purificados. Preferentemente el método de elaboración del plásmido de la invención utiliza los cebadores que comprenden la SEQ ID NO 6 y la SEQ ID NO 7.

Dichos plásmidos se pueden utilizar en la transformación de bacterias, por ejemplo pero sin limitarse, las bacterias transformadas se seleccionan del grupo que comprende *E. coli* y *B. subtilis*.

El término esencialmente, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a las secuencias resultantes de la eliminación de aminoácidos de las regiones N-terminal y/o C-terminal de cualquiera de la secuencia SEQ ID NO: 1.

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 se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Ensayo *in vivo* de la actividad fungicida de quitinasa sobre *Fusarium proliferatum*. Se indican las diluciones del cultivo del hongo ensayadas.

Fig. 2. Ensayo *in vivo* de la actividad fungicida de quitinasa sobre *Aspergillus ochraceus*. Se indican las diluciones del cultivo del hongo ensayadas

Ejemplos de realización

Las cepas bacterianas empleadas han sido: *Bacillus subtilis* 168 proporcionada por F. Kunst y *Escherichia coli* MC1061 y ésta última se ha empleado para la propagación del plásmido construido en esta invención.

Los métodos empleados para el crecimiento y la manipulación de las cepas se han realizado según Sambrook y colaboradores [Sambrook, Firtsch y Maniatis, 1989. "Molecular cloning". *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press].

Ejemplo 1*Elaboración del plásmido recombinante pCSN73*

El promotor de la presente invención, que posee una elevada actividad promotora, se identificó mediante la secuenciación de una librería genómica de *Bacillus subtilis* 168 [Anagnostopoulos C, Piggot, P. J. y Hoch, J. A. (1993). "The genetic map of *Bacillus subtilis*". In *Bacillus subtilis and other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*, pp.425-461. Edited by A. J. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. Washington,DC: American Society for Microbiology] en la posición 2748.10 kb del cromosoma.

Esta secuencia de DNA está situada en la región promotora del gen *csn* que codifica una proteína extracelular con actividad quitosanasa (nº de acceso: X92868) y descrita por Victor Parro y colaboradores [Victor Parro, Marta San Román, Inmaculada Galindo, Bénédicte Purnelle, Alexei Bolotin, Sorokin y Rafael P. Mellado. (1997). "A 23911 bp región of the *Bacillus subtilis* genome comprising genes located upstream and downstream of the lev operon". *Microbiology* 143:1321-1326].

La SEQ ID NO 3 muestra el fragmento de DNA de 445 nucleótidos obtenido a partir de la secuencia de DNA de la región cromosómica de *Bacillus subtilis* 168 comprendida entre las bases 2.748,117 y 2.748,562 de la secuencia publicada por Kunst *et al.* [Kunst, F. *et al.*, (1997). "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*". *Nature*, vol 390: 249-256]. Esta secuencia de DNA incluye una secuencia de ADN promotora que contiene una región similar a la caja TATA localizada aproximadamente 10 pb delante del punto de iniciación de la transcripción y que induce la iniciación de la transcripción de la RNA polimerasa (nucleótidos 1-295). La secuencia promotora se presenta aislada en la SEQ ID NO 2.

A partir de dicha secuencia (SEQ ID NO 3) se diseñaron dos oligonucleótidos que permitieron amplificar por PCR un fragmento de DNA de 295 pb conteniendo la región promotora (oligonucleótidos prcsn1-prcsn2).

SEQ ID NO 4: prcsn1: (directo)

SEQ ID NO 5: prcsn2: (inverso).

