



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 310**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/56** (2006.01)  
**C12P 21/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03758896 .9**  
96 Fecha de presentación : **24.10.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1561807**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.08.2005**

54 Título: **Procedimiento de degradación de una proteína difícilmente degradable.**

30 Prioridad: **24.10.2002 JP 2002-309248**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.04.2011**

73 Titular/es: **MEIJI SEIKA KAISHA Ltd.**  
**4-16, Kyobashi 2-chome**  
**Chuo-ku, Tokyo 104-8002, JP**

72 Inventor/es: **Miwa, Takehiro;**  
**Nishizawa, Koji;**  
**Hayashi, Yoshie;**  
**Watanabe, Manabu;**  
**Murayama, Yuichi;**  
**Yoshioka, Miyako y**  
**Miura, Katsuhiko**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 310 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****CAMPO TÉCNICO**

La presente invención se refiere a un agente para digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína prión patógena) y un procedimiento para digerir la proteína.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Una proteína prión patógena en enfermedades tales como temblor en ovejas o ratones, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) en seres humanos, y encefalopatía bovina esponjiforme (BSE; popularmente conocida como la enfermedad de las vacas locas) en ganado da lugar a síntomas nerviosos tal como distasia o disbasia. Hay que observar que el consumo humano de carne de vaca infectada con la proteína prión patógena puede provocar una variante de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) por infección. En particular, la BSE es una enfermedad extremadamente grave a la luz de un suministro seguro de carne de vaca para el consumo humano.

Tales enfermedades se pueden desarrollar cuando la proteína prión patógena transferida en el cuerpo humano desde el exterior provoca un cambio conformacional de una proteína prión normal en general localizada en el cerebro [Nature, (Gran Bretaña), 1994, Vol. 370, p. 471 (referencia no patente 1)]. Para evitar el desarrollo de la enfermedad por una infección de la proteína prión patógena, es necesario digerir y destoxificar la proteína prión patógena como una causa de la misma hasta el grado que la enfermedad no se desarrolle.

Sin embargo, la proteína prión patógena se cree que es extremadamente estable cuando se somete a un tratamiento de esterilización usado comúnmente (tal como ebullición) y muestra o poca o ninguna pérdida de infectividad por el tratamiento de esterilización. Además, aunque el patógeno sea una proteína, no es difícil digerir el patógeno completamente con una proteasa de manera convencional. En estas circunstancias, se desean un procedimiento para digerir la proteína prión patógena de manera eficaz y un procedimiento para prevenir que las enfermedades se desarrollen por infección.

Como un procedimiento para digerir una proteína altamente resistente a la desnaturalización y degradación tal como una proteína prión patógena, por ejemplo, la Publicación de Patente No examinada Japonesa (Kokai) N° 6 - 46871 (referencia de patente 1) describe un procedimiento para digerir proteínas que contienen queratina altamente resistentes a proteasas convencionales, usando queratinasa, una proteasa, derivada de *Bacillus licheniformis* PWD-1. La publicación describe que la queratinasa se usa en la digestión de las proteínas que contienen queratina (por ejemplo, pelo animal, pelo humano, o plumas), pero ni describe ni sugiere ningún efecto de la queratinasa sobre una proteína prión patógena.

A este respecto, se obtuvo un ADN que codifica la queratinasa derivada de *Bacillus licheniformis* PWD-1 [Publicación Internacional No examinada (Kohyo) N° 10 - 500863 (referencia de patente 2)].

Además, la Patente de Estados Unidos N° 6.613.505 (referencia de patente 3) describe que la queratinasa derivada de *Bacillus licheniformis* PWD-1 se usa en la digestión de una proteína príon patógena altamente resistente a desnaturalización y degradación. Sin embargo, para reducir o digerir la proteína príon patógena mediante el procedimiento descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.613.505, dos etapas de tratamiento, esto es, un tratamiento por calor como un pretratamiento, y un tratamiento de enzima, son necesarios. En este procedimiento, es necesario un aparato para calentar si es necesario, y de este modo no es fácil llevar a cabo el procedimiento en instalaciones comunes sin tal aparato de calentamiento. Además, los procedimientos de dos etapas se complican.

Además, la Publicación Internacional N° 02/053723 (referencia de patente 4) describe que una proteasa resistente al calor se usa en la digestión de una proteína príon patógena. Sin embargo, describe que cuando una proteína príon patógena se digirió por una proteasa derivada de *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko descrita en sus Ejemplos, la proteína príon patógena no se digirió suficientemente con la proteasa sola, pero no se digirió suficientemente con la proteasa en la presencia de dodecil sulfato sódico. Además, es necesaria una sal neutra para activar la proteasa. Además, la proteasa requiere un ion metálico, y de este modo cuando está presente un agente quelante en una reacción, la actividad disminuye notablemente.

(referencia de no patente 1) *Nature*, (Gran Bretaña), 1994, Vol. 370, p. 471

(referencia de patente 1) Publicación de Patente Japonesa no Examinada (Kokai) N° 6-46871

(referencia de patente 2) Publicación Internacional No examinada (Kohyo) N° 10-500863

(referencia de patente 3) Patente de Estados Unidos N° 6.613.505

(referencia de patente 4) Publicación Internacional N° 02/053723

El documento *W098/30682A1* describe una enzima que es adecuada para el cuidado de la piel y describe con subtilisina DY (SEC ID N°: 3) una enzima que es idéntica a la enzima que se usa de acuerdo con esta solicitud. La subtilisina DY se especifica como una proteasa. El documento *W002/083082A2* describe una queratinasa PWD-1 para digerir las proteínas de priones.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para destoxificar una proteína príon patógena, usando una enzima.

Los presentes inventores encontraron una enzima que muestran una actividad extremadamente alta de digerir una proteína fuertemente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena) derivada de un microorganismo que pertenece al género *Bacillus*, en comparación con las enzimas conocidas para digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación.

La enzima que se puede usar en la presente invención mostró excelentes propiedades, como se muestra en los Ejemplos descritos más adelante, en comparación con las enzimas mencionadas anteriormente reseñadas previamente para usar en la digestión de una proteína príon patógena, por ejemplo, la enzima (queratinasa) preparada a partir de *Bacillus licheniformis* PWD-1 descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.613.505, y la enzima preparada a partir de *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko descrito en la Publicación Internacional N° 02/053723.

Particularmente, se encontró que la enzima que se puede usar en la presente invención mostró una actividad extremadamente alta de digerir una proteína príon patógena en comparación con la enzima preparada a partir de *Bacillus licheniformis* PWD-1 (véanse los Ejemplos 7 y 8). Además, sorprendentemente se encontró que la proteína se digirió sin un tratamiento térmico descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.613.505 (véanse los Ejemplos 7 y 8).

En comparación con la enzima preparada a partir de *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko, se encontró que la enzima que se puede usar en la presente invención mostró una actividad extremadamente alta de digerir una proteína príon patógena (véanse los Ejemplos 9 to 11). Además, sorprendentemente se encontró que la proteína mostró una excelente actividad de digerir una proteína príon patógena independientemente de la presencia de dodecil sulfato sódico (véanse los Ejemplos 9 a 11).

La presente invención se refiere a un procedimiento ex vivo para digerir una proteína príon patógena, que comprende la etapa de poner en contacto la proteína príon patógena con una enzima seleccionada entre el grupo constituido por una enzima que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y una enzima homóloga que muestra una actividad de digerir la proteína príon patógena, y que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen un 95% o más de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

Además, la invención se refiere al uso ex vivo de la enzima descrita anteriormente para digerir una proteína príon patógena.

Finalmente, la invención se refiere a un procedimiento ex vivo para destoxificar una proteína príon patógena, que comprende la etapa de poner en contacto una

materia sujeto que se puede contaminar con una proteína prión patógena con la enzima descrita anteriormente

5 La enzima usada en la invención muestra una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación y tiene las siguientes propiedades: (a) actividad y especificidad de sustrato: hidrolizar un enlace peptídico de una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación, (b) peso molecular: 31.000 (determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS usando un gel homogéneo que tiene una concentración de gel de 12%), (e) punto isoelectrico: pI 9,3 (determinado por electroforesis de enfoque isoelectrico en gel de 10 poliacrilamida), (d) pH óptimo: pH 9,0 a 10,0, y (e) temperatura óptima para actividad: 60 a 70°C

#### BREVE DESCRIPCIÓNN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 es un gráfico que muestra el pH óptimo y pH estable de una enzima purificada usada en la presente invención a 37°C.

15 Figura 2 es un gráfico que muestra la temperatura óptima de una enzima purificada usada en la presente invención a pH 9,0.

Figura 3 muestra los resultados en los que la proteína prión patógena de ratón se digirió con una enzima purificada usada en la presente invención.

20 Figura 4 muestra los resultados en los que la proteína prión patógena de ratón se digirió con la composición A de enzima usada en la presente invención.

Figura 5 muestra los resultados en los que la proteína prión patógena de oveja se digirió con la composición A de enzima usada en la presente invención.

Figura 6 muestra los resultados en los que la proteína prión patógena de ratón se digirió con la composición A de enzima usada en la presente invención.

25 Figura 7 muestra los resultados en los que la proteína prión patógena de hámster (cepa SC237) se digirió con la composición A' de enzima usada en la presente invención o termoasa para comparación.

30 Figura 8 muestra los resultados en los que la proteína prión patógena de hámster (cepa SC237) se digirió en la presencia de SDS con la composición A' de enzima usada en la presente invención o termoasa para comparación.

Figura 9 muestra los resultados en los que la proteína prión patógena de hámster (cepa SC237) adherida sobre poliestireno se digirió con la composición A' de enzima usada en la presente invención o termoasa para comparación.

#### MODO MEJOR PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

35 La presente invención se explicará en detalle de aquí en adelante.

La enzima usada en la presente invención muestra una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación, esto es, una

actividad hidrolítica de enlaces peptídicos en la proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación.

El término "proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación" como se usa en el presente documento significa una proteína que no se digiere fácilmente con la proteasa usada comúnmente tal como proteinasa K o tripsina. Más particularmente, significa una proteína que no se digiere completamente cuando se digiere con 1 µg/ml de proteinasa K a 37°C durante 1 hora. Como la proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación, se pueden mencionar, por ejemplo, una proteína príon patógena, queratina, colágeno, o elastina.

El término "proteína príon patógena" como se usa en el presente documento significa una proteína que está implicada en la aparición, por ejemplo, de temblor, CJD, o BSE, más particularmente, una proteína príon cambiada de manera conformacional a partir de un príon normal localizado normalmente en el cerebro. La proteína príon patógena incluye proteína derivada de, por ejemplo, un ser humano, hámster, ratón, bovino, u oveja.

La proteína príon normal y la proteína príon patógena tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero es diferente en sus estructuras terciarias. En la proteína príon normal, el contenido de la estructura  $\alpha$ -hélice en la que la cadena polipeptídica de la proteína príon toma una forma de espiral es alta, y el contenido de la estructura de lámina  $\beta$  en la que la cadena polipeptídica toma una forma plana es baja. En la construcción, la proteína príon patógena contiene un alto contenido de estructura de lámina  $\beta$  (Pan, PNAS, 90, 10962, 1993). Además, cada proteína príon derivada de los animales anteriores tiene una alta homología entre sus secuencias de aminoácidos, y muestra la misma propiedad en la que el cambio conformacional de la proteína príon normal provoca el cambio a la proteína príon patógena altamente resistente a desnaturalización y degradación.

La proteína príon patógena que se considera que es un patógeno de las enfermedades anteriores es extremadamente estable cuando se somete a un tratamiento esterilizante general como ebullición, y de este modo muestra poca o ninguna infectividad mediante tal tratamiento esterilizante. Además, mientras que la proteína príon normal se digiere fácilmente, y de este modo su semivida en el cuerpo es aproximadamente 2 horas, la proteína príon patógena tiene una semivida de 24 horas o más, y es altamente resistente a digestión. Cuando las digestibilidades de las proteínas de priones normales y patógenas a proteasas convencionales tal como proteinasa K comercialmente disponible se evaluaron. Se reseñó que la proteína príon normal era fácilmente digerible y era sensible, pero la proteína príon patógena mostraba una baja digestibilidad y era altamente resistente a digestión (Prusiner,

Science, 252, 1515, 1991). Se consideró que la diferencia en la digestibilidad se debe a diferencia en las estructuras terciarias como se ha descrito anteriormente.