El fragmento de DNA de 295 pb se amplificó mediante la pareja de oligonucleótidos prcsn1-prcsn2 a partir de DNA genómico de *Bacillus subtilis* 168. Las células de *Bacillus subtilis* 168 obtenidas mediante centrifugación a partir de 20 ml de un cultivo en medio LB, en fase exponencial, se lisaron siguiendo el método de Cutting y Van der Horn [Simón M. Cutting y Peter B. Van der Horn. (1990). "Genetic Analysis". *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Ed. C.R. Harwood y S. M. Cutting]. En un tubo de PCR se añadieron 10 µl de tampón de enzima, dNTPs 1 mM de concentración final, Cl₂Mg 1,5 mM de concentración final, 280 ng de cada uno de los oligonucleótidos, 500 ng de DNA cromosómico de *Bacillus subtilis* 168 y 1 U de DNA polimerasa (Ecogen), completando el volumen final a 100 µl. Cada ciclo de PCR constó de: 1' a 94°C; 5' a 55°C y 2' a 72°C durante 30 ciclos y se realizó en un termociclador modelo PTC-1000 de MJ. Research, Inc.

El fragmento de DNA obtenido mediante PCR se ligó al plásmido lanzadera pNR2, que contiene el gen de resistencia a kanamicina y el origen de replicación del plásmido pPCT2 para *Bacillus subtilis*, el gen *cat*, un gen "repórter" de promotores que codifica para la enzima cloranfenicol-acetiltransferasa y el origen de replicación del plásmido pR-MÍcat de *E. coli* construido por Parro V. y colaboradores [Victor Parro y Rafael P. Mellado (1993) "Heterologous recognition *in vivo* of promotor sequences from the *Streptomyces coelicolor* dagA gene". *FEMS Microbiol. Letters*. 106: 347-356].

ES 2 343 665 A1

El plásmido pNR2 se propagó en un cultivo de células competentes de *E. coli* MC1061. La cepa se inoculó en 10 ml de medio LB con 100 mg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C durante 12 h. El cultivo se centrifugó y el pellet resultante se usó para extraer el plásmido con el kit Wizard plus SV minipreps de Promega.

5 El plásmido obtenido se digirió con la enzima de restricción SmaI y se ligaron cada uno de los fragmentos obtenidos por PCR. Las ligaciones se transformaron en las células *E. coli* MC1061 y los transformantes obtenidos en LB con ampicilina 100 µg/ml se seleccionaron por la técnica de hibridación en filtro. El DNA se desnaturalizó e inmovilizó en una membrana de nylon (Hybond-N+ de Amersham) y se hibridó en una solución de SSC 6X, SDS 0.1%, 6 mg/ml de esperma de Salmón y solución de Denhardt's con el fragmento obtenido por PCR y marcado con el fragmento *klenow* de la DNA-polimerasa en sus extremos 5'OH con αdNTP(p³²). Después de la hibridación, la adsorción no específica se lavó y se autorradiografió el filtro para identificar los clones positivos. Los transformantes se hibridaron a 65°C durante toda la noche comprobando la presencia y la orientación del inserto por secuenciación con los oligonucleótidos prcsn1 o prcsn2. El plásmido resultante se denominó pCSN73 y contiene el promotor *csn* orientado en la dirección del gen *cat*.

15

Ejemplo 2

Elaboración del plásmido recombinante de la invención y obtención de células transformadas con dicho plásmido

20

Se diseñaron dos oligonucleótidos a partir de la secuencia de DNA del gen *yvbX* de *Bacillus subtilis* 168 publicada por Kunst *et al.* [Kunst, F. *et al.*, (1997). denominados:

Yvbx2: SEQ ID NO 6

25

Yvbx1h: SEQ ID NO 7

La secuencia de estos oligonucleótidos (Boehringer Ingelheim) comienza desde el extremo 5' y termina en el extremo 3'. Al primero de ellos se le incorporó un extremo 5' con una diana de restricción *Bam*HI, y al segundo un extremo 5' con una diana *Hind*III para obtener extremos cohesivos.

30

El fragmento de DNA empleado para el clonaje de la secuencia de ADN de la proteína madura del gen *yvbX* se obtuvo mediante la técnica de PCR (modelo PTC-1000 de MJ. Research, Inc), empleando una temperatura de hibridación de 50°C. En un tubo de PCR se añadieron 10 µl de tampón de enzima, 1 µl de desoxinucleótidos (dNTPs 10 mM), Cl₂Mg 1,5 mM de concentración final, 280 ng de cada uno de los oligonucleótidos, 500 ng de DNA de *Bacillus subtilis* 168 y 1 U de DNA polimerasa (Ecotaq de Ecogen), completando el volumen final a 100 µl. El producto de amplificación de PCR obtenido tiene un tamaño de 1965 pares de bases y comprende una secuencia de DNA que contiene la secuencia codificante para la proteína madura y un terminador de la transcripción independiente del factor de terminación *rho*.