5 La proteína príon normal se puede distinguir de la proteína príon patógena, por ejemplo, utilizando la diferencia en digestibilidad con una proteasa. Por ejemplo, un tejido derivado de un animal que puede estar contaminado con la proteína príon patógena se homogeniza para preparar una suspensión homogénea. La suspensión se trata con una proteasa usada de manera común tal como proteinasa K, y se analiza mediante transferencia de Western (Burnette, Anal. Biochem., 112, 195, 1981) para detectar la proteína príon. Cuando no se detecta ninguna banda, se puede juzgar que el tejido contiene solamente la proteína príon normal. Cuando se detecta una banda de proteína resistente a la proteasa, se puede juzgar que el tejido contiene la proteína príon patógena.

10 El término "actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación" como se usa en el presente documento significa una actividad hidrolítica de enlaces peptídicos en la proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación. Como una unidad de "actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación", se usan en el presente documentos dos unidades diferentes. En la primera unidad, "unidad 1" de una enzima se define como una cantidad de la enzima que puede generar un producto que corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de glicina por minuto, cuando una suspensión que contiene 0,5% (como una concentración final) de polvo de queratina (derivado de pelo humano; Nacalai Tesque) se trata con la enzima a pH 8,0 y 60°C durante 1 hora. En la segunda unidad, "1 unidad" de una enzima se define como 0,001 de una cantidad de absorbancia cambiada, cuando una suspensión que contiene 0,8% (como una concentración final) de azul de queratina (Sigma) se trata con la enzima a pH 8,0 y 37°C durante 16 horas, y una cantidad de un pigmento liberado a un sobrenadante de la mezcla de reacción por minuto se mide a una absorbancia de 595 nm.

20 A este respecto, el azul de queratina es un compuesto en el que el pigmento azoico está unido a queratina (por ejemplo, queratina derivada de lana). El azul de queratina se usa ampliamente como una sustancia para medir una actividad (Es decir, una actividad de queratinasa) de digerir queratina, una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación, debido a que el aminoácido unido a pigmento azoico o un péptido unido a pigmento azoico liberado por la digestión de los enlaces peptídicos en queratina se puede medir espectroscópicamente.

30 La "actividad de digerir una proteína príon patógena" como se usa en el presente documento significa una actividad hidrolítica de enlaces peptídicos en la proteína príon patógena. Un grado de la resistencia de la "actividad de digerir una proteína príon patógena" se puede juzgar, por ejemplo, analizando una digestión de la

proteína príon patógena contenida en una suspensión que contiene 1% de un tejido de cerebro derivado de un ratón que padece temblor.

Más particularmente, un tejido de cerebro derivado de un ratón infectado con la proteína príon patógena se homogeniza para preparar a suspensión homogénea, y la suspensión se trata con una enzima o composición de enzima que se va a juzgar. Las proteínas contenidas en la mezcla de reacción mixture se separan mediante electroforesis, y la proteína príon se detecta mediante transferencia de Western. Cuando no se detecta ninguna banda, el resultado muestra que la enzima o composición de enzima que se va a juzgar muestra una actividad extremadamente alta de digerir una proteína príon patógena. Cuando se detecta una banda de proteína resistente a la proteasa y la banda es delgada, el resultado muestra que la enzima o composición de enzima muestra una actividad moderada de digerir una proteína príon patógena. Cuando la banda de proteína es densa, el resultado muestra que la enzima o composición de enzima muestra una baja actividad de digerir una proteína príon patógena.

Proteína que muestra una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena)

En la presente invención, por ejemplo, se puede usar una enzima que tiene las siguientes propiedades.

(a) Actividad y especificidad de sustrato

La enzima hidroliza uno o más enlaces peptídicos de una proteína, particularmente uno o más enlaces peptídicos de una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (tal como una proteína príon patógena). Como a la especificidad de sustrato, la enzima muestra altas actividades de digestión de caseína, colágeno, elastina, y queratina, así como la proteína príon patógena.

(b) Peso Molecular

El peso molecular determinado por una electroforesis en gel de poliacrilamida - usando un 12% de gel homogéneo (es decir, un gel homogéneo en el que la concentración de poliacrilamida es 12%) es aproximadamente 31.000.

El peso molecular determinado por una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS usando un 15% de gel homogéneo (es decir, un gel homogéneo en el que la concentración de poliacrilamida es 15%; tal como un gel fabricado por ATTO) es aproximadamente 26.000.

(c) Punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico (pI) determinado por una electroforesis de electroenfoque isoeléctrico de gel de poliacrilamida es aproximadamente 9,3.

(d) pH óptimo y pH estable

El pH óptimo, evaluado por una actividad de digerir azul de queratina como un índice, es aproximadamente pH 9,0 a 10,0. La enzima muestra una actividad estable a aproximadamente pH 7,0 a 12,0, y una alta actividad a aproximadamente pH 8,0 a 10,5.

5 (e) Temperatura óptima para actividad

La temperatura óptima para actividad, evaluada por una actividad de digerir azul de queratina como un índice, es aproximadamente 60 a 70°C.

(f) pH de desactivación

10 La enzima se inactivó a aproximadamente pH 5 o menos, cuando se evaluó por una actividad de digerir azul de queratina como un índice.

En la tabla 1, se muestran las propiedades anteriores de la enzima que se puede usar en la presente invención en comparación con las de una proteasa conocida que muestra una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (queratinasa derivada de *Bacillus licheniformis* PWD-1).

15

Tabla 1

Enzima usada en la presente invención      Proteasa conocida

Actividad y especificidad de sustrato

	proteína príon patógena	++	+
20	caseína	+	+
	colágeno	+	+
	elastina	+	+
	queratina	+	+
	Peso molecular	31.000	33.000
25	Punto isoeléctrico	9,3	7,25
	PH óptimo	9,0 a 10,0	7,5
	Temperatura óptima	60 a 70°C	50°C

30

En otra realización de la presente invención, se puede usar una enzima que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, o su enzima modificada u homóloga.

35

La "enzima que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2" incluye, por ejemplo, una enzima que consta de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2;

una enzima de fusión que consta de una secuencia de aminoácidos en la que una secuencia de marcador apropiada se añade al extremo N y / o al extremo C del polipéptido que consta de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, y que

muestra una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena); una enzima de fusión que consta del polipéptido que consta de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y una pareja para la fusión, y que muestra una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena); y una enzima que consta de una secuencia de aminoácidos en la que se añade una presecuencia (secuencia de señal) o su fragmento se añade al extremo N de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2. Además, una enzima de fusión que consta de una secuencia de aminoácidos en la que una secuencia marcadora adecuada y / o una pareja apropiada para fusión se añade además a la secuencia de aminoácidos en la que una presecuencia se añade al extremo N de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, se incluye en la "enzima que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2".

Como presecuencia, se puede usar una presecuencia de origen natural o una secuencia diseñada artificialmente. Al igual que la presecuencia de origen natural, no solamente se puede usar una presecuencia derivada de *Bacillus licheniformis* (particularmente una presecuencia de una enzima derivada de *Bacillus licheniformis* capaz de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación), sino también una presecuencia derivada de los organismos diferentes de *Bacillus licheniformis*.

Como secuencia marcadora, se puede usar por ejemplo, una secuencia para llevar fácilmente una confirmación de expresión de polipéptido, una confirmación de su localización intracelular, o su purificación. Como la secuencia, se puede mencionar, por ejemplo, una marca FLAG, una marca hexa-histidina, una marca hemaglutinina, o un epítoto myc.

Como pareja de fusión, se puede mencionar, por ejemplo, un polipéptido para purificación [por ejemplo, glutatión S-transferasa (GST) o un fragmento de la misma], un polipéptido para la detección [por ejemplo, hemaglutinina o  $\beta$ -galactosidasa ex péptido (LacZ *ex*), o un fragmento de la misma], o un polipéptido para expresión (por ejemplo, una secuencia de señal).

En el polipéptido de fusión anterior, una secuencia de aminoácidos que se puede digerir específicamente con una proteasa tal como trombina o factor Xa se puede insertar entre el polipéptido que consta de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y la secuencia marcadora o pareja para fusión.

El término "enzima modificada" como se usa en el presente documento significa una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o aminoácidos plurales (por ejemplo, uno o varios) están suprimidos, sustituidos, o añadidos en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, y que muestran una

actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena). A este respecto, el número de aminoácidos a modificar, tal como "suprimido, sustituido, o añadido", es preferiblemente 1 a 30, más preferiblemente 1 a 10, lo más preferiblemente 1 a 6.

5 La "enzima modificada" incluye una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos uno o aminoácidos plurales (por ejemplo, uno o varios) están sustituidos de manera conservadora en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, y que muestra una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena). El término "sustitución conservadora" como se usa en el presente documento significa que uno o restos de aminoácidos plurales contenidos en una proteína están reemplazados con diferentes aminoácidos que tienen similares propiedades químicas de manera que las actividades de la proteína no están sustancialmente cambiadas. Como la sustitución conservadora, se pueden mencionar, por ejemplo, una sustitución de un resto hidrófobo por otro resto hidrófobo, o una sustitución de un resto polar por otro resto polar que tiene la misma carga. Los aminoácidos que tienen propiedades químicas similares y pueden estar sustituidos de manera conservadora entre sí se conocen por los expertos en la técnica.

10 Más particularmente, como aminoácidos no polares (hidrófobos), se pueden mencionar, por ejemplo, alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, triptófano, fenilalanina, o metionina. Como aminoácidos polares (neutros), se pueden mencionar, por ejemplo, glicina, serina, treonina, tirosina, glutamina, asparagina, o cisteína. Como aminoácidos básicos que tienen una carga positiva, se pueden mencionar, por ejemplo, arginina, histidina, o lisina. Como aminoácidos ácidos que tienen una carga negativa, pueden mencionar, por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico.

15 El término "proteína homóloga" como se usa en el presente documento significa una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 85% o más (preferiblemente 90% o más, más preferiblemente 95% o más, todavía además preferiblemente 98% o más, lo más preferiblemente 99% o más) homología con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, y que muestra una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena). El término "homología" como se usa en el presente documento significa un valor obtenido por un programa conocido para una investigación de homología, BLAST (Herramienta de Investigación de Alineación Local Básica; Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403 - 410, 1990; obtenido a partir del Centro Nacional Para información de Biotecnología).

20 La enzima que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, o su enzima u homóloga muestra una actividad de digerir una proteína altamente

resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena) de preferiblemente 2 U/g o más, más preferiblemente 2 to 500 U/g, incluso además preferiblemente 10 a 500 U/g, lo más preferiblemente 20 a 500 U/g, como una actividad de digerir azul de queratina. Cuando se usa una actividad de digerir polvo de queratina como un índice, es preferiblemente 1 U/g o más, más preferiblemente 1 a 5000 U/g, lo más preferiblemente 5 a 3000 U/g.

El origen de la enzima usada en la presente invención no se limita particularmente, mientras que sea una enzima que tenga las propiedades físicas y químicas anteriormente mencionadas, una enzima que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, o una enzima modificada u homóloga de la misma. Por ejemplo, se pueden usar enzimas derivadas de animales, plantas, o microorganismos. Una enzima producida por un microorganismo que pertenece al género Bacillus es preferible, es más preferible una enzima producida por Bacillus licheniformis, y lo más preferible es una enzima producida por Bacillus licheniformis MSK-103 (FERM BP-08487). Además, se puede usar un mutante derivado de los microorganismos.

#### Depósito de microorganismo

Bacillus licheniformis MSK-103 (FERM BP-08487) se depositó de manera local en el Internacional Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) el 16 de octubre de 2002, y se transfirió a un depósito internacional el 16 de septiembre de 2003. El número de depósito internacional (un número entre paréntesis [ ] que sigue al número de depósito internacional es un número de depósito local) es FERM BP-08487 [FERM P-19068].

Como la enzima usada en la presente invención, se pueden usar subtilisinas, y es preferible la subtilisina DY (documento W098/30682).

La enzima usada en la presente invención se puede obtener mediante aislamiento y purificación de la enzima de interés de un microorganismo, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1. De manera alternativa, se puede obtener mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de interés en un huésped apropiado mediante técnicas de ingeniería genética, y aislar y purificar la proteína producida, como se describe más adelante.

Para obtener la enzima usada en la presente invención de un microorganismo que produce la enzima, el microorganismo se puede cultivar en las condiciones adecuadas para el microorganismo, y el caldo obtenido, sobrenadante, o microorganismo se puede tratar mediante técnicas conocidas de separación y purificación. De aquí en adelante los procedimientos del cultivo de microorganismo y la

purificación de proteína y se explicarán de acuerdo con una realización que usa Bacillus licheniformis MSK-103 (FERM BP-08487) como microorganismo que produce la enzima usada en la presente invención.

5 Un medio de cultivo [1% de polipeptona, 0,2% de extracto de levadura, y 0,1% de sulfato de magnesio heptahidrato (pH 7,0)] se autoclave mediante un procedimiento convencional, y el medio se inocula con Bacillus licheniformis MSK-103 (FERM BP08487). Se lleva a cabo un cultivo a 37 - 50°C con aireación y agitación durante 24 - 72 horas. El caldo resultante se centrifuga a aproximadamente 3000 g para obtener un sobrenadante que contiene la enzima usada en la presente invención. Si es  
10 necesario, el sobrenadante se concentra hasta 50 veces en un ultrafiltro (corte de peso molecular de 5.000 a 30.000) para obtener un sobrenadante concentrado que contiene la enzima usada en la presente invención.

El sobrenadante anterior o el sobrenadante anterior concentrado contiene diversas sustancias diferentes de la enzima usada en la presente invención, y de este modo la enzima usada en la presente invención se puede además purificar, por  
15 ejemplo, mediante los siguientes procedimientos.

El sobrenadante anterior o el sobrenadante concentrado se filtra con una membrana de microfiltro (tamaño de poro = aproximadamente 0,45 µm) para retirar los microorganismos. Se añade sulfato de amonio al filtrado estéril resultante, hasta una  
20 concentración final de 1 mol/l, y un agente tampón (Tris-HCl) se añade además hasta un pH 8,5 y una concentración final de 50 mmol/l. Para una purificación adicional por una cromatografía hidrófoba, la solución preparada se adsorbe a una columna de fenil sefarosa, y se eluye con un gradiente lineal con sulfato de amonio (1 mol/l a 0 mol/l) en un tampón Tris-HCl, para obtener una fracción que contiene la enzima usada en la  
25 presente invención. La fracción se concentra 20 a 30 veces con un ultrafiltro (corte de peso molecular de 5.000 a 10.000), y se lleva a cabo una cromatografía de filtración en gel, por ejemplo, usando gel Superdex 75 (Pharmacia). La solución concentrada se desarrolla a través del gel con un tampón fosfato (0,025 mol/l, pH 7,0) que contiene 0,1 mol/l de cloruro sódico como eluyente, para obtener la enzima usada en la presente  
30 invención. De acuerdo con los procedimientos de purificación anteriores, la enzima usada en la presente invención se puede purificar como una banda mediante un análisis electroforético.

Polinucleótido que codifica proteína que tiene una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína prión patógena)  
35

Se puede obtener el polinucleótido que codifica la enzima usada en la presente invención, por ejemplo, mediante los siguientes procedimientos. Cuando se proporciona una cierta secuencia de aminoácidos, se puede determinar fácilmente una

secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, los expertos en la técnica pueden seleccionar diversas secuencias de nucleótidos que codifican la enzima usada en la presente invención. El término "polinucleótido" como se usa en el presente documento incluye ADN y ARN, preferiblemente ADN.

5 El polinucleótido que codifica la enzima usado en la presente invención se selecciona típicamente entre el grupo constituido por:

(i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 (preferiblemente un polinucleótido que consta de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1);

10 (ii) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos en la que uno o nucleótidos plurales (por ejemplo, uno o varios) está suprimido, sustituido o añadido en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, y que codifica una proteína que muestra una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena); y

15 (iii) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consta de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, y que codifica una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena).

20 En el polinucleótido descrito en el artículo anterior (ii), el número de nucleótidos a suprimir, sustituir, o añadir es, por ejemplo, 1 a 50, preferiblemente 1 a 30, más preferiblemente 1 a 18, lo más preferiblemente 1 a 9.

25 El término "en condiciones rigurosas" en el artículo anterior (iii) significa las condiciones en las que una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 se hibrida a un polinucleótido que codifica la proteína homóloga mencionada anteriormente, pero la sonda no se hibrida a la que codifica queratinasa derivada de *Bacillus licheniformis* PWD-1 (la Patente de Estados Unidos N° 6.613.505) o una proteasa (tal como termoasa) derivada de *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko.

30 Más particularmente, de acuerdo con un protocolo asociado a un marcado de ADN/ARN directo de ECL y sistema de detección (Amersham), después del que un polinucleótido a ensayar se prehibride a 42°C durante una hora, se añade una sonda marcada que tiene la longitud completa de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, y se lleva a cabo la hibridación a 42°C durante 15 horas. Después de la hibridación, se repite dos veces un tratamiento de lavado con 0,4 o menos de xSSC (1 X SSC; 15 mmol/l de citrato de sodio, 150 mmol/l de cloruro de sodio) que contiene  
35 0,4% de SDS y 6 mol/l de urea a 42°C durante 20 minutos, y se lleva a cabo dos veces un tratamiento de lavado con 5 X SSC a temperatura ambiente durante 10 minutos.

El polinucleótido que codifica la enzima usada en la presente invención incluye un polinucleótido de origen natural. Además, se puede sintetizar el total. Además, la síntesis se puede llevar a cabo usando parte del polinucleótido de origen natural. Típicamente, el polinucleótido se puede obtener mediante rastreo de una genoteca

5 genómica derivada de *Bacillus licheniformis* MSK-103 (FERM BP-08487) de acuerdo con un procedimiento ordinario usado comúnmente en ingeniería genética, por ejemplo, por ejemplo usando una sonda apropiada de ADN diseñada en base a la información de una secuencia de aminoácidos parcial.

#### Vector de expresión y microorganismo transformado

10 La enzima que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, o su enzima modificada u homóloga, que se puede usar en la presente invención, se puede producir mediante un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de manera que la secuencia de nucleótidos se pueda replicar y la enzima se pueda expresar. El vector de expresión se puede

15 construir en base a un vector de autorreplicación (tal como un plásmido), que existe como un elemento extracromosómico y se puede replicar independientemente de la replicación de cromosomas. De manera alternativa, el vector de expresión puede ser un vector que se integra en el genoma del microorganismo huésped y se replica conjuntamente con los cromosomas, cuando el huésped se transforma con el vector.

20 La construcción del vector se puede llevar a cabo mediante procedimientos ordinarios o procedimientos usados comúnmente en ingeniería genética.

Para expresar una proteína que tiene una actividad deseada mediante la transformación de un microorganismo huésped con el vector de expresión, es preferible que el vector de expresión contenga, por ejemplo, un polinucleótido capaz

25 de controlar la expresión, o un marcador genético para seleccionar transformantes, además del polinucleótido que codifica la enzima usada en la presente invención. El polinucleótido capaz de controlar la expresión incluye, por ejemplo, un promotor, un terminador, o un polinucleótido que codifica un péptido de señal. El promotor no está particularmente limitado, mientras que muestre una actividad de transcripción en un

30 microorganismo huésped. El promotor se puede obtener como un polinucleótido que controla la expresión de un gen que codifica una proteína la misma o diferente de la derivada del microorganismo huésped. El marcador genético se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el procedimiento para seleccionar un transformante. Como marcador genético, por ejemplo, se puede usar un gen de resistencia a

35 fármacos o un gen que complementa una mutación autótrofa.

La enzima usada en la presente invención se puede preparar mediante un microorganismo transformado con el vector de expresión. Un sistema huésped - vector se puede usar en la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo,

se puede usar un sistema que utiliza E. coli, Actinomicetos, levaduras, u hongos filamentosos, o un sistema para la expresión de una proteína de fusión que usa tal microorganismo. La transformación de un microorganismo con el vector de expresión se puede llevar a cabo de acuerdo con un procedimiento ordinario.

5 El transformante se cultiva en un medio apropiado, y las células huésped resultantes o cultivo se usa para obtener la enzima aislada usada en la presente invención. El transformante se puede cultivar en las condiciones usadas comúnmente en su cultivo. Además, después del cultivo, la enzima de interés se puede recoger de acuerdo con un procedimiento ordinario en la técnica.

10 El procedimiento óptimo para producir la enzima usada en la presente invención se puede llevar a cabo usando preferiblemente un microorganismo que pertenece al género Bacillus, más preferiblemente Bacillus licheniformis, lo más preferiblemente Bacillus licheniformis MSK-103 (FERM BP-08487) o su mutante.

15 Composición de enzima, y agente para digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación y agente para destoxificar una proteína prión patógena

20 La composición de enzima o agente de enzima usado en la presente invención comprende al menos una enzima (de aquí en adelante denominada "enzima usada en la presente invención") seleccionada entre el grupo constituido por la enzima que tiene las propiedades físicas y químicas mencionadas anteriormente (incluyendo la enzima obtenida por un microorganismo); la enzima que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, y su enzima modificada u homóloga; y mediante cultivo de la enzima mencionada anteriormente .

25 La composición de enzima usada en la presente invención no está particularmente limitada, mientras que contenga como ingrediente activo la enzima usada en la presente invención. La composición de enzima se puede producir mezclando el ingrediente activo con un vehículo o diluyente usado comúnmente en la preparación de una composición de enzima, tal como cargas (por ejemplo, lactosa, cloruro sódico, o sorbitol), tensioactivos, o antisépticos, en una forma deseada tal como polvo o líquido.

30 El contenido de la enzima en la composición de enzima no está particularmente limitado, mientras que su actividad sea suficiente para el propósito. El contenido puede ser 0,01 a 99% en peso, preferiblemente 0,1 a 80% en peso.

35 Con respecto a una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación, es preferible que la composición de enzima muestre 2 U/g o más (más preferiblemente 2 a 500 U/g, todavía además preferiblemente 10 a 500 U/g, lo más preferiblemente 20 a 500 U/g) como una actividad de digerir azul de queratina, o 1 U/g o más (más preferiblemente 1 a 5000 U/g, lo más preferiblemente 5

a 3000 U/g) como una actividad de digerir polvo de queratina. La cantidad de la enzima es suficiente para digerir una proteína príon patógena contenida en 1 ml de un 1% de suspensión que contiene un tejido de cerebro derivado de un ratón que padece temblor.

5            Además de la enzima usada en la presente invención, la composición de enzima usada en la presente invención puede además contener al menos una de las enzimas diferentes de la enzima usada en la presente invención, tal como una proteasa (por ejemplo, queratinasa), lipasa, celulasa, o xilanasas. El uso de las enzimas diferentes de la enzima usada en la presente invención se espera que  
10            desarrolle la eficacia en la digestión de una proteína príon patógena, en comparación con la composición de enzima que contiene la enzima usada en la presente invención sola.

            La enzima usada en la presente invención muestra una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente  
15            una proteína príon patógena). Por lo tanto, la enzima usada en la presente invención, o la composición de enzima usada en la presente invención que contiene la enzima es útil como un ingrediente activo como un agente para digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena), o como un ingrediente activo como un agente para destoxificar una  
20            proteína príon patógena en un sujeto que puede estar contaminado con la proteína príon patógena.

            El agente de la presente invención puede contener como un ingrediente activo la enzima usada en la presente invención sola, o conjuntamente con un vehículo y / o diluyente apropiado. Como vehículo o diluyente, se pueden usar un vehículo o  
25            diluyente convencional que no suprime o inhibe una actividad de la enzima usada en la presente invención, tal como cargas (por ejemplo, lactosa, cloruro sódico, sulfato de sodio, o sorbitol), tensioactivos, o antisépticos,.

            Aunque la forma del agente de la presente invención no está particularmente limitada, es preferible un agente espumante, que se puede disolver rápidamente en  
30            agua mientras forma espuma. La formulación y preparación del agente espumante no están particularmente limitados, pero se puede usar un procedimiento convencional. El agente espumante se puede preparar, por ejemplo, mezclando bicarbonato de sodio, percarbonato de sodio, o similares con un ácido, tales como ácido cítrico, ácido málico, o ácido succínico, o mediante además añadiendo al mismo un agente de  
35            movilización tal como anhídrido silícico u otros ligantes.