40

Un cultivo recombinante de *E. coli* que contenía el plásmido pCSN73 se cultivó en medio LB con ampicilina 100 µg/ml. El DNA plasmídico se obtuvo con el kit Wizard plus SV de Promega siguiendo las indicaciones del fabricante: Se resuspendió el pellet obtenido por centrifugación de 5 ml de cultivo en 250 µl de tampón de resuspensión al que se añadieron 250 µl de tampón de lisis. Se mezclaron las dos soluciones hasta que se obtuvo un sobrenadante transparente y se añadieron 10 µl de proteasa alcalina. Las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente añadiendo a continuación 350 µl de solución de neutralización. Se invirtieron los tubos y se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 10 min. El sobrenadante resultante se recogió y se purificó en una columna Wizard plus SV minipreps spin, que se lavó con 750 µl de solución de lavado. A continuación se centrifugaron las columnas y se añadieron 100 µl de agua libre de nucleasas para extraer el DNA retenido. Se centrifugaron las columnas nuevamente a 13.000 rpm durante 10 min y se recogió la solución con el plásmido purificado.

50

El fragmento de PCR obtenido y el DNA del plásmido pCSN73 se digirieron con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, empleando 100 ng de DNA en cada caso, para obtener extremos cohesivos, religables entre sí. Las muestras se digirieron en un volumen final de 25 µl, añadiendo a cada tubo 2.5 µl de tampón de la enzima, 1 µl de enzima y agua destilada estéril hasta completar el volumen final. Ambos fragmentos se purificaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% siguiendo el procedimiento descrito por Parro, V y Mellado, R.P [Parro V. y Pérez Mellado R. (1997). "Procedimiento para la sobreproducción, purificación y utilización de la agarosa de *Streptomyces coelicolor*". Patente Nacional nº 9700090].

55

Se defosforilaron los extremos 5'P del plásmido con fosfatasa alcalina (Amersham) que rompe los enlaces fosfato de los extremos 5' del DNA para evitar la recircularización del plásmido. En un volumen final de reacción de 20 µl se incubaron 100 ng de plásmido, 2 µl de tampón fosfatasa y 1 µl de fosfatasa alcalina durante 1 h a 37°C.

60

El fragmento de DNA de 1965 pb se liga al plásmido, empleando 100 ng de DNA plasmídico y 5 veces la cantidad de DNA que se quiere ligar al plásmido y se añadieron los mililitros necesarios para asegurar la proporción adecuada de cada fragmento de DNA en un volumen final de 10 µl. Se añadió 1 µl de tampón de la enzima y 1 µl de T4 DNA ligasa. Cada reacción se incubó entre 4 y 16 h a 16°C. Se transformaron 5 µl de la ligación en *E. coli* MC1061 y se plaquearon las células en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina para seleccionar los transformantes.

65

ES 2 343 665 A1

Se seleccionaron 100 transformantes que se replicaron en agar LB con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Los clones seleccionados se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 12 h. Para comprobar la presencia y orientación del inserto se digirieron los plásmidos obtenidos mediante minipreparaciones, como se ha descrito anteriormente. Los plásmidos se digirieron con BamHI y con HindIII y los fragmentos de restricción se comprobaron en un gel de agarosa del 1%.

Se seleccionó un clon llamado pCyvbx.

El plásmido así obtenido se utilizó para transformar *Bacillus subtilis* 168 seleccionando los transformantes en placas de LB con kanamicina (10 $\mu\text{g/ml}$) tal y como se ha descrito anteriormente para los clones de *E. coli*. Se secuenciaron los fragmentos de ADN clonados en un secuenciador automático comprobando que correspondían a la secuencia del fragmento clonado y que no contenían errores.