Procedimiento para digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena)

La enzima o composición de enzima usada en la presente invención se puede usar sola, o en la forma del agente mencionado anteriormente de la presente invención, para digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena), o para destoxificar una proteína príon patógena en un sujeto que puede estar contaminado con la proteína príon patógena.

Por lo tanto, la presente invención incluye un procedimiento para digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena), usando la enzima o composición de enzima usada en la presente invención, y un procedimiento para destoxificar una proteína príon patógena en un sujeto que puede estar contaminado con la proteína príon patógena, usando la enzima o composición de enzima usada en la presente invención.

El procedimiento de la presente invención para digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación comprende al menos la etapa de poner en contacto la enzima o composición de enzima usada en la presente invención con una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena) o un sujeto que se va a digerir que puede contener la misma. El procedimiento de la presente invención para destoxificación de una proteína príon patógena comprende al menos la etapa de poner en contacto la enzima o composición de enzima usada en la presente invención con un sujeto a destoxificar que puede estar contaminado con una proteína príon patógena.

Como el sujeto a digerir o el sujeto a destoxificar (de aquí en adelante o y simplemente denominados como "sujeto a tratar"), se pueden mencionar, por ejemplo, alimento que puede contener una proteína príon patógena (por ejemplo, carne o harina de hueso, o abono), instrumentos o equipo en los que las superficies pueden estar contaminadas con una proteína príon patógena (por ejemplo, instrumentos o equipo para carnicería, examen, u operaciones), o instalaciones en las que una proteína príon patógena puede estar presente (por ejemplo, un matadero, un establo donde BSE está presente, o un laboratorio para infección).

El sujeto a tratar se puede usar sin precalentamiento o con precalentamiento (por ejemplo, a aproximadamente 100 °C o más, preferiblemente a 95°C o más, más preferiblemente a 90°C o más, lo más preferiblemente a 80°C o más) antes de poner en contacto la enzima usada en la presente invención. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, una digestión o destoxificación suficiente se puede llevar a cabo sin el precalentamiento, y de este modo es preferible que el sujeto a tratar se use sin precalentamiento (por ejemplo, a aproximadamente 100°C o más, a

95°C o más, a 90°C o más, o a o más) antes de poner en contacto la enzima usada en la presente invención. Cuando no se lleva a cabo el precalentamiento, no es necesario un aparato adicional para calentamiento, y se pueden simplificar procedimientos.

5 El procedimiento de poner en contacto la enzima o composición de enzima usada en la presente invención con el sujeto a tratar no está particularmente limitado y se puede seleccionar aproximadamente de acuerdo con el sujeto a tratar, mientras que una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena), que puede estar contenida en el sujeto  
10 a tratar, se pueda digerir mediante la actividad de la enzima usada en la presente invención, Es decir, una actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena).

15 Por ejemplo, cuando el sujeto a tratar está alimentado con pienso que puede contener una proteína príon patógena, el contacto se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante mezcla uniforme de la enzima o composición de enzima usada en la presente invención con el pienso, o mediante pulverización del pienso con una solución acuosa que que contiene la enzima usada en la presente invención.

20 Cuando el sujeto a tratar es un instrumento en el que una superficie puede estar contaminada con una proteína príon patógena, se pueden mencionar, por ejemplo, un procedimiento de inmersión del instrumento en una solución acuosa que contiene la enzima usada en la presente invención, un procedimiento de pulverización del instrumento con una solución acuosa que contiene la enzima usada en la presente invención, o un procedimiento de lavado de la superficie del instrumento con una herramienta de lavado (por ejemplo, una tela, esponja, o cepillo) que tiene una  
25 solución acuosa que tiene la enzima usada en la presente invención.

30 Cuando el sujeto a tratar es una instalación en la que una proteína príon patógena puede estar presente, el contacto se puede llevar a cabo en contacto, por ejemplo, mediante pulverización de una solución acuosa que contiene la enzima usada en la presente invención.

35 Es preferible que el contacto del sujeto a tratar con la enzima o composición de enzima usada en la presente invención se lleve a cabo en las condiciones en las que la enzima usada en la presente invención puede mostrar una actividad suficiente de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena). Por ejemplo, se prefiere pH 7 a 12. El contacto se puede llevar a cabo preferiblemente a 20 a 80°C más preferiblemente 40 a 80°C.

El contenido de la enzima usada se puede seleccionar de manera apropiada de acuerdo con el contenido de una proteína altamente resistente a desnaturalización

y degradación (particularmente una proteína príon patógena) en el sujeto a tratar. Por ejemplo, para digerir una proteína príon patógena contenida en 1 ml de una suspensión al 1% que contiene un tejido de cerebro derivado de un ratón que padece temblor, es preferible usar la composición de enzima que contiene 0,5 a 10 µg de la enzima usada en la presente invención; la composición de enzima que contiene 2 U/g o más (más preferiblemente 2 a 500 U/g, incluso además preferiblemente 10 a 500 U/g, lo más preferiblemente 20 a 500 U/g), como una actividad de digerir azul de queratina, de la enzima usada en la presente invención; o la composición de enzima que contiene 1 U/g o más (más preferiblemente 1 a 5000 U/g, lo más preferiblemente 5 a 3000 U/g), como una actividad de digerir polvo de queratina, de la enzima usada en la presente invención. Cuando el contenido de la enzima es de menos de 0,5 µg, o la actividad es de menos de 2 U/g o más (como una actividad de digerir azul de queratina) o es de menos de 1 U/g (como una actividad de digerir polvo de queratina), una digestión completa del contenido anterior de la proteína príon patógena llega a dificultarse. Cuando el contenido de la enzima es de más de 10 µg, o la actividad es de más de 500 U/g o de más (como una actividad de digerir azul de queratina) o de más de 5000 U/g (como una actividad de digerir polvo de queratina) para digerir completamente el contenido anterior de la proteína príon patógena, no es prácticamente preferible desde el punto de vista de costes de producción.

## 20 EJEMPLOS

La presente invención se ilustrará además mediante, pero no significa que se limite a, los siguientes Ejemplos.

### Ejemplo 1: Preparación de enzima purificada

25 En este ejemplo, el cultivo y purificación se lleva a cabo para obtener una enzima purificada usada en la presente invención como sigue.

Medio de cultivo A [1% de polipeptona (Wako Pure Chemical Industries), 0,2% de extracto de levadura (Difco), y 0,1% de sulfato de magnesio heptahidrato (Wako Pure Chemical Industries) (pH 7,0)] se autoclavó mediante un procedimiento convencional, y el medio A (200 ml) se inoculó con *Bacillus licheniformis* MSK-103 (FERM BP-08487). Se llevó a cabo un cultivo a 37°C en aireación y agitación durante 30 72 horas. El caldo resultante se centrifugó a 3000 g durante 20 minutos para obtener un sobrenadante que contiene una enzima usada en la presente invención.

El sobrenadante se concentró 20 veces con un ultrafiltro (corte de peso molecular de 5.000) para obtener un sobrenadante concentrado que contiene la 35 enzima usada en la presente invención. El sobrenadante concentrado se filtró con una membrana de microfiltro (tamaño de poro = 0,45 µm) para eliminar los microorganismos. Al filtrado estéril resultante, se añadió sulfato de amonio hasta una concentración final de 1 mol/l, y un agente tampón (Tris-HCl) se añadió además hasta

pH 8,5 y una concentración final de 50 mmol/l. Para una purificación adicional por cromatografía hidrófoba, la solución preparada a una columna de fenil Sefarosa, y se eluyó mediante un gradiente lineal con sulfato de amonio (1 mol/l a 0 mol/l) en un tampón Tris-HCl, para obtener una fracción que contiene la enzima usada en la presente invención. La fracción se concentró 20 veces con un ultrafiltro (corte de peso molecular 5.000), y se llevó a cabo una cromatografía de filtración en gel usando gel Superdex 75 (Pharmacia). La solución concentrada se desarrolló a través de un gel con un tampón fosfato (0,025 mol/l, pH 7,0) que contiene 0,1 mol/l de cloruro sódico como eluyente, para obtener la enzima usada en la presente invención. Como resultado, se obtuvieron 20 µg de enzima purificada usada en la presente invención.

### Ejemplo 2: Confirmación de propiedades físicas y químicas de la enzima

#### (1) Actividad y especificidad de sustrato

Se examinaron las actividades de la enzima purificada obtenidas en el Ejemplo 1 a diversos sustratos (caseína, colágeno, elastina, y queratina). Los resultados se muestran en la tabla 2.

Como se muestra en la tabla 2, la enzima mostró una alta actividad de digerir cada sustrato, particularmente queratina. A este respecto, la "unidad 1 (U)" de actividades de digestión comparada en la tabla 2 se identifica como una cantidad de la enzima que puede desarrollar ninhidrina correspondiente a 1 µmol de glicina por minuto, en las siguientes condiciones:

Concentración del sustrato: 0,5%

pH: 9,0

Temperatura: 60°C

Tabla 2

Sustrato	Actividad de Digestión (U)
Caseína	326677
Colágeno	36958
Elastina	10501
Queratina	7187

#### (2) Peso molecular

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poli(acrilamida) con SDS que usa un 12% de gel homogéneo (Tefco) para determinar el peso molecular de la enzima purificada preparada en el Ejemplo 1. Como resultado, el peso molecular de la enzima capaz de digerir una proteína príon patógena era aproximadamente 31.000.

Se llevó a cabo otra electroforesis en gel de poli(acrilamida) con SDS usando 15% de gel homogéneo (ATTO) para determinar el peso molecular de la enzima

purificada preparada en el Ejemplo 1. Como resultado, el peso molecular de la enzima capaz de digerir una proteína príon patógena era aproximadamente 26.000. A este respecto, Estándar de Peso Molecular de Proteína (Bio-Rad) se usó como un marcador estándar en este ejemplo.

5 (3) Punto isoeléctrico

Se llevó a cabo una electroforesis de electroenfoque isoeléctrico en gel de poliacrilamida usando un sistema de electroforesis LKB para determinar un punto isoeléctrico (pI) de la enzima purificada preparada en el Ejemplo 1. Como resultado, el punto isoeléctrico de la enzima capaz de digerir una proteína príon patógena era 9,3. A este respecto, cada punto isoeléctrico de muestras estándar usadas en este ejemplo se muestra en la tabla 3.

Tabla 3

	<u>Muestra estándar</u>	<u>Punto isoeléctrico</u>
	Tripsinógeno	9,30
15	Banda básica de lecitina de lentejas	8,65
	Banda neutra de lecitina de lentejas	8,45
	Banda ácida de lecitina de lentejas	8,15
	Banda básica de mioglobina de caballo	7,35
	Banda ácida de mioglobina de caballo	6,85
20	Anhidrasa carbónica humana B	6,55
	Anhidrasa carbónica de caballo B	5,80
	$\beta$ -lactoglobulina A	5,20
	Inhibidor de la tripsina de soja	4,55
	amiloglucosidasa	3,50

25

(4) pH óptimo y pH estable

El pH óptimo a 37°C de enzima purificada preparada en el Ejemplo 1, determinada por una actividad de digerir azul de queratina (Sigma) como índice, era pH 9,0 a 10,0, como se muestra en la Figura 1. El pH estable a 37°C de la enzima era pH 7,0 a 12,0, preferiblemente pH 8,0 a 10,5, como se muestra en la Figura 1.

30

(5) Temperatura óptima

La temperatura óptima a pH 9,0 (Es decir, pH óptimo), determinada por una actividad de digerir azul de queratina como índice, era 60 a 70°C, como se muestra en la Figura 2.

35

Ejemplo 3: Clonación de gen de enzima y determinación de su secuencia de aminoácidos

En este ejemplo, se clonó un gen que codifica la enzima purificada preparada en el Ejemplo 1, y la secuencia de nucleótidos del gen se determinó para confirmar la secuencia de aminoácidos de la enzima.