15 Ejemplo 3

Ensayos de producción de quitinasa

Se utilizaron filtros circulares Hybond-N+ (Amersham Biosciences) sobre placas de medio YPG suplementadas con el antibiótico correspondiente, donde se sembró el cultivo de *B. subtilis* crecido hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.8. Se incubó durante toda la noche a 37°C, periodo suficiente para que el microorganismo libere las proteínas de secreción al medio entre las que se encuentra la quitinasa y que son capaces de atravesar el filtro.

Posteriormente se retiró el filtro (con la biomasa bacteriana) y se sembró el hongo a ensayar sin diluir (SD) y en diluciones seriadas (1/5, 1/10, 1/20, 1/50 y 1/100) para observar el efecto en el crecimiento. Cuando se ensayaron los hongos levaduriformes se utilizó la muestra sin diluir (SD) y diluciones de mayor rango (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}).

Los hongos utilizados en los ensayos de actividad *in vivo* se relacionan en la siguiente tabla 1 y los resultados obtenidos se indican en la Tabla 2.

35 TABLA 1

Relación de hongos utilizados

<i>Aspergillus ochraeus</i>	patógeno oportunista humano y fitopatógeno
<i>Cryptococcus neoformans</i>	patógeno oportunista humano
<i>Fusarium cubensi</i>	fitopatógeno
<i>Fusarium culmorum</i>	fitopatógeno
<i>Fusarium moniliforme</i>	fitopatógeno
<i>Fusarium proliferatum</i>	fitopatógeno
<i>Fusarium verticilloides</i>	fitopatógeno
<i>Penicillium chrysogenum</i>	productor de penicilina
<i>Penicillium raistrickii</i>	productor de antibióticos
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	levadura fermentadora.

ES 2 343 665 A1

TABLA 2

Ensayo in vivo de la actividad fungicida de la quitinasa sobreproducida

Hongo	YPG	Actividad endógena (pCSN73)	Actividad sobreproductora (pCyvbx)
<i>A. ochraceus</i>	Crece (+++)	Crecimiento (+ +)	Ausencia de crecimiento (-)
<i>F. cubensi</i>	Crece (+++)	Crecimiento (+ +)	Ausencia de crecimiento (-)
<i>F. proliferatum</i>	Crece (+++)	Crecimiento muy disminuído (+)	Ausencia de crecimiento (-)
<i>F. culmorum</i>	Crece (+++)	N. D.	Ausencia de crecimiento (-)
<i>F. verticilloides</i>	Crece (+++)	N. D.	Ausencia de crecimiento (-)
<i>F. moniliforme</i>	Crece (+++)	N. D.	Ausencia de crecimiento (-)
<i>P. raistrickii</i>	Crece (++)	Crecimiento muy disminuído (+)	Ausencia de crecimiento (-)
<i>P. chrysogenum</i>	Crece (+++)	N. D.	Ausencia de crecimiento (-)
<i>S. cerevisiae</i>	Crece (+++)	Crece sólo SD y 10^{-1}	Ausencia de crecimiento (-)
<i>C. neoformans</i>	Crece (+++)	Crece SD, 10^{-1} y 10^{-2}	Crecimiento residual SD

+++ Buen crecimiento en medio sólido.

N.D. = no determinado.

Estos resultados se completan con los mostrados en las figuras 1 y 2 donde se observa la actividad fungicida de la quitinasa sobre los hongos *F?sarium proliferatum* y *Aspergillus ochraceus* respectivamente.

ES 2 343 665 A1

Ejemplo 4

Cuantificación de la sobreproducción de quitinasa

5 La actividad de la quitinasa producida por la bacteria recombinante se valoró por ensayo de sobrenadantes de los cultivos de la bacteria productora en crudo utilizando el sustrato cromogénico chitin-azure (Sigma) en buffer 0.1 M fosfato a pH 6.9 durante 3 h en un volumen final de 2 ml y estimación de la liberación del cromógeno en el espectrofotómetro a una densidad óptica de 560 nm. Una unidad de quitinasa se define como el incremento de 0.01 en la medida de densidad óptica. La bacteria recombinante produce hasta 4 veces más quitinasa activa que la bacteria control que propaga el plásmido vector sin el gen insertado.