Para purificar la enzima, el medio de cultivo A (véase el Ejemplo 1) se inoculó con *Bacillus licheniformis* MSK103 (FERM BP-08487). Se llevó a cabo un cultivo a 37°C durante 3 días, y el caldo resultante se centrifugó para obtener un sobrenadante. El sobrenadante se concentró aproximadamente 20 veces con Pellicon XL (corte 5000; Millipore), y se ajustó a una solución que contiene 1 mol/l de sulfato de magnesio y 0,05 mol/l Tris-HCl (pH 8,5). La solución preparada se aplicó a una columna de fenil Sefarosa (Fenil Sefarosa FF; bajo sub, 26 X 300 mm; Amersham Bioscience), y se eluyó con un gradiente de concentración lineal con sulfato de amonio (1 mol/l a 0 mol/l) en un tampón 0,05 mol/l de tampón Tris-HCl (pH 8,5), para obtener una fracción eluida con 0 mol/l de sulfato de amonio. La fracción se concentró con Pellicon XL (corte 5000) seguido de Ultrafree 15 (Ucut5000; Millipore). La solución concentrada se aplicó a Superdex (Superdex75pg; 16X 600 mm; Amersham Bioscience), y se eluyó con un tampón fosfato (0.05 mol/l, pH 7,0) que contiene 0,1 mol/l de cloruro sódico obteniendo una fracción que tiene un peso molecular de aproximadamente 31 kDa. Se confirmó mediante SDS-PAGE que la fracción contenía, como una única sustancia, una proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 31 kDa.

La proteína purificada se sometió a SDS-PAGE, y se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon PSO; Millipore), para transferir la proteína sobre la membrana PVOF. La membrana PVOF se lavó con agua y se secó al aire y después se usó para analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína por un secuenciador de proteínas (Model 492; Applied Biosystems). Como resultado, se obtuvo la siguiente secuencia de aminoácidos:

Aminoácido N-terminal: AOTVPYGIPLI (la secuencia que consta del 1° hasta el 11° aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2)

Se encontró que la secuencia de aminoácidos obtenida es la misma secuencia que la de queratinasa derivada de *Bacillus licheniformis* PWO-1 [Lin, X. et.al., Appl. Environ. Microbiol (1995) 61, 1469 - 1474] y subtilisina Carlsberg derivada de *Bacillus licheniformis* [Jacobs, M. et.al., Nucleic Acid Res. (1985) 13, 8913 - 8926]. A continuación, un fragmento parcial se amplificó mediante PCR, y se usó como una sonda para clonar un gen de interés como sigue.

Se preparó ADN genómico derivado de *Bacillus licheniformis* MSK-103 (FERM BP-08487) de acuerdo con un procedimiento de Wilson et al. [Wilson, C. R., J.

Bacteriol. (1985) 163, 445 - 453]. Se llevó a cabo una PCR que usa el genoma de ADN como un molde y una combinación de los siguientes cebadores para amplificar un fragmento parcial de un gen que codifica la enzima capaz de digerir un prión anormal. La PCR se llevó a cabo mediante el uso de Takara Taq (Takara Bio) como una enzima para PCR, realización de una desnaturalización por calor a 94°C durante un minuto, seguido de una repetición de un ciclo que consta de reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 48°C durante 30 segundos y a 68°C durante 2 minutos 30 veces, para amplificar el ADN de interés.

10 Cebador PDE-2 para amplificación de un fragmento parcial:

5'-agagcggcggaaaagtggac-3' (SEC ID N°: 3)

Cebador PDE-5 para amplificación de un fragmento parcial

5'-cctgcgccaggagccatgac-3' (SEC ID N°: 4)

15 Como resultado, se amplificó un fragmento de aproximadamente 700 pares de bases. El fragmento de ADN amplificado se usó como una sonda para clonar la longitud completa del gen de interés a partir de una genoteca genómica derivada de *Bacillus licheniformis* MSK-1 03 (FERM BP-08487) como sigue.

20 ADN genómico derivado de *Bacillus licheniformis* MSK-103 (FERM BP-08487) se digirió parcialmente con enzima de restricción *Sau* IIIA1, y los fragmentos se ligaron en el vector EMBLIII vector (Stratagene). Un kit de empaquetamiento comercialmente disponible (extracto de empaquetamiento MaxPlax Lambda; Epicentre technologies) se usó para formar partículas de fago que contienen las construcciones. La genoteca de fago obtenida se rastreó mediante el uso del kit de rastreo comercialmente disponible (kit de marcaje e iniciador de detección de ADN DIG - High Prime; Roche) para obtener 100 clones positivos de aproximadamente 10000 placas. Los ADN se purificaron de 10 clones positivos, un fragmento de *Sph*I de aproximadamente 4,1 kb, que estaba contenido en 4 clones positivos en medio, se subclonó en pUC119 para construir pUC-POE4. El tamaño del fragmento de *Sph*I de acuerdo con un resultado de un análisis Southern de *Bacillus licheniformis* MSK-103 (FERM BP-08487) usando el producto de la PCR como una sonda. El plásmido pUC-POE4 se usó para determinar su secuencia de ADN mediante un procedimiento de secuencia de cuña guía usando un secuenciador de ADN (modelo 3730XL; Applied Biosystems). Como resultado, el plásmido contenido en la longitud completa del gen que codifica la enzima capaz de digerir un prión anormal, y la secuencia de nucleótidos de la región codificante era la de la SEC ID N°: 1.

35 Como resultado, se confirmó que la secuencia de aminoácidos de la enzima purificada obtenida en el Ejemplo 1 es completamente igual a la de subtilisina DY

(documento W098/30682). Además, la segunda mayor homología era 81% en un gen *kerA* derivado de *Bacillus licheniformis* (mediante una investigación BLAST).

#### Ejemplo 4: Preparación de composición de enzima

5 Para obtener una composición de enzima usada en la presente invención, el medio de cultivo A (200 ml) descrito en el Ejemplo 1 se inoculó con *Bacillus licheniformis* MSK-1 03 (FERM BP-08487). Se llevó a cabo un cultivo a 37°C con aireación y agitación durante 48 horas. El caldo obtenido se centrifugó a 3000 g durante 30 minutos obteniendo un sobrenadante que contenía la enzima usada en la presente invención. El sobrenadante se concentró 30 veces con un ultrafiltro (corte de peso molecular de 5.000) para obtener un sobrenadante concentrado. El sobrenadante concentrado se filtró con un microfiltro (tamaño de poro = 0,45 µm) para eliminar microorganismos. Como resultado, se obtuvo una solución de composición de enzima A que contiene la enzima usada en la presente invención. La composición de enzima A mostró una actividad de digerir azul de queratina, y la actividad era 285 U/g. 10 La solución de la composición de enzima A se liofilizó para obtener un polvo de la composición de enzima A'.

Medio de cultivo B [0,01% de extracto de levadura (Difco), 1% harina de pluma (ITOCHU FEED MILLS CO., LTD), 0,01% de cloruro de magnesio (Wako Pure Chemical Industries), 0,04% de fosfato ácido dipotásico (Wako Pure Chemical Industries), 0,03% de fosfato diácido potásico (Wako Pure Chemical Industries), 0,05% de cloruro sódico (Wako Pure Chemical Industries), y 0,05% de cloruro amónico (Wako Pure Chemical Industries) (pH 7,0)] se autoclavó, y el medio B (40 ml) se inoculó con *Bacillus licheniformis* PWD-1 (ATCC-53757). Se llevó a cabo un cultivo a 37°C bajo aireación y agitación durante 48 horas. El caldo resultante se centrifugó a 3000 g durante 30 minutos para obtener un sobrenadante. El sobrenadante se concentró 18 veces con un ultrafiltro (corte de peso molecular de 5.000) para obtener un sobrenadante concentrado. El sobrenadante concentrado se filtró con un microfiltro (tamaño de poro = 0,45 µm) para eliminar los microorganismos. Como resultado, se obtuvo una solución de la composición de enzima B para comparación. 20 25

#### Ejemplo 5: Digestión de proteína príon patógena de ratón con enzima purificada

En este ejemplo, la enzima purificada usada en la presente invención preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, y una proteasa comercialmente disponible (subtilisin carlsberg; Sigma) se usaron para evaluar una actividad de digerir una proteína príon patógena. A este respecto, una actividad de una preparación de enzima (proteínasa K; Wako Pure Chemical Industries) se usó como un patrón. 30 35

Como sustrato usado en este ejemplo, el cerebro derivado de un ratón infectado con la proteína príon patógena [CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, (Estados Unidos), American Society for Microbiology

(Asm), marzo en 1995, p. 172 - 176] se usó para preparar un homogeneizado al 5% [2% de sarcosinato de N-sodio lauroílo, y 10 mmol/l de tampón TrisHCl (pH 7,5)], y el homogeneizado al 5% se diluyó hasta una concentración final de 1% con 50 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 8,3).

5 Una reacción enzimática se llevó a cabo mezclando el homogeneizado de cerebro al 1% con un volumen igual de la solución de enzima purificada, la solución de proteasa comercialmente disponible, o la solución de preparación de enzima, e incubando cada mezcla a 37°C for 1 hora. Las concentraciones de la enzima purificada, la proteasa comercialmente disponible, y la preparación de enzima eran 1  
10 µg/ml y 0,2 µg/ml, como una concentración final en cada mezcla de reacción durante la reacción enzimática.

Se usó una alícuota de cada mezcla de reacción después de la reacción enzimática para llevar a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) usando un sistema de electroforesis (ATTO) y un gel de poliacrilamida de SDS (10% de gel; ATTO). Después del SDS-PAGE se transfirieron proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore) mediante un sistema de transferencia (ATTO) de acuerdo con un protocolo unido a él. La proteína príon patógena unida a la membrana de PVDF se marcó mediante un procedimiento anticuerpo-antígeno usando un anticuerpo de  
15 conejo anti-príon-proteína como el primer anticuerpo, y un anticuerpo de cabra anti-conejo-IgG marcado con peroxidasa de rábano picante (Zymed) como el segundo anticuerpo. La proteína príon patógena se detectó mediante un kit de marcaje y detección comercialmente disponible (ECL+Plus Western Blotting Detection System; Amersham Bioscience) de acuerdo con un protocolo unido a él.

20 A este respecto, el anticuerpo de conejo anti-príon-proteína usado como el primer anticuerpo se preparó como sigue. Un péptido (PrP94-112) que consta de 20 aminoácidos en el que la cisteína (Cys) se añadió a una secuencia N-terminal de un fragmento P27-30 del núcleo de la proteína príon de temblor de oveja se sintetizó, y el conejo se inmunizó con el péptido conjugado a hemocianina de lapa californiana como inmunógeno. El antisuero de conejo obtenido se sometió a una columna de  
30 proteína A para purificar el anticuerpo de interés. El anticuerpo reacciona no solamente con la proteína príon de oveja sino también proteínas de príon de hámster, ratón, y bovina.

Los resultados se muestran en la Figura 3. Cuando se usa proteinasa K como patrón, o subtilisina carlsberg como una proteasa comercialmente disponible, bandas  
35 resistente a proteasas, que indicaban la presencia de presencia de la proteína príon patógena, se detectaron incluso a la concentración de 1 µg/ml. El peso molecular la banda no digerida era 32 kDa, y aquellas bandas parcialmente digeridas (tres bandas)

eran 30 kDa, 25 - 26 kDa, y 20 - 21 kDa. Por el contrario, cuando se usa la enzima purificada usada en la presente invención, se detectó una banda a 0,2 µg/ml, pero casi todas las proteínas de priones patógenas contenidas en el homogeneizado de cerebro al 1% se digirió a 1 µg/ml.

5 Ejemplo 6: Digestión de proteína príon patógena de ratón con composición de enzima

En este ejemplo, la solución de la composición de enzima A usada en la presente invención preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 se usó para evaluar una actividad de digerir proteína príon patógena de ratón. A este respecto, una actividad de una preparación de enzima (proteínasa K; Wako Pure Chemical Industries) se usó como patrón. Como sustrato, se usó el mismo sustrato usado en el Ejemplo 5 (Es decir, homogeneizado de cerebro al 1% derivado de un ratón infectado con la proteína príon patógena).

10 Se llevó a cabo una reacción enzimática mezclando el homogeneizado de cerebro al 1% con un volumen igual de la solución de composición de enzima o la solución de preparación de enzima, e incubación de cada mezcla a 37°C durante 1 hora. Las concentraciones de la preparación de enzima eran 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, y 6,25 µg/ml, como una concentración final. Como la composición de enzima A, la solución original se diluyó hasta 1, 1/2, 1/4, 1/8, y 1/16. Las soluciones diluidas mostraron 285 U/g, 143 U/g, 71 U/g, 36 U/g, y 18 U/g como una actividad de digerir azul de queratina, respectivamente.