10 Además, se comprobó la presencia de la quitinasa en el medio extracelular mediante geles de electroforesis PAGE-SDS al 10% observando una banda mayoritaria de 31 kDa de masa molecular relativa que estaba ausente en las fracciones equivalentes de la bacteria no sobreproductora y que corresponde con el tamaño molecular esperado para la quitinasa extracelular madura.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 343 665 A1

REIVINDICACIONES

5 1. Polipéptido codificado por un polinucleótido que presenta al menos un 70% o un 80% o un 90% de homología con SEQ ID 1 o que consiste esencialmente en SEQ ID 1.

2. Construcción génica que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica al polipéptido como se define en la reivindicación anterior y:

10 a. una secuencia polinucleotídica que comprende SEQ ID NO 2,

b. moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
o

15 c. moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

3. Plásmido recombinante que comprende:

20 - una construcción génica según la reivindicación anterior,

- el gen cat,

25 - el origen de replicación del plásmido pRM1cat de *E. coli* y del plásmido pPCT2 para *B. subtilis*,

- un gen repórtier de promotores, y

- un gen de resistencia a kanamicina.

30 4. Método de obtención de un polipéptido según la reivindicación 1 que comprende:

35 a). Introducir una construcción génica según la reivindicación 2 o un plásmido recombinante según la reivindicación 3, en una célula hospedante e

b). Incubar la célula hospedante obtenida en a) en un medio de cultivo adecuado.

40 5. Método según la reivindicación anterior, que además comprende purificar el polipéptido obtenido.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el que la célula hospedadora se selecciona del grupo que comprende *E. coli* y *B. subtilis*.

45 7. Uso de un polipéptido según la reivindicación 1 para la preparación de un fármaco con actividad quitinasa.

8. Uso de un polipéptido según la reivindicación 1 para la preparación de un fármaco con actividad fungicida.

50

55

60

65

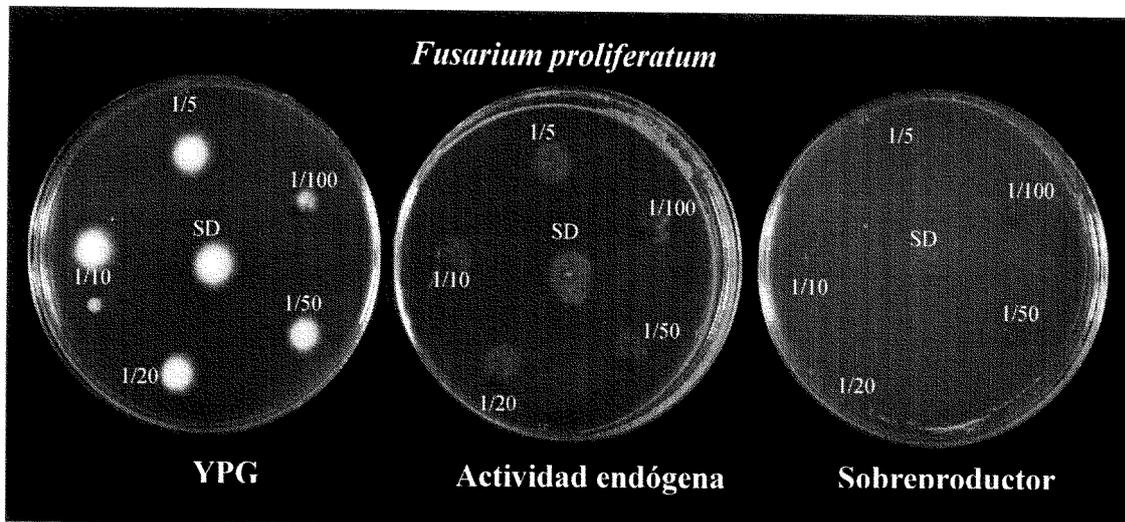


FIG 1

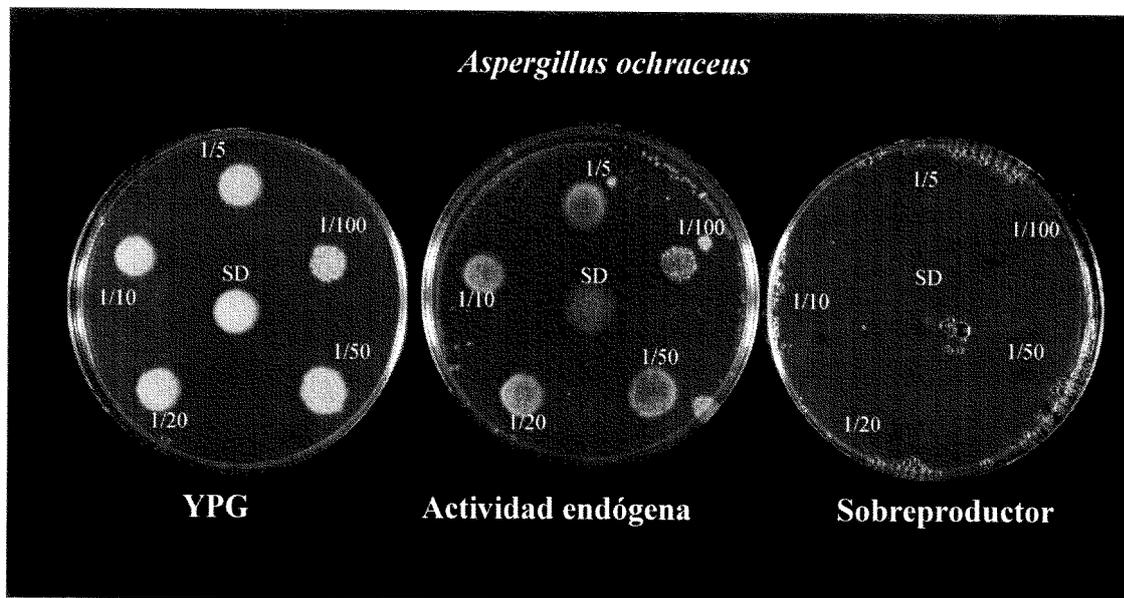


FIG 2

ES 2 343 665 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> NUEVA QUITINASA DE ORIGEN BACTERIANO CON AMPLIO ESPECTRO FUNGICIDA

<130> ES1641.5

10 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 1032

<212> DNA

20 <213> *Bacillus subtilis* 168

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (1)..(1032)

<223> *B. subtilis* 168|BG14090|yvbX: 1032 bp - unknown; similar to unknown proteins