20 Una alícuota de cada mezcla de reacción después de la reacción enzimática se usó para detectar la proteína príon patógena de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

25 Los resultados se muestran en la Figura 4. Cuando se usa proteínasa K como patrón, bandas resistentes a proteasas, que indicaban la presencia de la proteína príon patógena, se detectaron incluso a una alta concentración de 50 µg/ml. Por el contrario, cuando se usa la composición de enzima usada en la presente invención, se detectó ligeramente una banda a 18 U/g como una actividad de digerir azul de queratina (diluido hasta 1/16; una solución concentrada 1,875 veces del caldo), pero la proteína príon patógena se digirió completamente a 36 U/g (diluido hasta 1/8; una solución concentrada 3,75 veces del caldo) o más.

30 Ejemplo 7: Digestión de proteína príon patógena de oveja con composición de enzima

35 En este ejemplo, la solución de composición de enzima A usada en la presente invención y la solución de composición de enzima B (que contiene queratinasa derivada de Bacillus licheniformis PWD-1) para comparación, estando preparada cada una de ellas de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, se usaron para evaluar una actividad de digerir proteína príon patógena de oveja. A

este respecto, una actividad de una preparación de enzima (proteínasa K; Wako Pure Chemical Industries) se usó como patrón.

Como sustrato usado en este ejemplo, el cerebro derivado de una oveja infectada con la proteína príon patógena se usó para preparar un homogeneizado al 5% [2% de sarcosinato de N-sodio lauroilo, y 10 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 7,5)], y el homogeneizado al 5% se diluyó hasta una concentración final de 1% con 50 mmol/l tampón Tris-HCl (pH 8,3).

Una reacción enzimática se llevó a cabo mezclando el homogeneizado de cerebro al 1% con un volumen igual de la solución de composición de enzima o la preparación de solución de enzima, e incubando cada mezcla a 37°C durante 1 hora. Las concentraciones de la preparación de enzima eran 50 µg/ml, 10 µg/ml, 2 µg/ml, y 0,4 µg/ml, como una concentración final. Como la composición de enzima A usada en la presente invención, la solución original se diluyó hasta 1, 1/2, 1/4, y 1/8. Las soluciones diluidas mostraron 285 U/g, 143 U/g, 71 U/g, y 36 U/g como una actividad de digerir azul de queratina, respectivamente. Como la composición de enzima B para comparación, la solución original se diluyó hasta 1, 1/2, 1/4, y 1/8. la solución diluida mostró 37 U/g, 19 U/g, 9 U/g, y 5 U/g.

Una alícuota de cada mezcla de reacción después de la reacción enzimática se usó para detectar la proteína príon patógena de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

Los resultados se muestran en la Figura 5. Cuando se usa proteínasa K como patrón, bandas resistentes a proteasas, que indicaban la presencia de la proteína príon patógena, se detectaron a las concentraciones de 10 µg/ml o menos.

Cuando se usa la composición de enzima B para comparación, la proteína príon patógena no se digirió a ninguna concentración. Por el contrario, cuando se usa la composición de enzima A usada en la presente invención, la proteína príon patógena estaba casi completamente digerida a cualquier concentración. Además, se encontró que la enzima de la presente invención puede digerir una proteína príon patógena derivada de una especie diferente y que tiene una secuencia de aminoácidos diferente con una variación menor.

#### Ejemplo 8: Digestión de proteína príon patógena de ratón con composición de enzima

Se cultivó *Bacillus licheniformis* PWD-1 de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 para preparar la composición de enzima A usada en la presente invención (Es decir, usando el medio A), y una composición de enzima C para comparación se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 para preparar la composición de enzima A.

Además, se cultivó *Bacillus licheniformis* DSM-8782 de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 para preparar la composición de enzima A

usada en la presente invención (Es decir, usando el medio A), y se preparó una composición de enzima D para comparación de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 para preparar la composición de enzima A.

5 Además, se cultivó *Bacillus licheniformis* DSM-8782 de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 para preparar la composición de enzima B para comparación (Es decir, usando el medio B), y se preparó una composición de enzima E para comparación de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 para preparar la composición de enzima B.

10 En la tabla 4, se muestran las relaciones de la composición de enzimas con las cepas y los medios. El medio B es un medio para inducir queratinasa [Publicación de Patente Japonesa no Examinada (Kokai) N° 6-46871].

Tabla 4

	<u>Composición de enzima</u>	<u>Cepa</u>	<u>Medio</u>
15	A	FERM BP-08487	A
	B	PWD-1	B
	C	PWD-1	A
	D	DSM-8782	A
	<u>E</u>	<u>DSM-8782</u>	<u>B</u>

20 La composición de enzima A resultante usada en la presente invención y cuatro composiciones de enzimas B a E para comparación se usaron para comparar la actividad de digerir proteína príon patógena de ratón, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 7, excepto que se concentró una concentración final de cada composición 18 veces con respecto a cada sobrenadante.

25 Los resultados se muestran en la Figura 6. Como se muestra en la Figura 6, la proteína príon patógena no se digirió por la composición de enzimas B a E para comparación, pero se digirió completamente por la composición de enzima A usada en la presente invención.

#### Ejemplo 9: Ensayo comparativo para termoasa (1)

30 La composición de enzima A' usada en la presente invención preparada de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 4, y termoasa (DAIWA KASEI K.K.), como una enzima para comparación, derivada de *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko descrita en el documento W002/053723 se usaron para evaluar la actividad de digerir proteína príon patógena de hámster (cepa Sc237).

35 Como sustrato usado en este ejemplo, el cerebro derivado de un ratón infectado con proteína príon patógena de tipo hámster (cepa SC237) se usó para preparar un homogeneizado de cerebro al 1% [50 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 8,3)]. La proteína príon patógena de tipo Sc237 se acumuló en el cerebro del ratón.

Cada solución de enzima se preparó disolviendo la composición de enzima A' o termoasa en 50 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 8,3). Las concentraciones de cada solución eran 4, 8, 16, y 32 U/ml (como una concentración final) como una actividad de digerir polvo de queratina.

5 La reacción enzimática se llevó a cabo mezclando el homogeneizado de cerebro al 1% con un volumen igual de cada solución de enzima, e incubando la mezcla a 37°C durante 20 horas.

10 Una alícuota de cada mezcla de reacción después de la reacción enzimática se usó para detectar la proteína príon patógena de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

15 Los resultados se muestran en la Figura 7. Cuando se usa la solución de enzima que contiene termoasa, bandas resistentes a proteasas, que indicaban la presencia de la proteína príon patógena, se detectaron a cualquier concentración. Por el contrario, cuando se usa la composición de enzima usada en la presente invención, la proteína príon patógena se digirió completamente por debajo de los niveles de detección mediante transferencia de Western, a cualquier concentración.

#### Ejemplo 10: ensayo comparativo para termoasa (2)

20 El documento W002/053723 describe que una actividad de termoasa en la digestión de una proteína (una proteína príon patógena derivada de BSE) se incrementa en la presencia de dodecil sulfato sódico (SOS). En este ejemplo, una actividad de digerir proteína príon patógena de hámster se evaluó en tales condiciones.

25 La composición de enzima A' usada en la presente invención preparada de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 4, y la solución de termoasa usada en el Ejemplo 9 se usaron para evaluar la actividad de digerir proteína príon patógena de hámster (cepa Sc237).

30 Como sustrato usado en este ejemplo, el cerebro derivado de un ratón infectado con proteína príon patógena de tipo hámster (cepa Sc237) se usó para preparar a homogeneizado de cerebro al 1% [50 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 8,3) que contiene 0,1, 1, o 4% de SDS (concentraciones finales de SDS en la siguiente reacción = 0,05, 0,5, o 2%)]. La proteína príon patógena de tipo Sc237 se acumuló en el cerebro del ratón.

35 La reacción enzimática se llevó a cabo mezclando el homogeneizado de cerebro al 1% con un volumen igual de cada solución de enzima, e incubando la mezcla a 37°C durante 20 horas. La concentración de cada solución era 4 U/ml (como una concentración final) como una actividad de digerir polvo de queratina.

Una alícuota de cada mezcla de reacción después de la reacción enzimática se usó para detectar la proteína príon patógena de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

5 Los resultados se muestran en la Figura 8. En la Figura 8, la banda 1 es termoasa (4 U/ml; 0,05% SDS), la banda 2 es termoasa (4 U/ml; 0,5% SDS), la banda 3 es termoasa (4 U/ml; 2% SDS), y la banda 4 es la composición de solución de enzima A' (4 U/ml; 2% SDS).

10 Cuando se usa la solución de enzima que contiene termoasa, se detectaron bandas resistentes a proteasas, que indicaban la presencia de la proteína príon patógena, incluso a la concentración final de 2% SDS. Por el contrario, cuando se usa la composición de enzima usada en la presente invención, la proteína príon patógena se digirió completamente por debajo de los niveles de detección mediante transferencia de Western, a cualquier concentración.

15 Como se ha descrito anteriormente, se encuentra que la enzima usada en la presente invención muestra una excelente actividad de digerir una proteína príon patógena incluso en la presencia de SDS, en comparación con termoasa.

#### Ejemplo 11: Ensayo de modelo de lavado usando microplaca

Para evaluar los efectos sobre los instrumentos de lavado contaminados con una proteína príon patógena, se llevó a cabo un ensayo modelo como sigue.

20 La composición de enzima A' usada en la presente invención preparada de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 4, y la solución de termoasa usada en el Ejemplo 9 se usaron para evaluar la actividad de digerir proteína príon patógena de hámster (cepa Sc237) adherida a poliestireno.

25 Como sustrato usado en este ejemplo, el cerebro derivado de un ratón infectado con una proteína príon patógena de tipo hámster (cepa Sc237) se usó para preparar un homogeneizado de cerebro al 1% [50 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 8,3)]. La proteína príon patógena de tipo Sc237 se acumuló en el cerebro del ratón. Como control, un cerebro normal no infectado con la proteína príon anormal se usó para preparar un homogeneizado de cerebro al 1% [50 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 8,3)].

30 Cada homogeneizado de cerebro al 1% (25 µl/pocillo) de hámster normal o infectado con Sc237 se añadió a una placa de poliestireno (IMMUNO MODULE; Nunc), y la placa se secó completamente a temperatura ambiente durante un día.

35 Para llevar a cabo un tratamiento de lavado de la microplaca resultante usando soluciones de enzimas, la composición de enzima A' y termoasa se diluyeron hasta 7,5 U/ml y 15 U/ml (como actividad de digerir polvo de queratina) con 50 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 8,3) para preparar una solución de lavado A (7,5 U/ml) y solución de lavado B (15 U/ml), respectivamente.

La reacción enzimática se llevó a cabo añadiendo 100 µl/pocillo de cada solución de lavado, e incubando la placa a 37°C durante 1 hora con agitación a 100 rpm. Cada solución de lavado se eliminó, y cada pocillo se lavó dos veces con aproximadamente 300 µl de PBS.

5 Se llevó a cabo un tratamiento de desnaturalización mediante 100 µl/pocillo de 6 mol/l de clorhidrato de guanidina (Wako Pure Chemical Industries) y se permitió que la placa se quedara a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con aproximadamente 300 µl de PBS para retirar el clorhidrato de guanidina. Se llevó a cabo bloqueo mediante la adición de 300 µl/pocillo de 5% de  
10 leche desnatada (Amersham) y se dejó que la placa se quedara a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó dos veces con aproximadamente 300 µl de 0,05% de Tween 20-PBS.

La proteína príon patógena unida a la microplaca se marcó mediante un procedimiento de anticuerpo-antígeno usando un anticuerpo de ratón anti-príon-proteína (3F4; Chemicon International) como el primer anticuerpo, y un anticuerpo de  
15 cabra anti-ratón-IgG marcado con peroxidasa de rábano picante (Zymed) como el segundo anticuerpo. La proteína príon restante en cada pocillo de la microplaca se detectó mediante una reacción luminiscente usando un kit de marcaje y detección comercialmente disponible (Super Signal West Dura; Amersham Bioscience) de  
20 acuerdo con un protocolo unido a él. Se registró la cantidad de luminescencia mediante la captura de luz (AE-6962; ATTO), y se llevó a cabo un análisis de imagen mediante un software para análisis de imagen (analizador CS; ATTO).