<400> 1

30

atgaaaaaat ggctgatcat agcggtttca ctggcgattg cgattgttct gtttatgtat 60

acaaaaggag aagcgaaggc agccggtatg acagtaggct acacgactgg ggatacggct 120

35

tcatacaatt ctcttacgaa atatcataca tacatgaatg ccatcgcaac cgatacattt 180

gcgtttgaaa aaaacggaca aatcattggc gatgccccaa ctaagcagct gacatatgcg 240

40

aaaaagaaaa aatcaagac atgggctgct atttcaaact ataatgatgc cttttatgat 300

tttgacggag atttagcgag tcgggtcatg agcaataaaa cagcgaaaaa acgattcaca 360

gatcagttaa ttactactggc caaaaagcac tcatattacg gaatcaatat cgattttgaa 420

45

gcagtaaadc cagaagaccg cgctgcatac tcgaacttca ttcaatatgt ctcacaggct 480

ttgaataaga aacatattaa aacaatggta tccgttccgg ccaaaagcgc cgatgataaa 540

50

aatgatgact ggagctggcc gtatgattat gcgaaaatcg gcaaatatgc cgacttcgta 600

caagtcatga cctacgatga acacggcatt tggggtgagc cggggtcagt ggcaagcaca 660

aactggatca aaagctctct gcagttttca gtcaaaaaga tcaaagccaa taaagtcatc 720

55

atgggaatcc ctgctgacgg ctatgactgg gatgtaaaag acggaagtac cagcacaata 780

agggaatgga atgagctcaa atccctcatc aaaaaacaaa aagcaaagcc ggcattcaac 840

60

aaaaaatcag gctcgatgac gttttcttat gttgacaaaa agaagcataa acatgtcgtg 900

tggtatgaaa acgaaaaaac cgttcaaacg aaaagccatc tggcaaagca atataaaata 960

gcaggtgttt cagtttacgc attaggaaac gagtcagaat ccttttgtaa agccattcga 1020

65

aaagggacaa aa 1032

ES 2 343 665 A1

<210> 2
 <211> 295
 <212> DNA
 5 <213> *Bacillus subtilis* 168

 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(295)
 <223> secuencia del promotor csn

 <400> 2
 15
 gtaggctttg catgggacgt tgcggaatct ggcattctca tcttgcttgc cattacatca 60
 cctccctaac gattttcgat gatcacttcc attataaaat agagtaaagc cttatggcat 120
 20 cttgtaatg aaagttgaag cagtatgaaa atcaaggac cttcccagtg agaggggcta 180
 aggctgattg gcaatgaata gagtaagatt caagctatat tacttttagat tcaaaatatt 240
 25 gacaaattga tgtattttca acaatagggc agtttcttca tgtatactga gtctg 295

 <210> 3
 30 <211> 445
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis* 168

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(445)
 <223> fragmento de DNA de 445 nucleótidos obtenido a partir de la secuencia de DNA de la región cromosómica de
 40 *Bacillus subtilis* 168 comprendida entre las bases 2.748,117 y 2.748,562 de la secuencia publicada por Kunst
 et al.

 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (1)..(445)
 <223> fragmento de DNA de la región cromosómica comprendida entre las bases 2.748,117 y 2.748,562

 50 <400> 3

 gtaggctttg catgggacgt tgcggaatct ggcattctca tcttgcttgc cattacatca 60
 55 cctccctaac gattttcgat gatcacttcc attataaaat agagtaaagc cttatggcat 120
 cttgtaatg aaagttgaag cagtatgaaa atcaaggac cttcccagtg agaggggcta 180
 aggctgattg gcaatgaata gagtaagatt caagctatat tacttttagat tcaaaatatt 240
 60 gacaaattga tgtattttca acaatagggc agtttcttca tgtatactga gtctgattt 300
 acaatattta gaaaggggaa gtgaaatgaa aatcagtatg caaaaagcag atttttggaa 360
 65 aaaagcagcg atctcattac ttgttttcac catgtttttt accctgatga tgagcgaaac 420
 ggtttttgcg gcgggactga ataaa 445

ES 2 343 665 A1

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> CEBADOR

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (1)..(25)

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (1)..(25)
<223> prcsn1 (cebador directo)

<400> 4
25 gtaggcttg catggsacg ttgcg

25

<210> 5
30 <211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> CEBADOR

<220>
40 <221> misc_feature
<222> (1)..(29)

<220>
45 <221> misc_feature
<222> (1)..(29)
<223> prcsn2 (cebador inverso)

50 <400> 5
cagactcagt atacatgaag aaactgccc

29

55 <210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> CEBADOR

65 <220>
<221> misc_feature

ES 2 343 665 A1

<222> (1)..(23)

<220>

5 <221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> Yvbx2 Oligonucleótido

10 <400> 6

 tgacttgata caggaggaaa tgc 23

15 <210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CEBADOR

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)

35 <223> Yvbx1h oligonucleótido

<400> 7

40 gcggtttaac gtttgattgt cg 22

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 343 665

② N° de solicitud: 200802500

③ Fecha de presentación de la solicitud: 27.08.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KUNST, F. et al. "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium <i>Bacillus subtilis</i> ". NATURE. 20.11.1997. Vol. 390, páginas 249-256; gen yvbX.	1
X	KEARNS, D.B. et al. "Cell population heterogeneity during growth of <i>Bacillus subtilis</i> ". GENES & DEVELOPMENT. 16.12.2005. Vol. 19, N°. 24, páginas 3083-3094; tabla 1, gen yvbX.	1,7
Y		8
Y	US 6280722 B1 (MOAR, W.J.) 28.08.2001, resumen.	8
Y	GOHEL, V. et al. "Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms". AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 16.01.2006. Vol. 5, N°. 2, páginas 54-72; resumen y tabla 7.	8
A	PARRO, V. et al. "A 23911 bp region of the <i>Bacillus subtilis</i> genome comprising genes located upstream and downstream of the lev operon". 01.04.1997. Vol. 143, N°. 4, páginas 1321-1326; todo el documento.	2,3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.11.2009