Los resultados se muestran en la Figura 9. Cuando se usa la composición de enzima usada en la presente invención, la tasa residual de la proteína príon patógena  
25 era menor de 10% a la concentración de 7,5 U/ml, y la tasa era menor de aproximadamente 1% a la concentración de 15 U/ml. Por el contrario, cuando se usa termoasa, la tasa fue 40% o más a cualquier concentración. Como resultado, se encontró que la enzima usada en la presente invención muestra una excelente actividad de lavado con agua de una proteína príon patógena.

### 30 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La enzima usada en la presente invención muestra una excelente actividad de digerir una proteína altamente resistente a desnaturalización y degradación (particularmente una proteína príon patógena) en comparación con las proteasas conocidas. Por lo tanto, de acuerdo con la enzima usada en la presente invención o la  
35 composición de enzima usada en la presente invención que contiene la enzima, una proteína príon patógena se puede digerir de manera eficaz. Además, la enzima usada en la presente invención se puede producir a bajo coste.

De acuerdo con la enzima o la composición de enzima, se puede eliminar la contaminación en un sujeto que puede estar contaminado con una proteína prión patógena. La enzima es útil como un ingrediente activo para un agente de la presente invención para digerir o destoxificar una proteína prión patógena.

5      **TEXTO LIBRE EN EL LISTADO DE SECUENCIAS**

Las características de la "Secuencia Artificial" se describen en el identificador numérico <223> en el listado de secuencias. Más particularmente, la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 3 es el cebador PDE-2, y la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 4 is el cebador PDE-5.

10

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Meiji Seika Kaisha, Ud.

<110> National Agriculture and Bio-oriented Research Organization

15      <120> Procedimiento para digerir proteínas que son altamente resistentes a  
desnaturalización y degradación

<130> MEJ-701

<150> JP 2002-309248

<151> 2002-1 0-24

<160>4

20      <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211>825

<212> ADN

<213> Bacillus licheniformis

25      <220>

<221> CDS

<222> (1).. (825)

<223>

<400> 1

gcc	caa	aca	ggt	cct	tac	ggc	atc	ccg	ctc	atc	aag	gct	gac	aaa	gtg	48
Ala	Gln	Thr	Val	Pro	Tyr	Gly	Ile	Pro	Leu	Ile	Lys	Ala	Asp	Lys	Val	
1				5				10						15		
cag	gcc	caa	ggt	tat	aaa	ggg	gca	aat	gtc	aaa	gtc	ggt	atc	att	gat	96
Gln	Ala	Gln	Gly	Tyr	Lys	Gly	Ala	Asn	Val	Lys	Val	Gly	Ile	Ile	Asp	
			20					25						30		
acg	gga	atc	gct	tcg	tct	cat	aca	gac	ttg	aag	gta	gtc	ggc	gga	gca	144
Thr	Gly	Ile	Ala	Ser	Ser	His	Thr	Asp	Leu	Lys	Val	Val	Gly	Gly	Ala	
			35					40						45		
agc	ttt	gta	tct	ggt	gaa	agt	tat	aat	acg	gac	ggt	aac	gga	cac	ggc	192
Ser	Phe	Val	Ser	Gly	Glu	Ser	Tyr	Asn	Thr	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly	
		50					55					60				

aca cat gtt gcc gga aca gtg gcg gcg ctt gac aat aca aca gcc gtt Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val 65 70 75 80	240
tta ggc gtt gca ccg aac gtc tcc ctc tac gcg att aag gtg ttg aat Leu Gly Val Ala Pro Asn Val Ser Leu Tyr Ala Ile Lys Val Leu Asn 85 90 95	288
tca agc gga agc gga aca tac agc gca atc gtc agc gga att gag tgg Ser Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Ser Ala Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp 100 105 110	336
gcc aca caa aac ggc ctg gat gtc atc aac atg agc ctc gcc gga cca Ala Thr Gln Asn Gly Leu Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro 115 120 125	384
tcc ggc tca act gcg ctg aaa cag gct gtg gat aaa gca tat gcc agc Ser Gly Ser Thr Ala Leu Lys Gln Ala Val Asp Lys Ala Tyr Ala Ser 130 135 140	432
gga att gtc gta gtg gca gca gcg ggg aac agc gga tct tcc gcc agc Gly Ile Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Ser 145 150 155 160	480
caa aac aca atc ggc tat ccg gca aaa tat gac tcc gtc atc gcc gtc Gln Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val 165 170 175	528
ggt gcg gtt gac agc aac aaa aac aga gct tca ttc tcc agc gtc gcc Gly Ala Val Asp Ser Asn Lys Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly 180 185 190	576
tca gag ctt gaa gtc atg gct cct gcc gtc agc gta tac agc aca tat Ser Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Val Ser Val Tyr Ser Thr Tyr 195 200 205	624
cct tct aac acg tac aca tca ttg aac gga act tca atg gct tgc cct Pro Ser Asn Thr Tyr Thr Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro 210 215 220	672
cat gta gcg gga gca gca gcc ttg atc ttg tog aaa tac cct acg ctt His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys Tyr Pro Thr Leu 225 230 235 240	720

tca gct tcc caa gtt cgc aac cgc ctc tca agc act gcg act aat ttg 768  
 Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Asn Leu  
 245 250 255

gga gat tcc ttc tac tac ggc aaa ggg ctg atc aat gta gaa gct gcc 816  
 Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala  
 260 265 270

gct caa taa 825  
 Ala Gln

<210> 2

<211>274

5 <212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<400> 2

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val  
 1 5 10 15

Gln Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Gly Ile Ile Asp  
 20 25 30

Thr Gly Ile Ala Ser Ser His Thr Asp Leu Lys Val Val Gly Gly Ala  
 35 40 45

Ser Phe Val Ser Gly Glu Ser Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly  
 50 55 60

Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val  
 65 70 75 80

Leu Gly Val Ala Pro Asn Val Ser Leu Tyr Ala Ile Lys Val Leu Asn  
 85 90 95

Ser Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Ser Ala Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp  
 100 105 110

Ala Thr Gln Asn Gly Leu Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro  
 115 120 125

Ser Gly Ser Thr Ala Leu Lys Gln Ala Val Asp Lys Ala Tyr Ala Ser  
 130 135 140

Gly Ile Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Ser  
 145 150 155 160

Gln Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val  
 165 170 175

Gly Ala Val Asp Ser Asn Lys Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly  
 180 185 190

Ser Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Val Ser Val Tyr Ser Thr Tyr  
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Tyr Thr Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro  
 210 215 220

His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys Tyr Pro Thr Leu  
 225 230 235 240

Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Asn Leu  
 245 250 255

Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala  
 260 265 270

Ala Gln

<210> 3

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador PDE-2  
 <400> 3  
 agagcggcgg aaaagtgac 20  
 <210> 4  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador PDE-5  
 <400> 4  
 15 cctgcgccag gagccatgac 20

### REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento ex vivo para digerir una proteína príon patógena, que comprende la etapa de poner en contacto la proteína príon patógena con una enzima seleccionada entre el grupo constituido por
- 5 - una enzima que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y  
- una enzima homóloga que muestra una actividad de digerir la proteína príon patógena, y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 95% o más de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.
2. Un uso ex vivo de la enzima descrita en la reivindicación 1 para digerir una proteína
- 10 príon patógena.
3. Un procedimiento ex vivo para destoxificar una proteína príon patógena, que comprende la etapa de poner en contacto una materia sujeto que puede estar contaminada con una proteína príon patógena con la enzima descrita en la reivindicación 1.
- 15 4. El procedimiento ex vivo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la etapa de poner en contacto se lleva a cabo sin precalentamiento de la materia sujeto.
5. El procedimiento ex vivo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la etapa de poner en contacto se lleva a cabo sin precalentamiento de la materia sujeto a 90°C o más.
- 20 6. Un uso ex vivo de la enzima descrita en la reivindicación 1 para destoxificar una proteína príon patógena.