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 15/75 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

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

C12N, C12P, A01N, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, HCAPLUS, EMBL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.11.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2-6, 8	SÍ
	Reivindicaciones	1, 7	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2-6	SÍ
	Reivindicaciones	1, 7, 8	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.

Consideraciones:

La invención reivindica el producto del gen yvbX de Bacillus subtilis, que presenta actividad quitinasa y fungicida; también forma parte de la invención un plásmido pCyvbx, obtenido a partir del plásmido pCSN73 cuya obtención también se describe en la memoria y el procedimiento de obtención de la quitinasa producto del gen yvbX a partir del plásmido pCyvbx.

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	KUNST, F. et al. "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium <i>Bacillus subtilis</i> ". NATURE. 20.11.1997. Vol. 390, páginas 249-256. .	20-11-1997
D02	Kearns, D.B. et al. "Cell population heterogeneity during growth of <i>Bacillus subtilis</i> ". GENES & DEVELOPMENT. 16.12.2005. Vol. 19, N°. 24, páginas 3083-3094.	16-12-2005
D03	US 6280722 B1 (MOAR, W.J.)	28-08-2001
D04	Gohel, V. et al. "Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms". AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 16.01.2006. Vol. 5, N°. 2, páginas 54-72.	16-01-2006
D05	Parro, V. et al. "A 23911 bp region of the <i>Bacillus subtilis</i> genome comprising genes located upstream and downstream of the lev operon". 01.04.1997. Vol. 143, N°. 4, páginas 1321-1326.	01-04-1997

Observaciones sobre documentos:

El documento D01, presenta la secuencia completa del genoma de *Bacillus subtilis*.

En el documento D02, se identifica el producto del gen *yvbX* de *Bacillus subtilis* como similar a quitinasa. En los documentos D03 y D04, se presentan ejemplos de la relación que existe entre la actividad quitinasa y el efecto antifúngico de distintas quitinasas producidas por microorganismos.

El documento D05, publicación de los solicitantes, describe una región del genoma de *Bacillus subtilis* que incluye al operón *lev*, que codifica 25 proteínas no relacionadas con la quitinasa de la invención; por tanto, dicho documento está relacionado con el estado general de la técnica.

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

El documento D01, presenta la secuencia completa del genoma de *Bacillus subtilis*. La SEQ ID n° 1, ha sido secuenciada y por lo tanto dicha secuencia y el polipéptido codificado por ella, no son nuevos.

En la tabla 1 del documento D02, se identifica el producto del gen *yvbX* de *Bacillus subtilis* como similar a quitinasa; por tanto, la reivindicación 7 carece de novedad. Las reivindicaciones 1 y 7, no cumplen el requisito de novedad de acuerdo al Art. 6 de la LP.

ACTIVIDAD INVENTIVA

En los documentos D03 y D04, se presentan ejemplos de la relación que existe entre la actividad quitinasa y el efecto antifúngico de distintas quitinasas producidas por microorganismos. Teniendo en cuenta esta relación, no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia, examinar la actividad antifúngica de una quitinasa ya conocida (el producto del gen *yvbX*). Por consiguiente, la reivindicación 8 carece de actividad inventiva y no cumple el requisito de actividad inventiva de acuerdo al artículo Art. 8 de la LP.

El plásmido *pCyvbX* y el procedimiento de obtención de la quitinasa de *Bacillus subtilis* utilizando dicho plásmido, son nuevos; por tanto, las reivindicaciones 2-6 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo a los Art. 6 y 8 de la LP.