FIG. 1

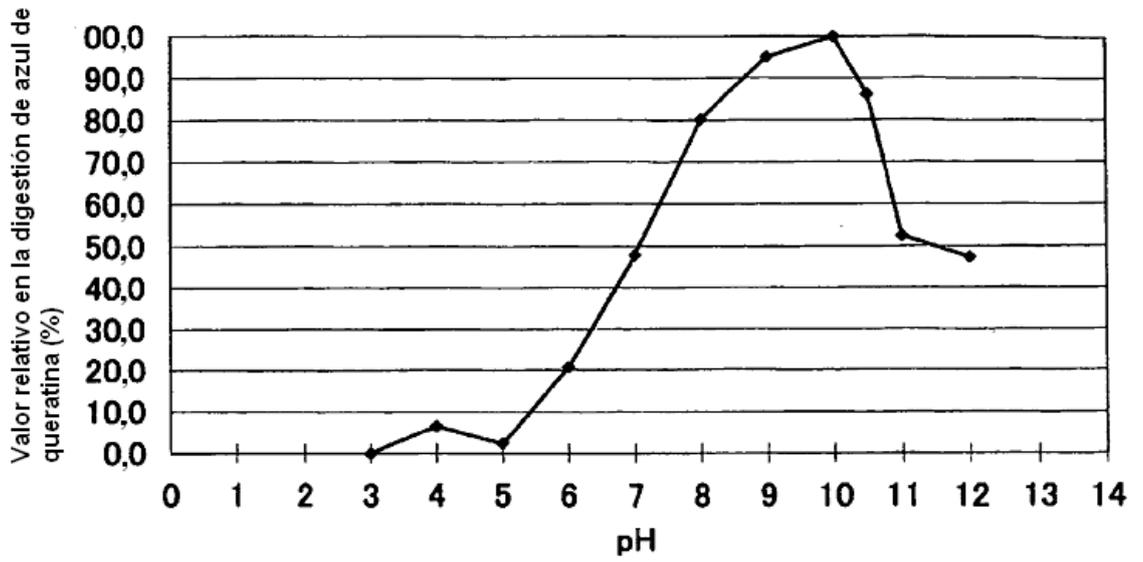


FIG. 2

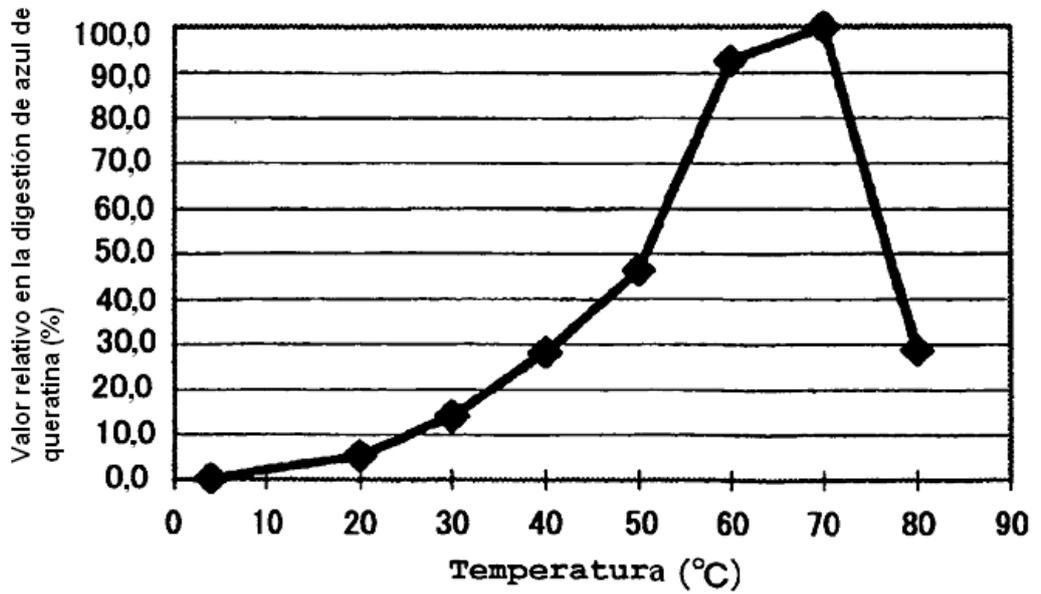


FIG. 3

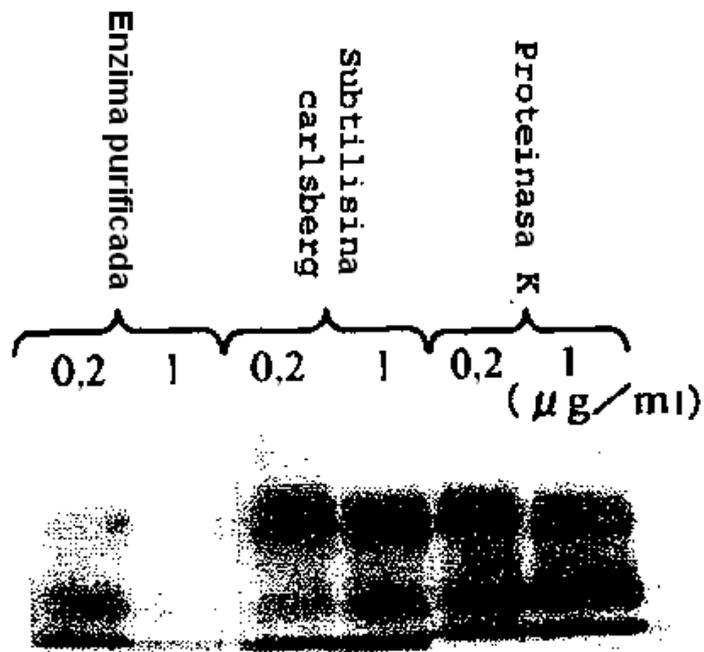


FIG. 4

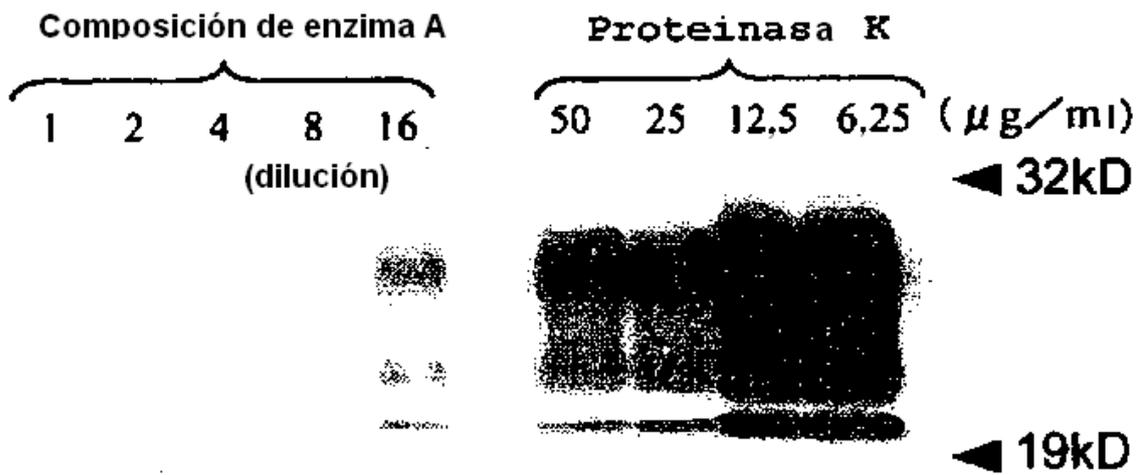


FIG. 5

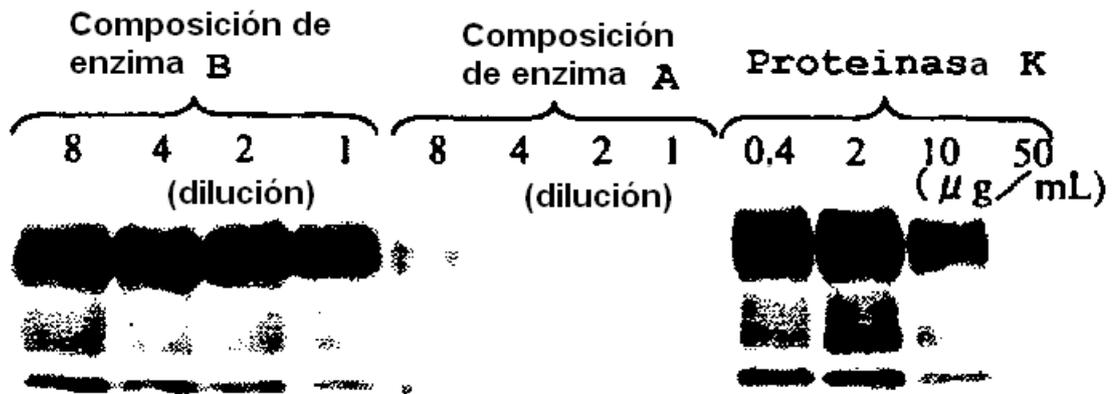


FIG. 6

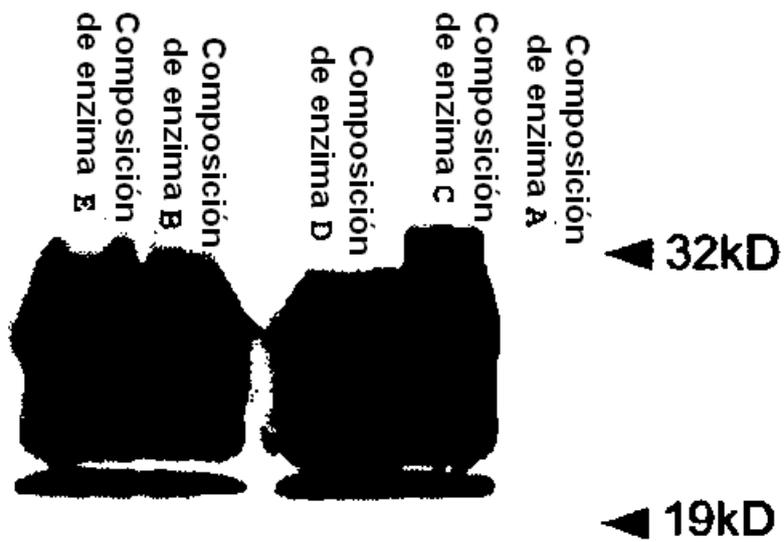


FIG. 7

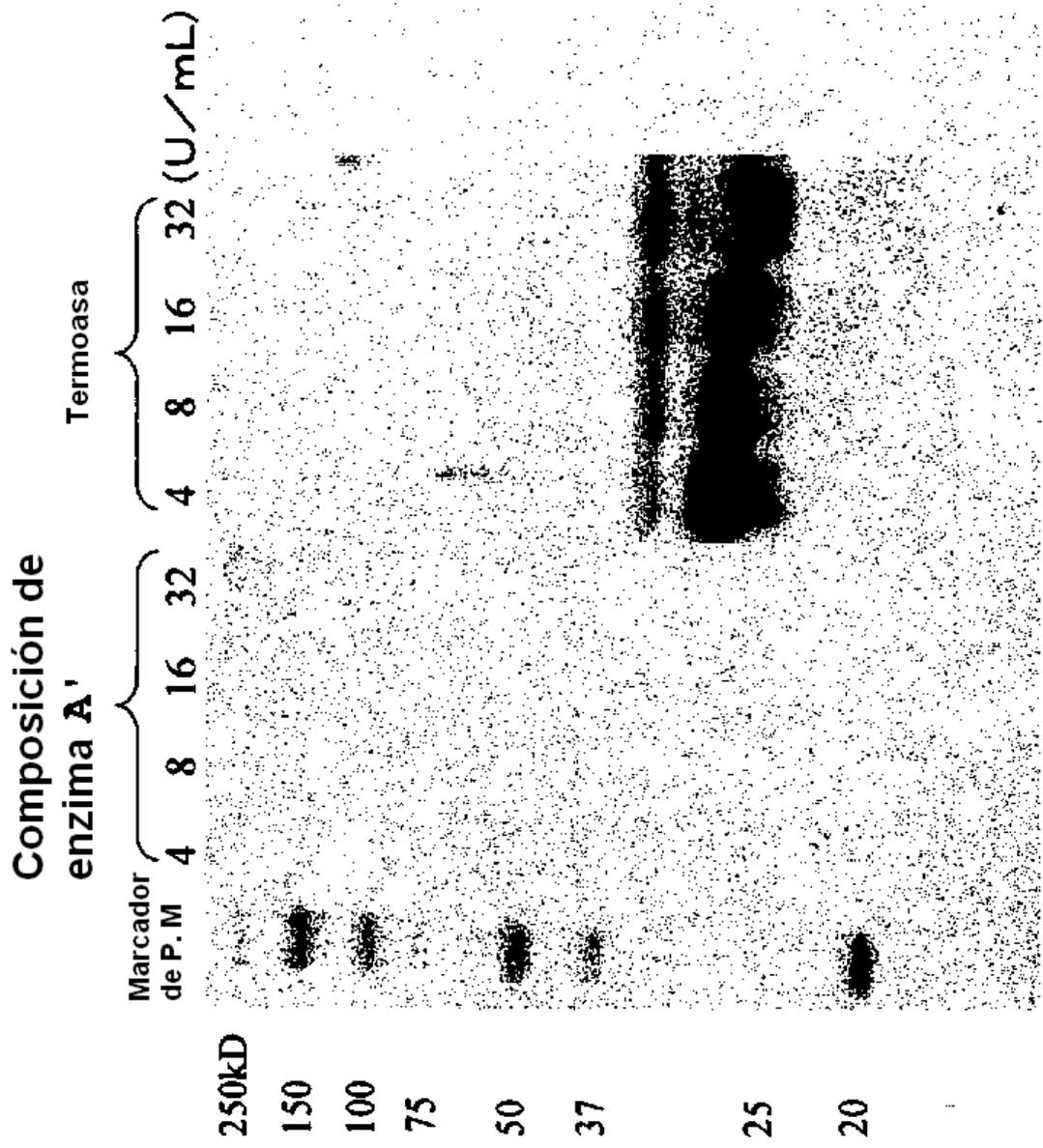


FIG. 8

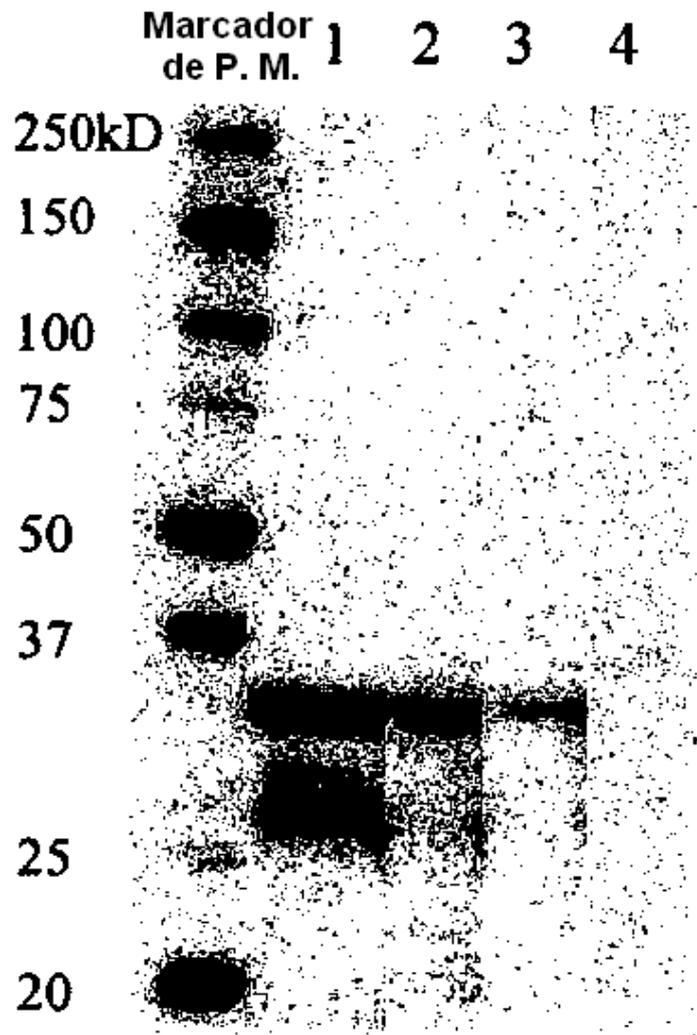


FIG. 9

